



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
ENGENHARIA DE MATERIAIS**



ENG 02298 TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO

**BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS COM POLÍMEROS CONDUTORES
PARA DETECÇÃO DE HEPATITE B**

Gabriela Juliane Favero
00221052

Professor Orientador: Carlos Arthur Ferreira
Co-orientadora: Marcele A. Hocevar

**Dezembro
2016**

Sumário

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 3 |
| 2 | OBJETIVO | 5 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 6 |
| 3.1 | Polímeros intrinsecamente condutores | 6 |
| 3.1.1 | Mecanismo de Condução e Síntese | 8 |
| 3.2 | Polianilina | 10 |
| 3.3 | Polipirrol | 11 |
| 3.4 | PEDOT | 13 |
| 3.5 | Biossensores | 14 |
| 3.5.1 | Biossensor para hepatite | 15 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 18 |
| 4.1 | Materiais | 18 |
| 4.2 | Síntese dos polímeros | 19 |
| 4.3 | Caracterização dos polímeros | 20 |
| 4.3.1 | Condutividade Elétrica | 20 |
| 4.3.2 | Voltametria Cíclica | 20 |
| 4.3.3 | FT-IR | 21 |
| 4.3.4 | MEV | 22 |
| 4.4 | Construção e caracterização dos biossensores | 22 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 24 |
| 5.1 | Caracterização dos polímeros | 24 |
| 5.1.1 | Condutividade elétrica | 24 |
| 5.1.2 | Voltametria Cíclica | 25 |
| 5.1.3 | FT-IR | 28 |
| 5.1.4 | MEV | 30 |
| 5.2 | Caracterização dos biossensores | 32 |
| 6 | CONCLUSÃO | 36 |
| 7 | SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 37 |
| 8 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 38 |

Resumo

O presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de uma metodologia para produzir biossensores amperométricos enzimáticos para detecção de hepatite B, a partir da imobilização de enzima e antígeno HBcAg em três polímeros condutores diferentes: polianilina (PAni), polipirrol (PPi) e PEDOT. Estes polímeros foram estudados no estado dopado com poli(estireno sulfonado) (PSS), que serviram de suporte para a imobilização da enzima *horseradish peroxidase* (HRP) na construção do biossensor amperométrico. O polímero foi aplicado sobre o eletrodo de trabalho de uma tira de sensor comercial com três eletrodos e na sequência o antígeno e a enzima foram imobilizados sobre o polímero. Inicialmente, os polímeros puros foram caracterizados através de espectroscopia de infravermelho (FT-IR), condutividade elétrica, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e voltametria cíclica. Após a imobilização da HRP e do antígeno sobre os diferentes polímeros, testes de voltametria cíclica foram realizados utilizando anticorpo para detectar a eficiência do biossensor através da sua eletroatividade. Em geral, a metodologia proposta se mostrou eficiente para a produção de biossensores enzimáticos utilizando polímeros condutores.

1 INTRODUÇÃO

Durante muitos anos foi associado a propriedade de condutividade elétrica aos metais e o caráter isolante era atribuído aos polímeros. Porém, a partir da descoberta dos polímeros condutores, no ano de 1977, essa associação em relação aos polímeros foi se tornando cada vez mais obsoleta, devido às características condutoras, elétricas, ópticas e magnéticas que estes apresentam, permitindo as mais variadas aplicações, como baterias, sensores, pilhas, revestimentos, membranas, aplicações biomédicas, etc.

Essa classe relativamente nova de polímeros, chamada de “metais sintéticos”, vem ganhando importância em diversos setores, sendo a eletrônica e a biomedicina os mais explorados. Devido a preocupação cada vez maior com a saúde, essa área está sempre em busca de métodos mais eficientes para detecção e quantificação de doenças. Sendo assim, o interesse pelo desenvolvimento e aprimoramento dos biossensores vem crescendo, visando a detecção das doenças e também o seu monitoramento, como é o caso de doenças como o diabetes e a hepatite, que precisam ser rigidamente controladas.

Os biossensores em geral apresentam-se como um complemento para os exames já existentes. São dispositivos analíticos que proporcionam uma interação entre a camada biológica, que são biomoléculas imobilizadas, e o transdutor elétrico, químico ou físico, capaz de transformar a informação vinda da medida do analito em estudo em um sinal proporcional em magnitude ou frequência à concentração do analito (1), permitindo assim a leitura qualitativa ou quantitativa da análise.

A utilização dos polímeros condutores como transdutores de sinal no método de análise por meio de tiras de teste rápido, transforma o conjunto em um aparelho muito promissor. Além das vantagens intrínsecas dos biossensores como praticidade, respostas rápidas e possibilidade de monitoramento da doença, a síntese facilitada desses polímeros permite a

fabricação em série de forma simples, oferecendo tecnologia barata e eficiente para diagnóstico de doenças.

Nesse âmbito, inúmeros estudos estão em desenvolvimento na área dos biossensores, buscando através de um dispositivo pequeno e portátil de grande eficiência e baixo custo, a antecipação da detecção de doenças permitindo um tratamento adequado e assim salvando vidas. Por este motivo, a hepatite B vem sendo foco de pesquisas, por ser uma doença de elevada transmissibilidade e impacto em saúde pública (2), com taxa de letalidade dos pacientes hospitalizados de 0,8 a 2%, podendo aumentar em indivíduos com mais de 40 anos de idade (3)

Perante esses fatos, no presente estudo foi desenvolvido uma metodologia para imobilização de enzimas em polímeros condutores e sua aplicação sobre tiras de sensores comerciais. Em um primeiro momento foram discutidas algumas definições relevantes como polímeros condutores, enzimas, antígenos e biossensores. Na sequência, o procedimento experimental foi apresentado, indicando os materiais, equipamentos e metodologia utilizados, assim como as técnicas de caracterização dos polímeros sintetizados. Por fim, são apresentados os resultados e conclusões.

É importante destacar que este trabalho foi desenvolvido em cooperação com a empresa FK Biotecnologia firmando esta benéfica aliança universidade-empresa permitindo desenvolver a pesquisa visando desenvolvimento e inovação tecnológica.

2 OBJETIVO

Este trabalho tem por objetivo desenvolver uma metodologia para a produção de biossensores para detecção de hepatite do tipo B, baseados na utilização de polímeros condutores como transdutores de sinal biológico em sinal elétrico, também agindo como suporte para a imobilização da enzima.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Polímeros intrinsecamente condutores

Os polímeros intrinsecamente condutores (PICs) são formados por cadeias contendo duplas ligações C=C conjugadas que permite o fluxo de elétrons em condições específicas. Esses polímeros foram descobertos empiricamente por Shirakawa e colaboradores, no ano de 1977, através da exposição do poliacetileno a agentes dopantes, tornando-o um condutor elétrico intrínseco (4,5). Com esta descoberta, percebeu-se que não havia nenhuma razão para que um polímero orgânico não pudesse ser um bom condutor de eletricidade. Sendo assim, outros polímeros condutores foram sintetizados.

Estes novos materiais oferecem a possibilidade de combinar propriedades intrínsecas dos plásticos com o comportamento elétrico, magnético e óptico de metais e semicondutores inorgânicos. Os polímeros intrinsecamente condutores passam de isolantes a condutores através de processos reversíveis de oxidação e redução do sistema conjugado (5,6), feito por meio de agentes de transferência de carga (dopantes).

Com vasta aplicação, estes PICs são visados para atuarem também na alta tecnologia como em revestimentos anti-estáticos, eletrodos transparentes, displays OLED e iluminação, células solares orgânicas e capacitores de polímero (7). Com modificações químicas apropriadas, os polímeros intrinsecamente condutores podem apresentar um intervalo de condutividades que varia desde semicondutor até condutor, podendo chegar a 10^3 S/cm (Figura 1) (8,9).

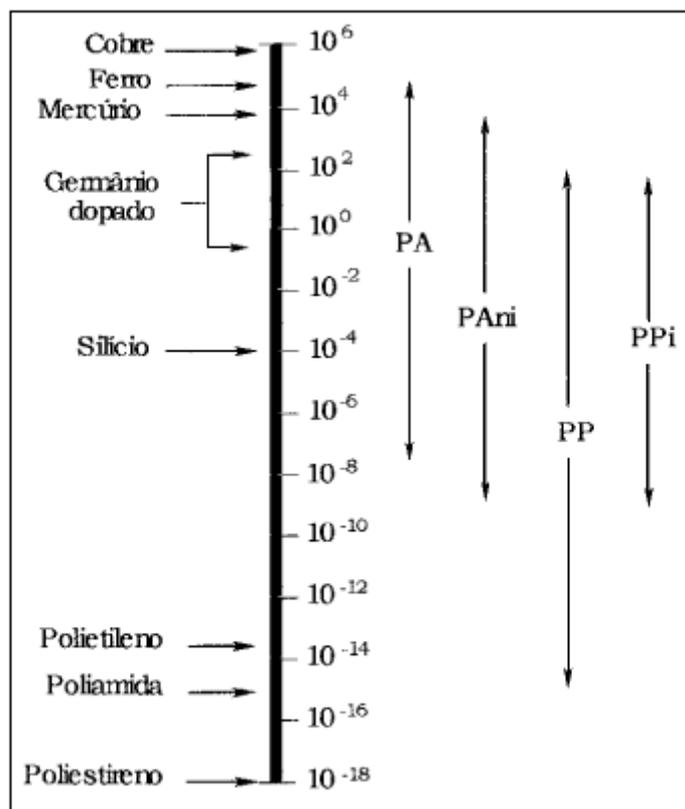


Figura 1: Comparação da condutividade dos PICs com alguns materiais. PA = Poliacetileno, PAri = Polianilina, PP = Poli(p-fenileno) e PPI = Polipirrol (8).

Entre os polímeros condutores mais conhecidos destacam-se o poliacetileno, o polipirrol, o politiofeno e a polianilina cujas estruturas estão representadas na Figura 2.

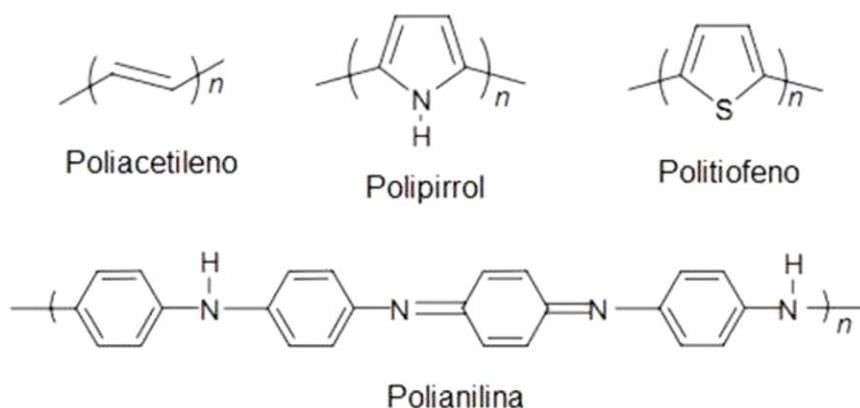


Figura 2: Principais polímeros condutores (16)

3.1.1 Mecanismo de Condução e Síntese

Como vimos, os polímeros intrinsecamente condutores são compostos de cadeias hidrocarbônicas que possuem insaturações conjugadas, que são ligações simples e duplas alternadas ao longo da cadeia (Figura 3), responsáveis pela condução eletrônica (10,11,15)

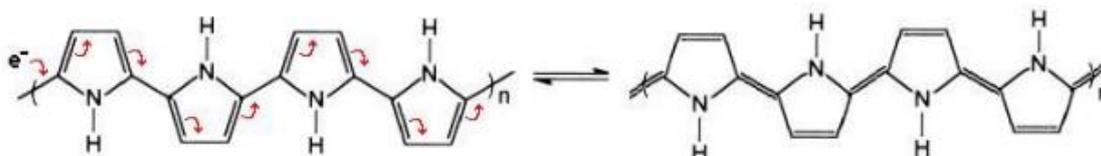


Figura 3: Estrutura com ligações duplas alternadas e caminho de condução eletrônica para o polipirrol.

Estes elétrons π alternados são responsáveis, além da condutividade elétrica, por outras propriedades como: baixa energia de transição, baixo potencial de ionização e alta afinidade elétrica (12)

A oxidação e a redução da cadeia polimérica é feita através de agentes de transferência de carga – aceptores ou doadores de elétrons - transmutando o polímero de isolante a condutor ou semiconductor. Esses agentes são chamados de “dopantes” (5,11,15). A dopagem ocorre através de diferentes métodos químicos, sendo de exposição direta do polímero a agentes de transferência de carga (dopantes), seja em fase gasosa, em solução, ou ainda por oxidação ou redução eletroquímica (13). Estes dopantes químicos são fortes agentes oxidantes ou redutores e podem ser compostos, moléculas neutras, ou sais inorgânicos que podem facilmente formar íons, dopantes orgânicos e poliméricos (13).

Geralmente, o método de síntese é escolhido de acordo com a aplicação em que o polímero se destina sendo que, a síntese por oxidação química é mais utilizada quando se deseja, além de outras vantagens, obter grandes quantidades do polímero condutor, já que a quantidade desta não é limitada

pela área dos eletrodos utilizados na síntese eletroquímica (18, 24). A síntese química ocorre em meio ácido, da mesma forma que a eletroquímica, sob a ação de um agente oxidante, ocorrendo a precipitação do polímero na forma de um pó de elevada pureza, dopado com o ácido utilizado na síntese (16, 18, 21). Os agentes oxidantes mais utilizados são persulfato de amônio (PSA) e cloreto férrico; quanto aos ácidos dopantes, os mais comuns são as soluções de ácidos inorgânicos (HCl, H₂SO₄, HClO₄) (16, 18, 22, 23, 25, 32).

Quando os PICs do presente estudo são oxidados a partir de soluções contendo poliânions como o PSS, este promove a dispersão dos polímeros de baixa solubilidade em solventes comuns e o polímero condutor com o polieletrólito formam um emaranhado onde, nesta estrutura, as cargas positivas ao longo da cadeia são compensadas pelas cargas negativas do polieletrólito. O inconveniente da adição de PSS é que, quanto maior a percentagem deste oxidante na dispersão, menor é a sua condutividade. (16, 25, 46, 47, 48).

Vários fatores da reação como pH do meio, tipo de ácido empregado, razão agente oxidante/monômero, temperatura, tempo de reação e velocidade de agitação influenciam o rendimento, a estrutura, a condutividade elétrica e as propriedades do produto final obtido (19) (Figura 4).

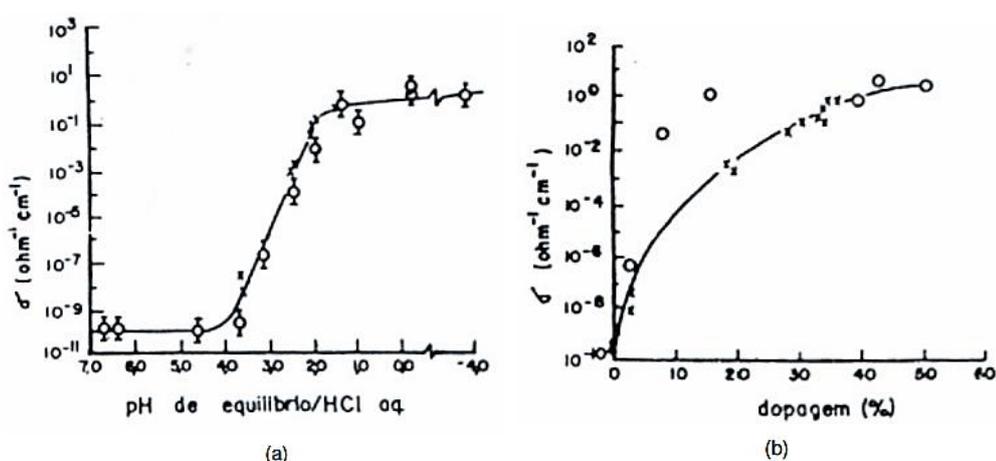


Figura 4: (a) dependência entre o pH do meio em relação à condutividade elétrica da PANi e (b) variação de percentagem de dopagem em relação à condutividade elétrica da PANi (19).

As generalidades do procedimento eletroquímico são similares aos polímeros condutores consistindo em um fluxo de corrente anódica que passa através de uma solução que contém o monômero, o solvente e o eletrólito suporte. Através deste processo que pode ocorrer em meio aquoso ou não e em atmosfera inerte, é formado um filme polimérico condutor aderido diretamente no eletrodo de trabalho e as propriedades físicas e químicas do filme podem ser controladas pelo ajuste dos parâmetros da eletrossíntese (22, 23, 25, 32).

3.2 Polianilina

O grande interesse tecnológico que envolve a polianilina (PAni) e suas variáveis, está nas atrativas características do material, como processabilidade, estabilidade química em condições ambientais, boa reversibilidade redox, facilidade de polimerização e dopagem, baixo custo do monômero, alto rendimento, etc. Propriedades estas que tornam a polianilina um dos polímeros condutores mais estudados nos últimos 100 anos (14,16,17).

Na verdade, o termo polianilina se refere a uma classe de polímeros, que consiste de mil ou mais unidades repetitivas, partindo da estrutura básica, não dopada, dada pela fórmula geral apresentada na Figura 5 (16,17,18).

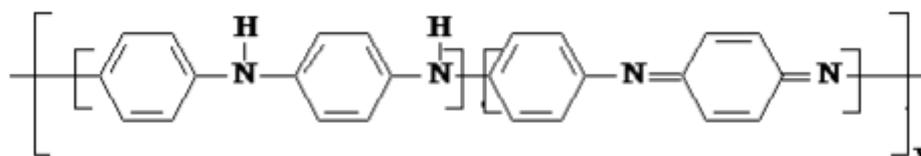


Figura 5: Estrutura química da polianilina (17).

As propriedades dos polímeros derivados desta fórmula podem variar dependendo de dois fatores: grau de oxidação e grau de protonação do polímero (19,16). Os três estados de oxidação mais importantes da PAni são

leucoesmeraldina (amarela), esmeraldina (a base é azul e o sal é verde) e pernigranilina (púrpura), conforme ilustrado na Figura 6 (20). Entretanto, a base esmeraldina, que é a forma não oxidada da polianilina, é isolante; somente quando reage com ácido, sendo convertida para sal esmeraldina, que é a forma condutora (16,20).

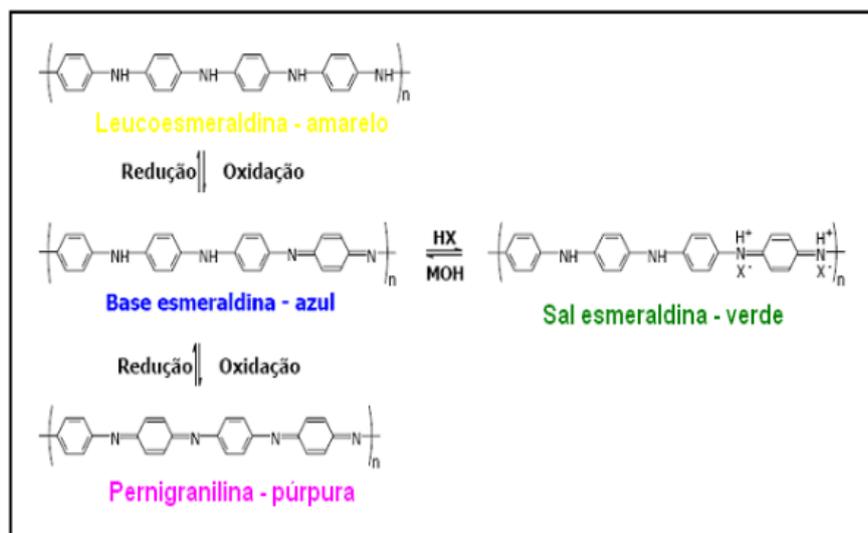


Figura 6: Estados de oxidação da polianilina (20).

A PAni apresenta certa estabilidade térmica, permitindo seu processamento através de uma variedade de técnicas, como formação de filmes por solução, filme-gel, filmes depositados por via eletroquímica, fiação por solução, polimerização química *in situ*, blendas poliméricas com polímeros convencionais, etc. , vantagem esta que a destaca entre os polímeros intrinsecamente condutores. Deste modo, de acordo com o tipo de síntese empregada e suas condições, o produto final apresentará propriedades diferentes (16, 18,).

3.3 Polipirrol

O polipirrol (PPI) é um dos polímeros intrinsecamente condutores mais conhecidos e alvo de muitos estudos, já que apresenta favoráveis propriedades

físicas, ópticas, elétricas, resistência à oxidação e excelente estabilidade química e ambiental. Além disso, comparativamente aos outros PICs, o PPI pode ser oxidado a baixos potenciais, possui síntese relativamente simples em meios aquosos ou orgânicos, e pode ser feita por via química ou eletroquímica, tornando este polímero potencial para diversas aplicações (22, 23, 25, 28).

A condução elétrica do polipirrol, a partir da sua estrutura neutra (Figura 7) depende de seu estado dopado, que cria bandas parcialmente cheias por meio das quais os elétrons livres conduzem a eletricidade (26). A capacidade que o PPI tem de incorporar diferentes ânions na sua estrutura polimérica durante o processo de polimerização afeta diretamente propriedades como adesão, condutividade, morfologia, resistência mecânica e atividade química (27), conferindo também seletividade ao íon dopante o que possibilita o uso deste material para a construção de eletrodos íon-seletivos às espécies incorporadas.

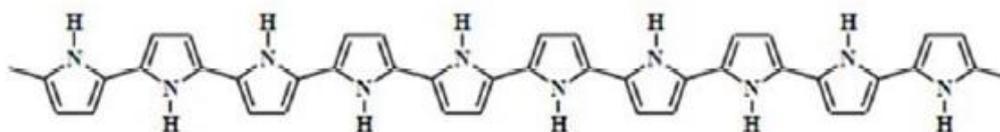


Figura 7: Estrutura neutra do polipirrol (25).

Os dopantes são apenas inseridos entre as cadeias poliméricas, não fazendo parte da estrutura, o que permite serem removidos através de um certo potencial elétrico, tornando a dopagem um processo reversível. Para o polipirrol, a forma oxidada torna-se condutora, enquanto a sua forma reduzida tem caráter isolante, como é observado na Figura 8 (22, 25).

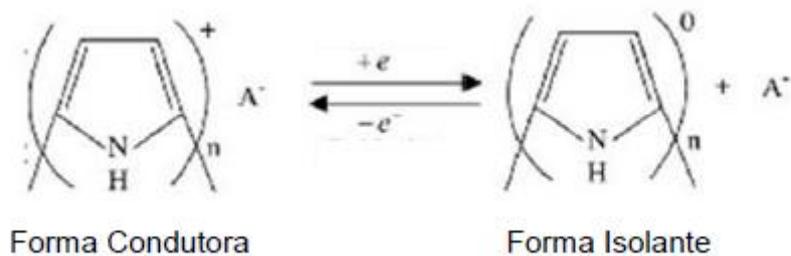


Figura 8: Polipirrol em estrutura na forma condutora e isolante respectivamente (25).

O PPI pode ser obtido como produto final em forma de pó preto insolúvel e infusível, devido as interações inter e intramolecular e também pela formação de ligações cruzadas, ou em forma de filme. Suas características intrínsecas permitem aplicações em dispositivos eletrônicos, baterias, capacitores, músculos artificiais, sensores, biossensores entre outros (25, 29, 30, 31).

3.4 PEDOT

Dentre a importante classe de polímeros intrinsecamente condutores, o PEDOT (Poli (3,4-etilenodioxitiofeno)) (Figura 9) apresenta-se como um polímero muito promissor na área de materiais eletroativos, pois combina baixo potencial de oxidação com boa estabilidade química tanto no estado oxidado como no reduzido e alta transparência em filmes finos em seu estado oxidado (34, 35, 36).

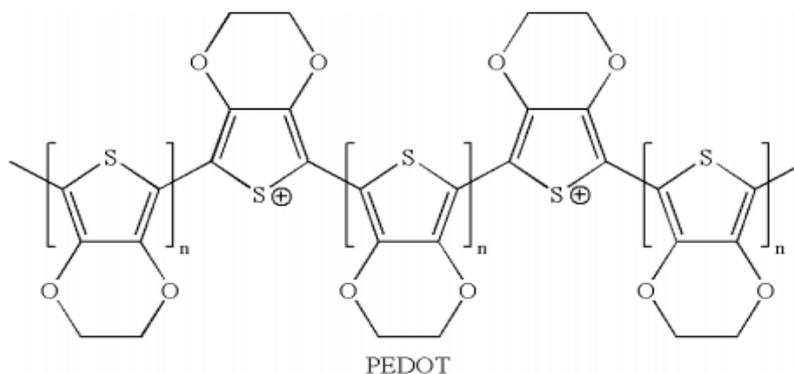


Figura 9: Representação esquemática da estrutura de PEDOT (36).

Embora o monómero EDOT não seja solúvel em água, quando combinado com poli(4-estirenosulfonato) ou PSS como contra-íon formam uma dispersão estável podendo o polímero ser produzido a uma escala industrial utilizando diferentes técnicas de polimerização (36).

Além das características como elevada condutividade, resistência à corrosão, transparência, estabilidade a altas temperaturas, entre outras características comuns aos PICs, o PEDOT possui também fácil processabilidade, permitindo a este polímero uma projeção a nível industrial, com enorme prospecção da aplicação deste em materiais em dispositivos eletrônicos, biossensores, filmes finos, células solares, dispositivos que requerem transparência e condutividade, entre outros domínios alternativos (33, 35, 36).

3.5 Biossensores

Nos últimos anos, os biossensores têm chamado a atenção de vários pesquisadores e estudiosos devido à possibilidade de aplicação em praticamente todas as áreas científicas, como diagnóstico, biotecnologia, indústria alimentícia, engenharia genética, para detecção de doenças entre outros (16, 37). Um biossensor é um dispositivo ao qual se incorpora uma substância - uma enzima, um anticorpo, uma proteína, DNA, etc. para poder medir de modo seletivo determinadas substâncias - transformando a informação química, que varia de acordo com a concentração de um componente da amostra a ser analisada, em um sinal elétrico quantificável (16, 25, 37, 38, 39).

Vários componentes biológicos são elementos potenciais a serem usados em sistemas de biossensores, entre eles as enzimas que são muito atraentes devido à variedade de produtos de reação mensuráveis no processo catalítico. Outro componente biológico muito utilizado em biossensores são os anticorpos que são funcionalmente definidos pelo antígeno com o qual reagem. O uso de anticorpos como elemento de reconhecimento (imunossensores) se

baseia na alta sensibilidade e especificidade das interações antígeno/anticorpo. Além destes, existem os receptores que são proteínas muito usadas em biossensores para a detecção de drogas e toxinas entre outros componentes biológicos (16, 25, 38, 39, 40).

O sistema de transdução tem o objetivo de converter o estímulo biológico resultante da interação do biocomponente em um sinal digital ou elétrico que pode ser quantificado e pré-produzido para posterior análise. Essa transdução pode ser de forma elétrica, eletroquímica, óptica, térmica, magnética, amperométrica, condutimétrica entre outras formas possíveis para aplicação em biossensores (16, 25, 39, 41).

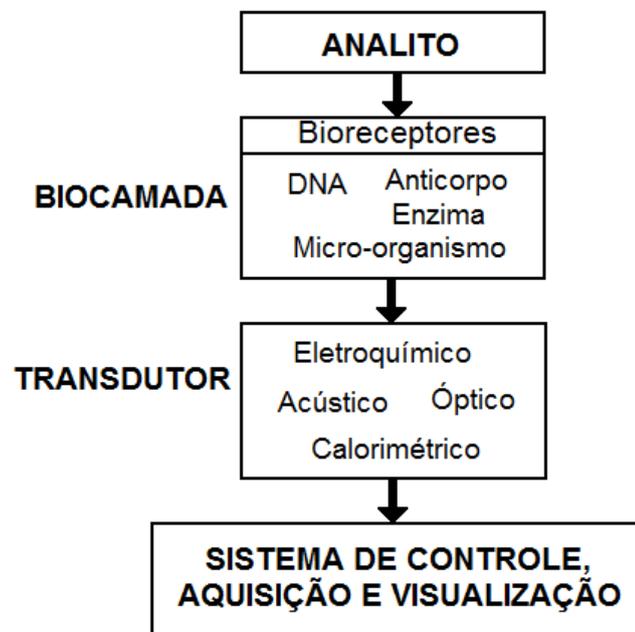


Figura 10: Esquema da composição de um biossensor (38).

3.5.1 Biossensor para hepatite

Estudos feitos por pesquisadores mostram uma linha de raciocínio para a montagem de biossensores destinados à detecção do vírus da hepatite B

(HBV), que é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (42).

Trindade, E.K.G, (42) desenvolveu um imunossensor para detecção do anticorpo (anti-HBc) por meio da imobilização do antígeno do HBc (HBcAg), utilizando um eletrodo de ouro nanoestruturado formado por nanotubos de carbono carboxilados e politiramina. As caracterizações foram realizadas por voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada. A faixa linear de resposta foi de 1,0 a 5,0 ng/mL, com limite inferior de detecção de 0,1ng/mL, mostrando grande sensibilidade para o anticorpo (42). A estratégia utilizada por Trindade, E.K.G foi utilizar o polímero politiramina como transdutor e o aminoácido Glicina como biorreceptor, promovendo o bloqueio do antígeno. Nas análises, o anticorpo foi preparado com PBS pH 7,4.

Em outro estudo (Alipour, E., Ghourchian, H., Boutorabi, S. M), nanopartículas de ouro foram utilizadas para elevar a sensibilidade do biossensor e o antígeno foi estabilizado na camada de nanopartículas de ouro. Neste estudo uma estrutura eletrodo-ligante-anticorpo foi preparada através de eletrodos de ouro com as superfícies cobertas com uma camada isolante de 3-etilenoglicol-alcanotóis com os grupos funcionais carboxilo na extremidade como superfície imobilizadora. Em seguida, o anti-HBsAg(anticorpo) primário foi imobilizado nesta camada e na sequência fez-se a adição de HBsAg (antígeno). Além disso, a fim de melhorar a eletroatividade, nanopartículas de ouro foram ligadas a um anticorpo secundário do eletrólito que serviu como solução de análise. Com esta estratégia o sensor é capaz de detectar, pelo menos, 10ng/mL de antígeno da hepatite B.

Neste trabalho, tiras sensoras comerciais foram utilizadas, em vez de eletrodos de ouro, e os transdutores escolhido são três polímeros condutores diferentes - polianilina, polipirrol, PEDOT . Como biorreceptor e bloqueador do antígeno é utilizado a enzima HRPO. O esquema de bloqueio de antígeno segue o mesmo raciocínio de Trindade, E.K.G. Já a estrutura layer-by-layer é utilizada, da mesma forma que os estudos de Trindade, E.K.G e Alipour, E. etal.

O sistema de detecção do anticorpo ocorre da seguinte forma. Como a enzima HRP é aplicada sobre o antígeno, essa fica bloqueada pela ligação antígeno-anticorpo não conseguindo fazer a reação de oxidação do H_2O_2 presente na solução de análise juntamente com o anticorpo, simulando o que ocorre no sangue. Sendo assim, quanto mais anticorpo presente na solução, mais ligação antígeno-anticorpo ocorrerá e menor será o sinal emitido. Da mesma forma ocorre o contrário: quanto menos anticorpo na solução, mais enzima ficará livre para oxidar o H_2O_2 e assim gerar um sinal maior, da detecção da doença.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Para a síntese da polianilina / PSS 20% foram utilizados anilina (Synth) previamente destilada e armazenada sob refrigeração, poliestireno sulfonado (PSS – Sigma, Mw = 1.000,000 g/mol, 20% em massa, solução em água), ácido clorídrico (HCl – Nuclear) e persulfato de amônio ((NH₄)₂S₂O₈ – Synth) como agente oxidante.

Na síntese do polipirrol / PSS 20% utilizou-se o monômero pirrol 99% P.A. (Acros), também previamente destilado e armazenado em ambiente refrigerado, poliestireno sulfonado (PSS - Sigma, Mw = 1.000,000 g/mol, 20% em massa, solução em água), persulfato de amônio ((NH₄)₂S₂O₈ – Synth) e água destilada.

A síntese do PEDOT / PSS 18% requereu EDOT (3,4 – Etilenodioxitiofeno) líquido (Aldrich), poliestireno sulfonado (PSS - Aldrich, 18% em massa, solução em água), persulfato de amônio ((NH₄)₂S₂O₈ – Synth) e sulfato de ferro III (Fe₂(SO₄)₃ - Vetec) como agentes oxidantes e água destilada. Foi utilizado ainda o polímero comercial PEDOT - Aldrich, para comparação dos resultados entre o PEDOT sintetizado e o PEDOT:PSS comercial.

Para a purificação das soluções foram utilizadas membranas de diálise (Fisherbrand, MWCO de 12.000 – 14.000).

A enzima de estudo foi a *Horseradish Peroxidase* (HRP) Tipo VI (Sigma, ~250-330 U/mg) e as tiras sensoras foram obtidas com a empresa GSI Technology. Para a preparação das soluções de análise foi necessário cloreto de potássio (KCl Neon), ferricianeto de potássio (K₃Fe(CN)₆ Sigma), água destilada, fosfato monossódico (NaH₂PO₄ Neon), hidróxido de sódio (NaOH Dinâmica química contemporânea Ltda) para ajuste de pH = 6,0, peróxido de

hidrogênio (H_2O_2 35% - Neon) e antígeno HBcAg AH-39 (antígeno para conjugação com anticorpo da hepatite) disponibilizados pela empresa FK Bioquímica.

4.2 Síntese dos polímeros

Para a produção da polianilina dopada com PSS, anilina 0,33M foi dissolvida em solução HCl 1M da mesma forma que o $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 0,1M foi solubilizado em solução HCl com PSS 1M. As duas soluções foram misturadas rapidamente e a solução final foi mantida sob agitação lenta magnética por 1 hora (16).

A síntese do polipirrol foi realizada em reator de 2L de capacidade com agitação mecânica e resfriamento controlados. Foi dissolvido PSS 20% em água destilada e na sequência foi adicionado o monômero pirrol 0,3M que permaneceu homogeneizando por 10 minutos. Através de funil de adição, uma solução de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 0,05M dissolvido em água destilada é adicionada gota – a – gota para dentro do reator. A síntese tem duração de 10 horas (25).

Para efetuar a polimerização oxidativa do EDOT, foi adicionado a um becker de 200ml água destilada, PSS 18% e o monômero EDOT 0,028M . Foi deixado essa solução homogeneizar em agitador magnético durante 10 minutos e em seguida adicionou-se $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 7,9mg e $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 0,056M. A reação teve duração de 24 horas à temperatura ambiente.

Após o término das reações, fez-se a diálise por membrana em água destilada para purificação da solução por aproximadamente 24 horas, a fim de eliminar o excesso de HCl, oxidante que não reagiu e oligômeros.

4.3 Caracterização dos polímeros

Os polímeros foram caracterizados através condutividade elétrica, voltametria cíclica, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV)

4.3.1 Condutividade Elétrica

A condutividade elétrica foi medida com as amostras em forma de pastilha através do método padrão das quatro pontas em um equipamento Cascade Microtech CS 4-64, associado a uma fonte Keithley 227 e também a um nanovoltímetro Keithley 2182A. O método é baseado na aplicação de corrente elétrica nos terminais externos e na medição do potencial nos terminais internos.

4.3.2 Voltametria Cíclica

Esta é uma técnica utilizada para caracterizar as propriedades redox do material, além de fornecer informações quanto a estabilidade, reversibilidade do sistema e indicar se o material está de fato condutor (16, 25). A técnica consiste no varredura de potenciais de um eletrodo de trabalho; o potencial é variado continuamente com o tempo e registra a ocorrência de reações de oxidação e redução do material. O potencial aplicado entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência pode ser considerado um sinal de excitação e a corrente resultante pode ser identificada como um sinal de resposta, sendo assim possível a construção de um voltamograma (16, 25, 45).

Os ensaios foram realizados em um potenciostato Autolab PGSTAT 302, com utilização do software GPES. As medidas foram feitas diretamente no sensor onde continha, no eletrodo de trabalho, a amostra do polímero em pó. A eletroatividade dos polímeros foi testada em dois eletrólitos, soluções tampão fosfato salino (PBS) pH = 6 com e sem o mediador ferricianeto de potássio

para avaliar a necessidade de amplificar a eletroatividade do sistema. Essas soluções foram preparadas dissolvendo NaH_2PO_4 em água destilada, ajustando-se o pH com NaOH 1M. Após, dissolveu KCl 0,1M e ferricianeto de potássio 5mM (44). Para a solução de análise comparativa, seguiu este mesmo procedimento, porém sem a adição de ferricianeto de potássio. A velocidade de varredura testada foi de 50mV/s e o potencial inicial e final ciclado foi de -0,4V.

Para promover o contato elétrico com o potenciostato, foi utilizado um cabo de USB de forma que cada eletrodo do sensor estivesse em contato elétrico com o dispositivo USB, conforme Figura 11.



Figura 11: Sistema utilizado para os testes de voltametria cíclica

4.3.3 FT-IR

As análises por espectroscopia de infravermelho (FT-IR) são realizadas com o objetivo de obter informações sobre o estado de oxidação dos polímeros e a interação entre o agente dopante e a cadeia polimérica. Para esta análise

foram utilizadas pastilhas dos polímeros com KBr, sendo que os materiais foram previamente secos e moídos para a confecção destas. Foi usado um espectrofotômetro FTIR Perkin Elmer modelo Spectrum 1000.

4.3.4 MEV

Para esta análise, uma alíquota de cada polímero em forma de pó foi aplicada sobre uma fita adesiva de carbono, que por sua vez, cobre os suportes de amostra, chamados *stubs*. Com este método é possível analisar a morfologia das amostras e a formação de nanoestruturas através do microscópio JEOL JSM 6060.

4.4 Construção e caracterização dos biossensores

Sintetizados os polímeros deu-se início ao desenvolvimento do protótipo (Figura 12) aplicando 1 uL de polímero condutor sobre o eletrodo de trabalho das tiras sensores, e deixando secar à temperatura ambiente por 12 horas. Após foi aplicado sobre o polímero 1 uL de antígeno HBcAg AH-39 (antígeno para conjugação com anticorpo da hepatite), e deixado secar a 4°C por mais 12 horas. Em seguida foi aplicado 1 uL de enzima *Horseradish Peroxidase* (HRPO) na concentração de 4 U/ uL e deixado secar a 4°C por 4 horas. Foi ainda construído um protótipo com o polímero PEDOT:PSS comercial nas mesmas condições.

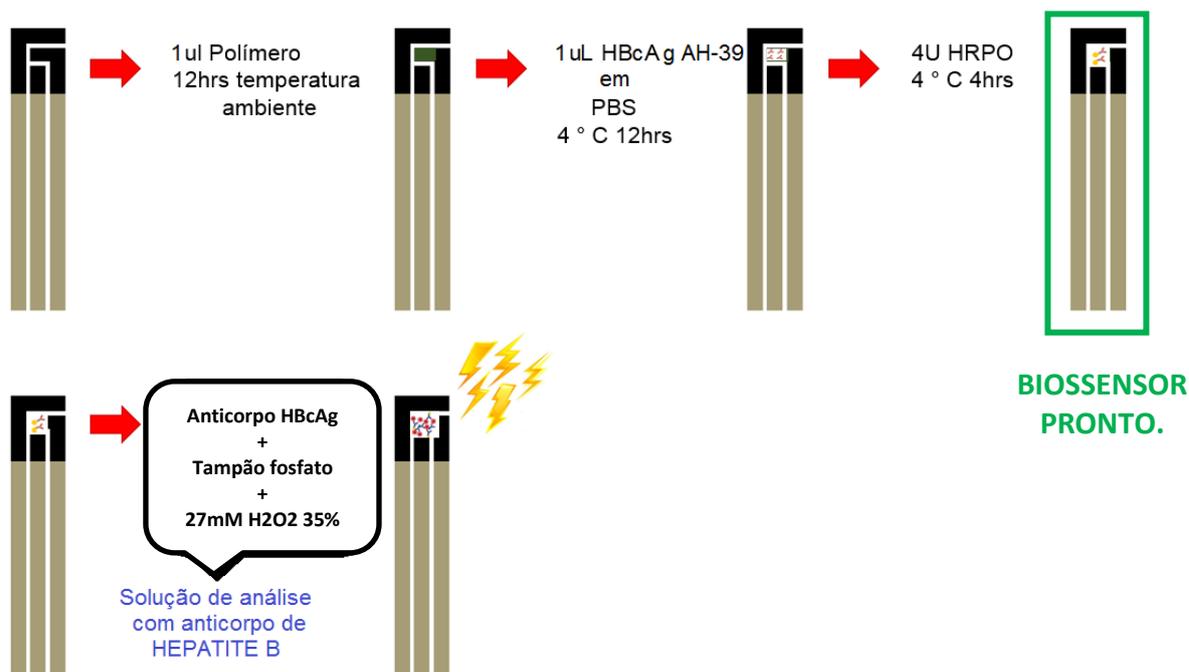


Figura 12: Protótipo de sensor de hepatite com as diferentes etapas de adição de reagentes até sua completa construção.

O comportamento eletroquímico do biossensor e a formação das ligações entre antígeno e anticorpo foram avaliadas através de ensaios de voltametria cíclica. A presença do anticorpo na solução de análise, faz com que esse se ligue ao antígeno dificultando a oxidação do peróxido de hidrogênio pela enzima HRPO. Quanto maior a quantidade de anticorpo disponível na solução de análise para se ligar ao antígeno, mais enzima HRPO fica bloqueada para reação com peróxido de hidrogênio. Sendo assim, a análise de uma amostra sem a presença de anticorpos deve produzir alta eletroatividade; se for uma amostra com pequena quantidade de anticorpo deve produzir uma eletroatividade intermediária e a análise de uma amostra com grande quantidade de anticorpos presentes deve produzir a menor eletroatividade.

O eletrólito utilizado foi tampão fosfato de sódio pH 6 contendo cloreto de potássio (KCl) 0,1M, com ou sem adição de ferricianeto de potássio ($K_3Fe(CN)_6$) 5mM, de acordo com a melhor resposta do polímero referente à sua eletroatividade no meio e 27mM de peróxido de hidrogênio 35%. Além disso, foi variado entre zero a 1 $\mu\text{g/mL}$ as concentrações de anticorpo HBsAg adicionadas na solução de análise.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão que serão apresentados a seguir foram separados em duas partes principais: caracterização dos polímeros e caracterização do biossensor.

5.1 Caracterização dos polímeros

5.1.1 Condutividade elétrica

A condutividade elétrica dos polímeros condutores é fator importante para seu uso como transdutores em biossensores, pois os mesmos possuem a capacidade de reagir às mudanças ocorridas na reação do substrato através do transporte de elétrons para produzirem um sinal elétrico.

Os ensaios foram realizados em triplicata e para cada pastilha, dez valores de corrente foram aplicados. Os resultados do ensaio de condutividade pelo método 4 pontas estão listados na Tabela 1, representando a média dos valores obtidos.

Tabela 1: Condutividade elétrica dos polímeros (sintetizados e comercial) pelo método 4 pontas.

| Amostra | Condutividade (S/cm) |
|---------------------|-----------------------|
| PPI / PSS 20% | $5,76 \times 10^{-4}$ |
| PAni / PSS 20% | $1,02 \times 10^{-3}$ |
| PEDOT / PSS 18% | $1,21 \times 10^{-3}$ |
| PEDOT:PSS comercial | $5,57 \times 10^{-4}$ |

Analisando a Tabela 1, observa-se que os polímeros sintetizados apresentam valores baixos de condutividade, indicando pequeno transporte de elétrons. Como dito anteriormente, a adição de um polieletrólito na síntese estabiliza os portadores de carga pela dopagem e forma uma matriz isolante na qual consta o polímero. Sendo assim, a adição de PSS eleva a quantidade de regiões isolantes (matriz), diminuindo a condutividade.

5.1.2 Voltametria Cíclica

Foi realizada voltametria cíclica de cada polímero condutor sintetizado, depositado sobre o sensor, em triplicata. Os eletrólitos utilizados foram uma solução tampão fosfato (PBS) pH = 6 contendo cloreto de potássio (KCl) 0,1M e a título de comparação da influência do meio na eletroatividade do sistema, utilizou solução tampão fosfato (PBS) contendo cloreto de potássio (KCl) 0,1M com adição de ferricianeto de potássio ($K_3Fe(CN)_6$) 5mM.

Os voltamogramas apresentados pelas figuras 13, 14, 15 e 16 ilustram o desenvolvimento das reações para cada polímero sobre o eletrodo de trabalho nas duas soluções de análise, em comparação com e sem o uso do mediador.

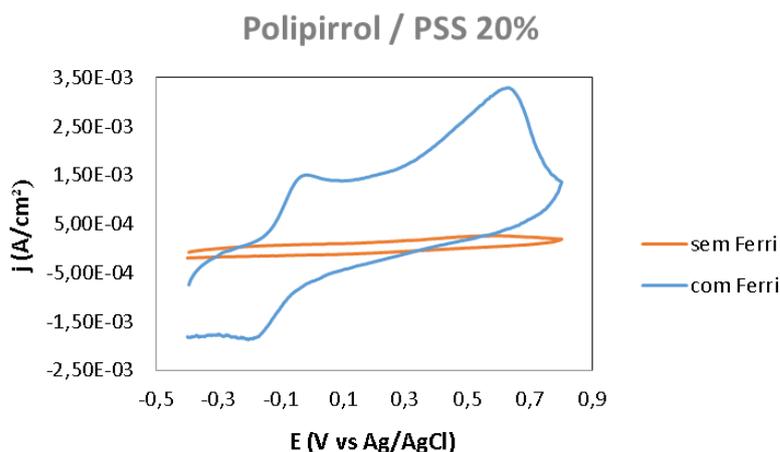


Figura 13: Voltametria cíclicas das amostras de Polipirrol/PSS em solução tampão fosfato pH 6 com KCl e $K_3Fe(CN)_6$ (ferri), e sem ferri. Velocidade de varredura: 50 mV/s.

Na Figura 13, pode-se perceber que o Polipirrol/PSS apresenta um aumento considerável na eletroatividade do voltamograma com a adição de ferricianeto de potássio ao meio de análise, em comparação ao voltamograma sem a adição do mediador, o que permite verificar com clareza os picos anódico e catódico do polímero e o pico anódico do mediador.

A partir desta consideração, é feita a escolha da solução que faz uso do mediador, mostrando ser a mais adequada para este polímero, garantindo um melhor desempenho do mesmo para as etapas posteriores na construção do biossensor.

A polianilina/PSS (Figura 14) mostrou um comportamento inesperado para o eletrodo sem ferricianeto, apresentando apenas um pico anódico sem a presença do pico catódico.

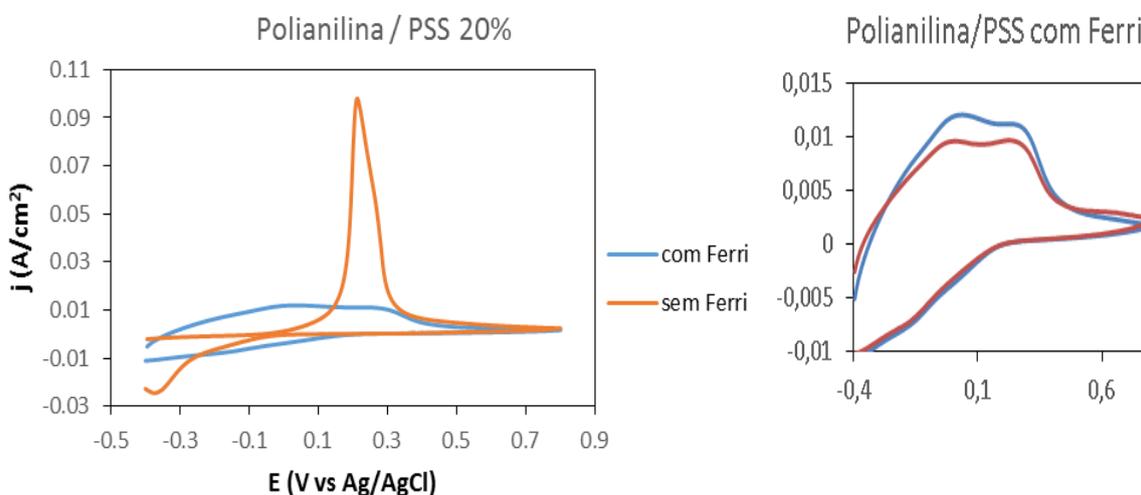


Figura 14: Voltametria cíclicas das amostras de Polianilina/PSS em solução tampão fosfato pH 6 com KCl e $K_3Fe(CN)_6$ (ferri), e sem ferri. Velocidade de varredura: 50 mV/s e aproximação da curva da Polianilina/PSS com Ferri, respectivamente.

Analisando a Figura 14 é possível notar que a curva representando a reação por meio do eletrólito com adição de ferri, os picos anódicos e catódicos, apesar de aparecerem com baixa intensidade, estão presentes.

Com base nestes resultados, da mesma forma que para o Polipirrol/PSS, a solução escolhida para a realização das etapas de caracterização do biossensor, foi a que utiliza o mediador ferricianeto.

Já os eletrodos recobertos com PEDOT/PSS apresentaram eletroatividade semelhante, exceto para o pico anódico presente somente na curva com o mediador, para os voltamogramas com e sem ferricianeto no meio de análise, como ilustra a Figura 15.

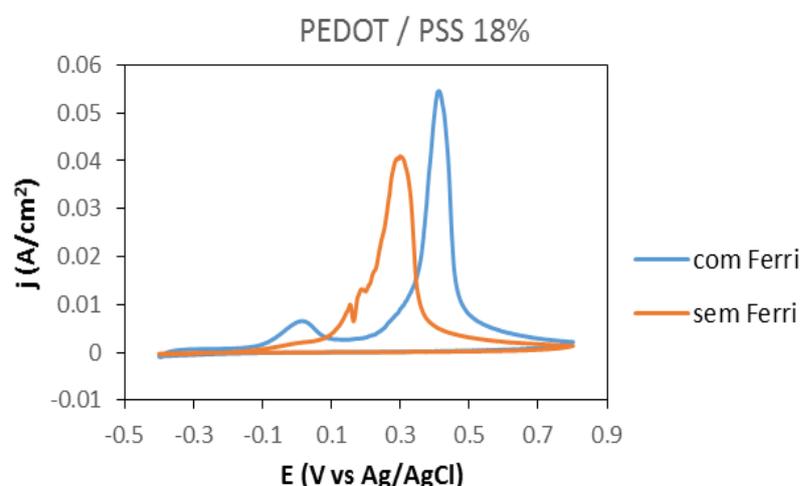


Figura 15: Voltametria cíclicas das amostras de PEDOT/ PSS em solução tampão fosfato pH 6 com KCl e $K_3Fe(CN)_6$ (ferri), e sem ferri. Velocidade de varredura: 50 mV/s.

O pico anódico produzido para a amostra com ferricianeto foi um pouco mais intenso que o pico anódico para a amostra analisada sem a presença de ferricianeto, indicando que a presença do mediador não produz um ganho satisfatório que justifique o seu uso. Sendo assim, a solução escolhida para as etapas seguintes é a sem adição de ferri.

Para o ensaio de voltametria cíclica com o polímero comercial PEDOT:PSS um par redox é visto somente no voltamograma com a presença do mediador no meio de análise (Figura 16), indicando a sua utilização, já a curva sem ferri não apresenta picos anódicos e catódicos.

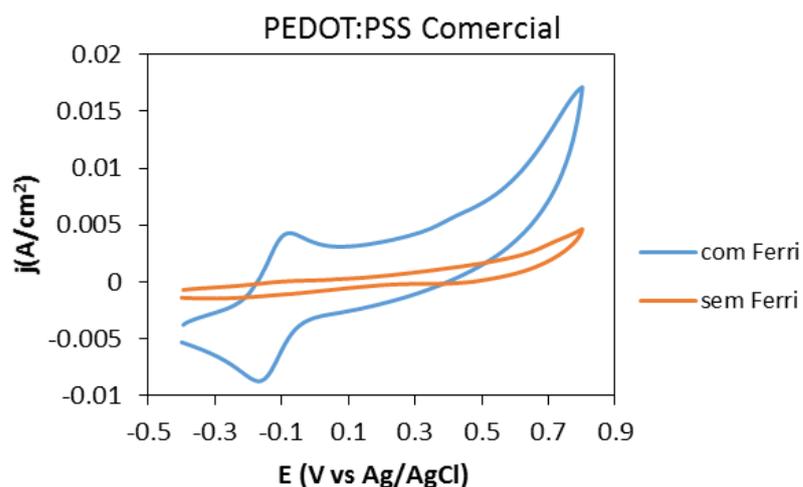


Figura 16: Voltametria cíclicas das amostras de PEDOT:PSS Comercial em solução tampão fosfato pH 6 com KCl e $K_3Fe(CN)_6$ (ferri), e sem ferri. Velocidade de varredura: 50 mV/s.

5.1.3 FT-IR

O espectro de infravermelho dos polímeros sintetizados pode ser visualizado na Figura 17. O intervalo de comprimento de onda foi de 4000 a 400 cm^{-1} , entretanto somente será apresentado o intervalo de comprimento de onda de 1800 a 900 cm^{-1} , onde pode-se constatar as bandas características dos polímeros estudados.

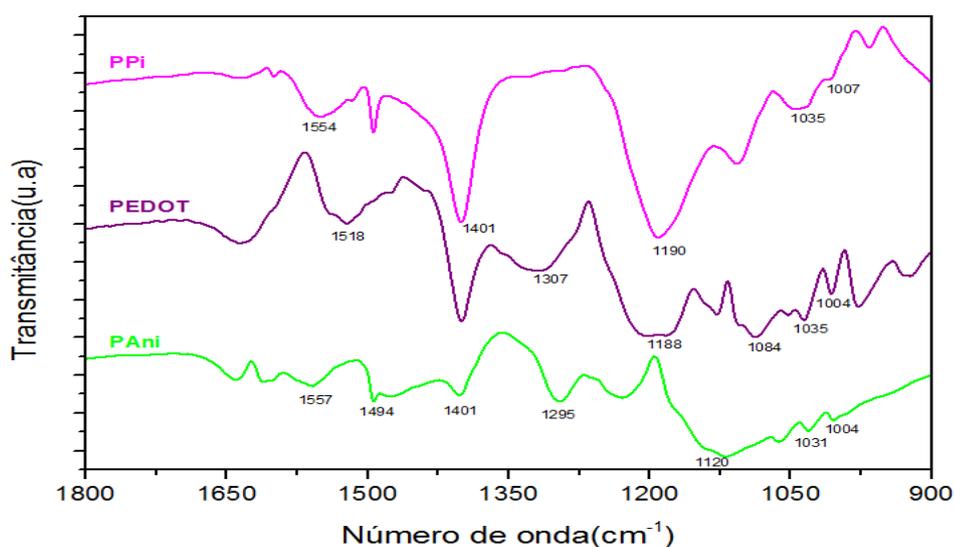


Figura 17: Espectroscopia de infravermelho para PPI/PSS 20%, PAni/PSS 20% e PEDOT/PSS 20%

Através da análise dos espectros de transmitância dos polímeros com PSS foram identificadas duas bandas reduzidas em 1035 e 1004 cm^{-1} , características do PSS, que são atribuídas às vibrações no plano e ao estiramento assimétrico dos grupos SO_3^- , respectivamente (50). Acredita-se que essa extensão seja devido à alta massa molar do PSS, que acaba por mascarar a verdadeira intensidade das bandas.

Nos espectros da PANi, observa-se que as bandas em torno de 1560 e 1490 cm^{-1} apresentam intensidades próximas, com a banda em torno de 1490 cm^{-1} um pouco mais intensas. A banda 1401 e 1295 cm^{-1} estão relacionadas ao estiramento das ligações C=N e C-N da cadeia. Este fato indica que o polímero está parcialmente oxidado e parcialmente reduzido, o que está de acordo com o esperado, tendo em vista que a PANi foi sintetizada em meio ácido na sua forma condutora sal esmeraldina.

O PPI apresenta bandas características em 1554 e 1401 cm^{-1} que são atribuídas às vibrações de estiramento do anel do pirrol. Em 1190 cm^{-1} tem-se a banda referente à vibração do estiramento que corresponde ao polipirrol dopado.

Quanto ao espectro do PEDOT, as bandas 1518 cm^{-1} (C=C), 1307 cm^{-1} (C-C) são referentes às ligações do anel tiofênico, enquanto que as bandas em 1188 e 1084 cm^{-1} são referentes ao estiramento da ligação C-O-C do grupo dioxietileno.

Desta forma, pode-se afirmar que PEDOT, PPI e PANi na sua forma dopada foi sintetizada na presença de 20% em massa de PSS.

5.1.4 MEV

A análise por microscopia eletrônica de varredura foi realizada nos polímeros sintetizados na forma de pó, com a finalidade de observar a sua morfologia.

As imagens ilustradas pela Figura 18 mostram a morfologia da PANi/PSS 20%. Como pode ser visto na Figura 18-A, aglomerados de partículas foram formados dando origem a uma estrutura compacta, oferecendo menor área superficial, comparado com uma estrutura mais aberta, que por sua vez pode acabar dificultando a transferência de elétrons, e resultar em uma pior performance do sensor.

Na Figura 18-B pode-se verificar o diâmetro de algumas das partículas formadas, situadas entre 100 e 200nm. Ou seja, identifica-se a presença de nanopartículas.

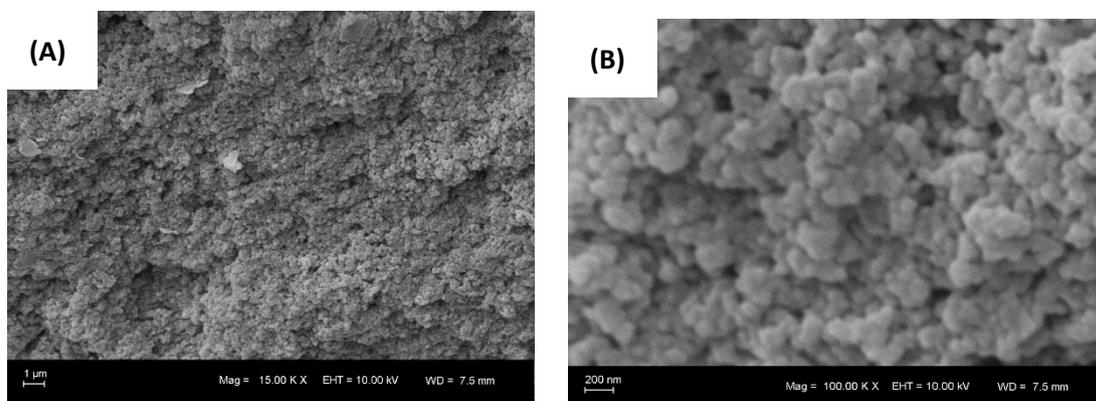


Figura 18: Micrografias MEV da amostra de PANi.

Para as imagens do PPI (Figura 19), também podem ser observados através de (A) aglomerados de nanopartículas causando a formação de micropartículas. E devido à alta compactação da microestrutura, o transporte de elétrons também pode ser dificultado e gerar um baixo sinal elétrico.

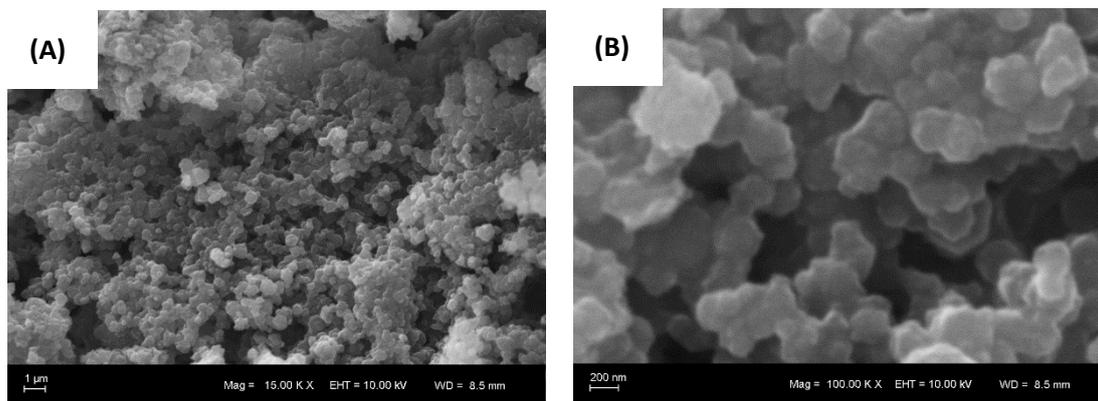


Figura 19: Micrografias MEV da amostra de PPI.

Quanto à amostra do polímero PEDOT sintetizado as imagens ilustradas pela Figura 20 mostram uma morfologia mais aberta e com maior área superficial, permitindo a transferência de elétrons de forma mais facilitada, resultando em um desempenho melhor do sensor, o qual pode oferecer maiores sinais elétricos. As formas angulosas das partículas vistas na Figura 20-B além de oferecerem maior área de contato, contribuem também na imobilização da enzima e antígeno

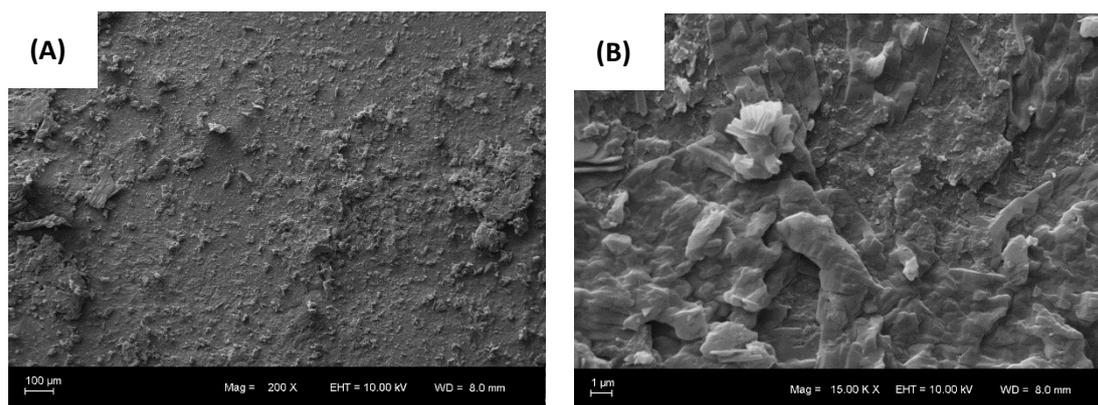


Figura 20: Micrografia MEV da amostra PEDOT sintetizado

A Figura 21 representa as imagens do PEDOT:PSS comercial. As ilustrações (A) e (B) mostram claramente um filme compacto e homogêneo, o

qual não proporciona um satisfatório fluxo de elétrons nem uma boa adesão dos componentes biológicos.

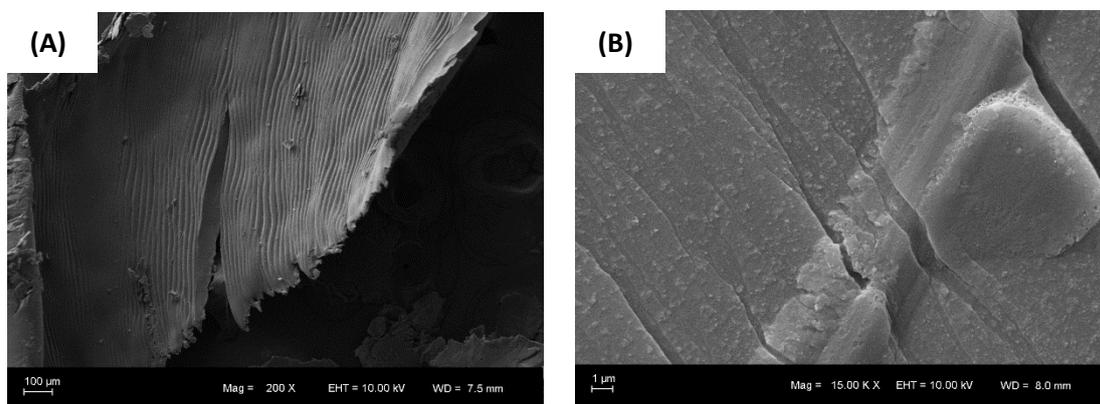


Figura 21: Micrografia MEV da amostra PEDOT:PSS comercial

5.2 Caracterização dos biossensores

Para realizar as curvas de voltametria cíclica, o eletrólito utilizado foi tampão fosfato de sódio pH 6 contendo cloreto de potássio (KCl) 0,1M, 27mM de peróxido de hidrogênio 35% para o PEDOT/PSS e para o Polipirrol/PSS, Polianilina/PSS e PEDOT:PSS comercial foi ainda adicionado ferricianeto de potássio ($K_3Fe(CN)_6$) 5mM. A concentração de anticorpo HBsAg e ferricianeto de potássio é mostrado na Tabela 2.

Tabela 2: Soluções de análise com a respectiva variação dos componentes.

| | Presença de ($K_3Fe(CN)_6$) | Anticorpo HBcAg ($\mu g/mL$) |
|------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Solução 1 | NÃO | - |
| Solução 2 | SIM | - |
| Solução 3 | NÃO | 1 |
| Solução 4 | SIM | 1 |
| Solução 5 | NÃO | 0,5 |
| Solução 6 | SIM | 0,5 |

Para a construção das curvas dos eletrodos foi aplicada a solução de trabalho no eletrodo e foi executada a varredura após 5 minutos. As Figuras 22, 23, 24 e 25 ilustram os resultados obtidos para os diferentes polímeros estudados.

A figura 22 mostra que a corrente no pico a aproximadamente 0,4V foi mais alta para a solução 6 (menor quantidade de anticorpo) que a solução 2 (sem anticorpo), mostrando que o sensor produzido com Polipirrol/PSS não apresentou sensibilidade na detecção do HBc.

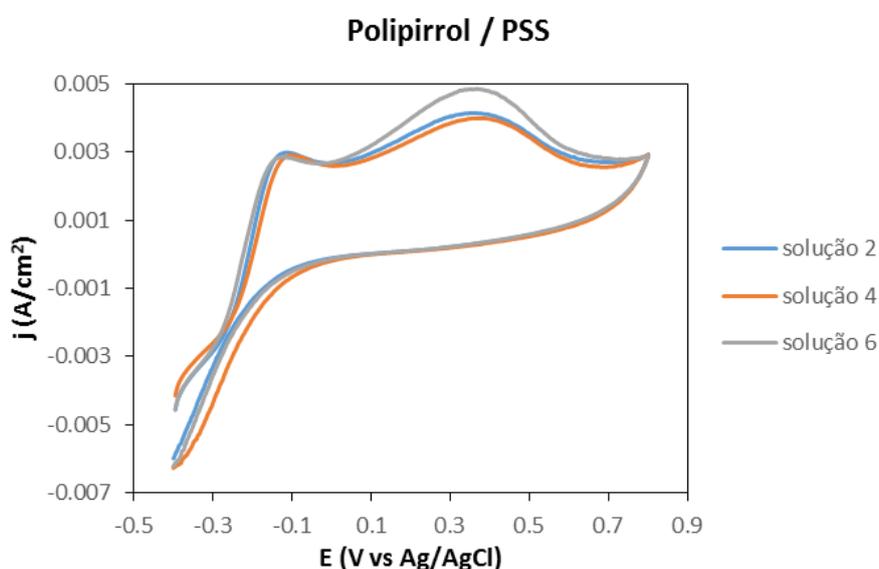


Figura 22: Voltametria cíclicas das amostras de Polipirrol/PSS/HBcAg AH-39/HRPO em solução tampão fosfato de sódio pH 6 com KCl, H₂O₂ e K₃Fe(CN)₆. Velocidade de varredura: 50 mV/s.

O comportamento da Polianilina/PSS não foi satisfatório quanto a presença das diferentes concentrações de anticorpos HBcAg na solução de análise, e ainda a eletroatividade do sistema diminuiu, como mostra a Figura 23, indicando que a camada de antígeno HBcAg AH-39 e a imobilização da HRPO podem estar atuando como isolantes para o transporte de elétrons da reação do peróxido de hidrogênio com a HRPO. O sensor sem anticorpo mostrou maior eletroatividade, enquanto o sensor com 0,5 µg/mL de anticorpo apresentou menor eletroatividade e o sensor com 1 µg/mL apresentou eletroatividade intermediária.

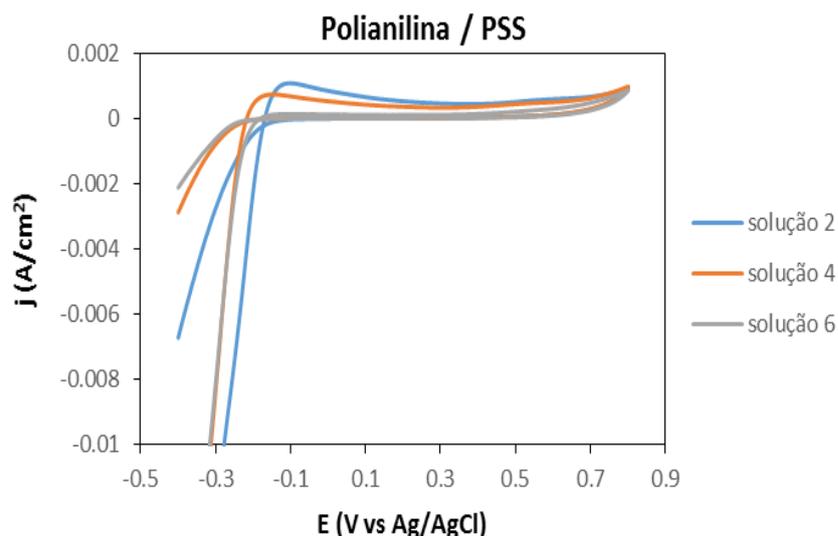


Figura 23: Voltametria cíclicas das amostras de Polianilina/PSS/HBcAg AH-39/HRPO em solução tampão fosfato de sódio pH 6 com KCl, H₂O₂ e K₃Fe(CN)₆. Velocidade de varredura: 50 mV/s.

A Figura 24 apresentou um comportamento desejado para a detecção dos anticorpos, pois as densidades de correntes e a eletroatividade foram inferiores conforme o aumento da concentração de anticorpo. Como a ligação antígeno-anticorpo atrapalha e dificulta o reconhecimento do peróxido de hidrogênio pela HRPO, detectando uma quantidade de peróxido de hidrogênio inferior a detectada pela amostra sem antígeno, o sinal gerado acaba sendo também inferior. O PEDOT/PSS apresentou-se capaz de diferenciar as concentrações de anticorpos de hepatite.

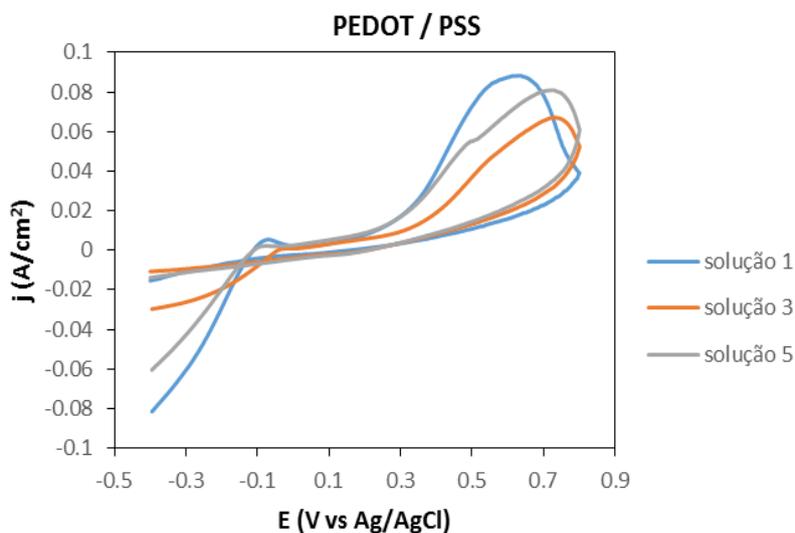


Figura 24: Voltametria cíclicas das amostras de PEDOT/PSS/HBcAg AH-39/HRPO em solução tampão fosfato de sódio pH 6 com KCl, H₂O₂. Velocidade de varredura: 50 mV/s.

O PEDOT:PSS Comercial (Figura 25) também não apresentou o comportamento desejado conforme a variação de anticorpo na solução de análise. O sensor sem anticorpo apresentou maior eletroatividade, porém o sensor não apresentou sensibilidade para detectar as diferentes quantidades de anticorpo da solução de análise, apresentando a mesma resposta eletroquímica para ambas concentrações.

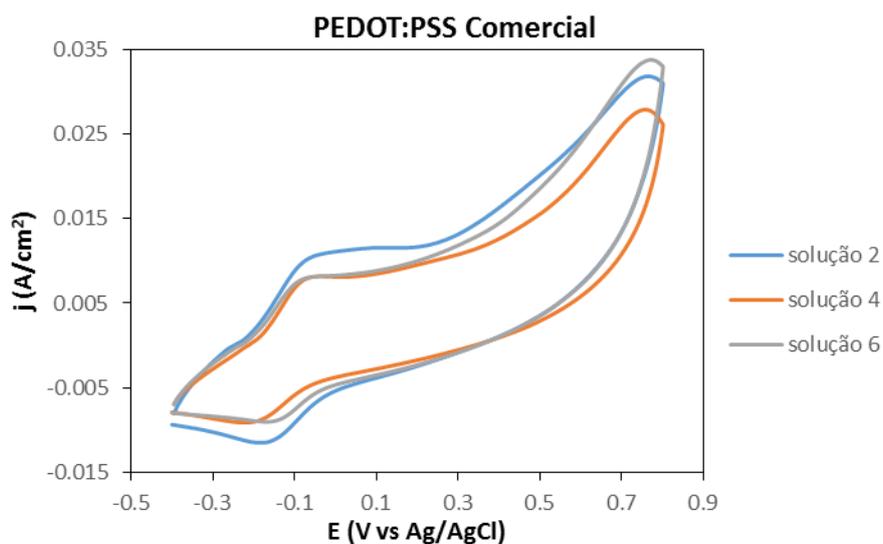


Figura 25: Voltametria cíclicas das amostras de PEDOT:PSS Comercial/HBcAg AH-39/HRPO em solução tampão fosfato de sódio pH 6 com KCl, H₂O₂ e K₃Fe(CN)₆. Velocidade de varredura: 50 mV/s.

Os resultados esperados para as voltametrias cíclicas são que com o aumento da presença de ligações antígeno-anticorpo, devido ao aumento da quantidade de anticorpos presentes nas amostras analisadas, a eletroatividade medida pela técnica de voltametria cíclica sofre um decréscimo.

6 CONCLUSÃO

Em relação à síntese, o método foi eficaz na formação dos polímeros condutores e as análises por espectroscopia infravermelho mostraram que os polímeros se encontram em um estado de oxidação parcial. A condutividade das amostras é baixa, porém os polímeros se mostraram capazes de seguir para a etapa de imobilização da enzima e atuarem como transdutores.

As amostras de PPI, PANi e PEDOT:PSS se mostraram mais eletroativas na presença do mediador ferricianeto, já o PEDOT não teve um ganho satisfatório de eletroatividade que justificasse seu uso.

A morfologia das amostras de PANi e PPI apresentou aglomerados de nanopartículas formando uma estrutura muito compacta o que dificultou o transporte de elétrons gerando um sinal elétrico baixo. Já a morfologia do PPI se mostrou mais aberta e com maior área superficial, o que facilitou a transferência de elétrons resultando em um desempenho melhor do sensor. O PEDOT:PSS apresentou estrutura extremamente compacta e homogênea.

Quanto à caracterização do biossensor, o conjunto que melhor reagiu às soluções de análise, dentre todos, foi o biossensor com PEDOT/PSS 20% que apresentou o comportamento desejado para a detecção dos anticorpos. O PEDOT/PSS é capaz de diferenciar as concentrações de anticorpos de hepatite, podendo ser utilizado para dar continuidade aos estudos e desenvolvimento do protótipo.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Testar outras concentrações de antígeno-anticorpo;
- Testar outros métodos de síntese dos polímeros;
- Testar outras formas de imobilização da enzima.
- Caracterizar PEDOT:PSS por FT-IR e comparar com os polímeros sintetizados.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moreira CS, Lima AMN, Neff H, Neto AGB, Loureiro FCCL, Filho CADS, et al. Biosensores: Tecnologia e Aplicações. Instituto Federal de Alagoas, Universidade Federal de Campina Grande, LINCS / CETENE, Instituto Federal da Paraíba, Universidade Federal da Paraíba;
2. Conitec - Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes terapêuticas para pessoas com infecções sexualmente transmissíveis [Internet]. 2016. Available at: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2015/58357/p_cdt_ist_28_04_2016_web_pdf_26946.pdf
3. Chávez JH, Campana SG, Haas P. Panorama da hepatite B no Brasil e no Estado de Santa Catarina. Rev Panam Salud Pública. 2003;14(2):91–6.
4. Augusto T. Introdução a Polímeros Condutores: Síntese e Caracterização Eletroquímica da Polianilina Introdução. Trabalho de conclusão: disciplina de preparação pedagógica. Universidade de São Paulo; 2009.
5. Faez R, Reis C, Freitas PS De, Kosima OK, Ruggeri G, Paoli M De. Polímeros Condutores. Química Nova na Escola. 2000;11:13–8.
6. Torresi RM, de Torresi SIC. Caracterização espectroeletróquímica de polímeros condutores, blendas e copolímeros - Departamento de Química Fundamental - Instituto de Química, Universidade de São Paulo.[Internet] disponível em: <http://www.iq.usp.br/rtorresi>. Acessado em 27/10/2016
7. Heraeus Group. Products and Solutions with Conductors Polymers [Internet]. Available at: <https://www.heraeus.com/en/group>. Acessado em 27/10/2016
8. Maia DJ, De Paoli MA, Alves OL, Zarbin AJG, das Neves S. Conductive polymer synthesis in solid host matrices. Quimica Nova. 2000;23:204–15.
9. Guimard, N. K.; Gomez, N.; Schmidt CE. Conducting Polymers in Biomedical Engineering. Prog Polym Sci. 2007;32:876–921.
10. Giroto EM, Paoli M A De. Transporte de Massa em Polímeros Intrinsecamente Condutores: Importância, Técnica e Modelos Teóricos. Quimica Nova. 1999;22(3):358–68.

11. Zoppi RA, De Paoli M-A. Aplicações tecnológicas de polímeros intrinsecamente condutores: Perspectivas atuais. Vol. 16, Química Nova. 1993. p. 560–8.
12. Deshpande MV, Amalnerkar DP. Biosensors prepared from electrochemically-synthesized conducting polymers. Prog Polym Sci. 1993;18:623–49.
13. Kumar D, Sharma RC. Advances in Conductive Polymers. Eur Polym J. 1998;34:1053–60.
14. Proença MP. Desenvolvimento De Membranas Íon-Seletivas Com Poliestireno Sulfonado E Polianilina Dopada Para a Aplicação Em Eletrodialise. Dissertação Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.; 2009.
15. Andrade VM de. Confeção de Biossensores através da Imobilização de Biocomponentes por Eletropolimerização de Pirrol. Dissertação Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006.
16. Hansen B. Metodologia para Produção de Biossensores Amperométricos Enzimáticos Utilizando Polímeros Condutores: Caso Polianilina. Dissertação Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2011;111.
17. Alves, WF. Preparação e caracterização mecânica, térmica e elétrica de misturas de poliuretano derivado do óleo da mamona e poli (o-metoxianilina) para avaliação na aplicação como sensores para língua eletrônica. 2010. 125 f. Tese Doutorado, Departamento de química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.
18. Mattoso LHC. Polyanilines: Synthesis, structure and properties. Química Nova. 1996;19(4):388–99.
19. Botan R. Síntese e caracterização de polianilina protonadas com diferentes ácidos protônicos funcionalizados. Dissertação Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina; 2006.
20. Filho YF. Síntese, Dopagem e Caracterização da Polianilina com Fe(II) e Fe(III). Dissertação Mestrado, Universidade Federal Do Espírito Santo. 2009.
21. De Santana AT. Polímeros condutores: Estudos e utilização de polímeros condutores. Trabalho Conclusão, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste. 2012;23.
22. Nogueira, F.A.R. Synthesis and characterization of polypyrrole derivatives for application in electrochemical devices. 2010. 95 f. Dissertação (Mestrado em Química; Biotecnologia) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2010.
23. Soares JC. Biossensores eletroquímicos fabricados a partir da

- imobilização da urease em filmes de polipirrol. Tese Doutorado, Universidade de São Paulo; 2011.
24. De Sousa RA, Araújo OA, Freitas PS, De Paoli MA. Tratamento dos Resíduos Gerados na Síntese de Polianilina em escala Pré-Piloto. *Quim Nova*. 2003;26:938–42.
 25. Hocevar MA. Desenvolvimento de Biossensores Enzimáticos Amperométricos Utilizando Nanopartículas de Polipirrol. Dissertação Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2011.
 26. Manuel O-G, Ricardo A-HJ, Tetyana K. Procesamiento de micro y nanofibras de polipirrol/óxido de polietileno/nylon-6 por la técnica de electrohilado. *Ing Investig y Tecnol [Internet]*. 2013;14(4):575–81. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1405774313722674>
 27. Júnior LR, Neto G de O, Kubota LT. Transdutores Potenciométricos a Base de Polímeros Condutores: Aplicações Analíticas. 1997;20(35):519.
 28. Marín T a, Isaza FJ, Calderón J a. Electrodeposition of Polypyrrol/Platinum Films. *Port Electrochim Acta [Internet]*. 2009;27(3):397–407. Available at: http://www.peacta.org/articles_upload/PEA_27_3_2009_397_407.pdf
 29. Arantes C, Rocco LM, Gerson A, Maria A. Dessorção Iônica e Degradação de Filmes de Polipirrol Dopado com Dodecilsulfato Induzidas por Elétrons de Alta Energia. *Química Nova*. 2008;31(1):61–5.
 30. Bello ME. Obtenção e Caracterização Eletroquímica do Compósito Polipirrol/Cobalto. Dissertação Mestrado, Universidade Federal de São Carlos; 2002.
 31. Lamy-mendes AC, Bindewald EH, Alberto M, Papi P, Marcolino-jr LH, Bergamini MF. Filmes de Polipirrol Aplicados no Desenvolvimento de Eletrodos Descartáveis Seletivos a Íons Fluoreto Polypyrrole. *Polímeros*, 2014;24:508–13.
 32. Santim RH, Sp IS. Síntese e Caracterização de Polipirrol (PPy) obtido pelo processo químico convencional e microemulsão. Dissertação Mestrado, Universidade Estadual Paulista, 2011;80.
 33. Ribeiro C da CS. Síntese e Caracterização de Polímeros Condutores com Aplicações em Células Solares. Dissertação Mestrado, Instituto Politécnico de Bragança. 2015;160.
 34. Augusto T, De Torresi SIC. Síntese química de PEDOT: PSS e caracterização eletroquímica através de filmes finos automontados por “ Layer-by-Layer ”. *Sociedade Brasileira de Química*. 2003;1.
 35. Ghanem M a, El-ghaffar M a A. Electrochemical Deposition and Characterization of Poly (3 , 4- ethylene dioxythiophene), Poly (aniline)

- and their Copolymer onto Glassy Carbon Electrodes for Potential Use in Ascorbic Acid Oxidation. *Portugaliae Electrochimica Acta*. 2010;28(5):336–48.
36. Silva A. Desenvolvimento de Materiais de Cátodo para Baterias de Ião Lítio à base de Polímeros Condutores com Dopagem Pseudo- Catiônica. *Dissertação Mestrado, Universidade de Lisboa*; 2015.
 37. Filho OF, Capelato MD. Biossensores [Internet]. Vol. 15, *Química Nova*. 1992. p. 28–39. Available at: [http://quimicanova.sbq.org.br/qn/qnol/1992/vol15n1/v15_n1_\(6\).pdf](http://quimicanova.sbq.org.br/qn/qnol/1992/vol15n1/v15_n1_(6).pdf)
 38. Biotecnologia-Biossensores [Internet]. Paraná, Secretaria da Educação do Governo do Estado. Available at: <http://www.biologia.seed.pr.gov.br/>
 39. Calil SS, Da Silva P.R.Q. Biossensores : estrutura , funcionamento e aplicabilidade. Tese de Conclusão de Pós-graduação Lato Sensu, PUC Goiás. 2011;1–20.
 40. Silva L.M.D.C. Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para fenol e uréia com foco na aplicação ambiental. Tese Doutorado, Universidade Federal do Rio Janeiro. 2011;154.
 41. Villanova JCO. Biossensores Enzimáticos. Universidade Federal de Minas gerais. 2009. [Internet] Disponível em: <http://pt.slideshare.net/janavilla/biossensores-enzimticos>.
 42. Trindade EKG. Desenvolvimento de nanoimunossensor para identificação de anticorpos contra o vírus da Hepatite B. Vol. 1, *Dissertação Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco*. 2015.
 43. Alipour, E., Ghourchian, H., Boutorabi, S. M. Gold nanoparticle based capacitive immunosensor for detection of hepatitis B surface antigen. *Analytical Methods*, 2013, 5, 4448–4453
 44. Volumetric Solutions - Buffer Solutions. *European Pharmacopoeia*. General Notices apply to all monographs and texts. page - 431.
 45. Silva MFCG. Voltametria Cíclica — Aplicações ao Estudo de Mecanismos de Reações Induzidas por Transferência Electronica. *Técnicas Experimentais*; 1998;70:20–6.
 46. De Freitas PS. Síntese da Polianilina em Escala Piloto e Seu Processamento. Tese Doutorado, Campinas Unicamp; 2000.
 47. OTERO TF, SANSINENA JM. Influence of synthesis conditions on polypyrrole-poly(styrenesulphonate) composite electroactivity. *J Electroanal Chem*. 1996;412:109 – 116.
 48. De Souza D.O.D. Propriedades optoeletrônicas de interfaces híbridas metal/semicondutor orgânico preparadas por deposição assistida por feixe de íons (IBAD). *Dissertação Mestrado, Universidade de São Paulo*; 2011.

49. Pavinatto A, Mercante LA, Correa DS. Filmes nanoestruturados contendo quitosana para aplicação como plataforma de Biossensore eletroquímico. Simpósio Nacional de Instrumentação Agropecuária. 2014;3075–7.
50. Tang Y, Pan K, Wang X, Liu C, Luo S. Enhancing Electrochemical and Electrocatalytic Activities of Polyaniline Via Co-doping with Poly(styrene sulfonate) and Gold. Journal Electroanalytical Chemistry.2010;639:123–9.