



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS**

VITOR HUGO BATISTA DE OLIVEIRA

**BIOSENSOR DE GLICOSE BASEADO NA IMOBILIZAÇÃO DA
GLICOSE OXIDASE EM NANOFIBRAS DE ÓXIDO DE ZINCO**

LONDRINA

2019

VITOR HUGO BATISTA DE OLIVEIRA

**BIOSENSOR DE GLICOSE BASEADO NA IMOBILIZAÇÃO DA
GLICOSE OXIDASE EM NANOFIBRAS DE ÓXIDO DE ZINCO**

Dissertação apresentada em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Edvani Curti Muniz.

Co-orientador: Prof. Dr. Sidney Alves Lourenço.

LONDRINA

2019

TERMO DE LICENCIAMENTO

Esta Dissertação está licenciada sob uma Licença Creative Commons *atribuição uso não-comercial/compartilhamento sob a mesma licença 4.0 Brasil*. Para ver uma cópia desta licença, visite o endereço <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/> ou envie uma carta para Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, Califórnia 94105, USA.



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

O48b Oliveira, Vitor Hugo Batista de
Biossensor de glicose baseado na imobilização da glicose oxidase em nanofibras de óxido de zinco / Vitor Hugo Batista de Oliveira. - Londrina : [s.n.], 2019.
73 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Edvani Curti Muniz
Coorientador: Prof. Dr. Sidney Alves Lourenço
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. Londrina, 2019.
Bibliografia: f. 67-73.

1. Detectores. 2. Glicose. 3. Nanocompósitos (Materiais). 4. Fibras. 5. Óxido de zinco. I. Muniz, Edvani Curti, orient. II. Lourenço, Sidney Alves, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. V. Título.

CDD: 620.11

Ficha catalográfica elaborada por Cristina Benedeti Guilhem - CRB: 9/911

BIOSENSOR DE GLICOSE BASEADO NA IMOBILIZAÇÃO DA GLICOSE OXIDASE EM NANOFIBRAS DE ÓXIDO DE ZINCO

por

VITOR HUGO BATISTA DE OLIVEIRA

Dissertação de Mestrado apresentada no dia 26 de abril de 2019, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Câmpus Londrina, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O mestrando foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos membros abaixo assinados. Após avaliação da Dissertação, a Banca Examinadora considerou a Dissertação **Aprovada**. O presente termo assinado ficará depositado na Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais – PPGCEM.

Prof(a). Dr(a). Edvani Curti Muniz - Orientador(a)
(UTFPR - Câmpus Londrina)

Prof(a). Dr(a). Daniela Martins Fernandes de Oliveira - Membro Titular
(UEM - Câmpus Maringá)

Prof(a). Dr(a). Alessandro Francisco Martins - Membro Titular
(UTFPR - Câmpus Apucarana)

Prof. Dr. Carlos Eduardo Cava

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais

**“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de
Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais”**

AGRADECIMENTOS

Ao orientador, Prof. Dr. Edvani Curti Muniz pela paciência, compreensão, suporte e conhecimento que transmitiu ao longo dos anos de sua experiência e que trabalhamos juntos.

Ao co-orientador, Prof. Dr. Sidney Alves Lourenco pela sua contribuição.

Ao Prof. Dr. Francisco Rosário por ter me concedido a oportunidade de realiza o estágio de docência.

Aos professores(a)s da Universidade Tecnológica Federal do Paraná- campus Londrina e do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPGCEM) - UTFPR-LD por ter me recebido muito bem e contribuído para o aprendizado.

A Dra. Elisângela Pacheco da Silva por estar no dia-a-dia me orientando e ensinando do decorrer do mestrado.

Aos discentes do PPGCEM e do PQU-UEM pela ajuda e contribuição durante o mestrado.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)- campus Londrina e a Universidade Estadual de Maringá (UEM) por ter concedido os espaços para desenvolver o mestrado.

Aos Laboratórios da UTFPR-LD e da UEM por me receber tão bem e sanado as dúvidas que tinha nos respectivos laboratórios.

Aos discentes do Laboratório de Materiais Poliméricos e Compósitos (GMPC)-UEM-PR pela orientação, ajuda e esclarecimento das minhas dificuldades e dúvidas.

Ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP)-UEM-PR pela utilização dos equipamentos para caracterização dos materiais desenvolvidos nesta dissertação.

Aos meus pais Nilton Santos e Fátima Lourdes, e irmã Dandara por estarem sempre ao meu lado por todos estes anos. A minha sobrinha Maria Elis.

A todas as pessoas que vem contribuindo, ajudando diretamente e indiretamente durante toda minha vida.

A CAPES e ao INOMAT que constitui um dos institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT), pela bolsa de mestrado (período 12 meses) que viabilizou a realização deste projeto.

Aos professore(a)s da banca examinadora, pela avaliação desta dissertação.

Obrigado.

Resumo

Diabetes é uma doença crônica que causa uma morte a cada 10 segundos em todo o mundo. Diante desse cenário, nanofibras de óxido de zinco (ZnO) foram sintetizadas pela técnica de eletrofição seguida de tratamento térmico para utilização como biossensores de glicose por demonstrar boas propriedades químicas, física e biológicas. As nanofibras compósitas foram obtidas a partir de uma solução aquosa de concentração mássica de poli (álcool vinílico) (PVA) e acetato de zinco (AcZn) 2:1, 1:1 e 1:2 . Estudos demonstraram os efeitos da concentração mássica de acetato de zinco (PVA:AcZn) 2:1, 1:1 e 1:2 e da temperatura de calcinação por 2 horas em (500 °C, 600 °C e 700 °C) na morfologia e estrutura das nanofibras compósitas e de ZnO. As nanofibras obtidas da condição 1:1 (PVA:AcZn) foram escolhidas para a fabricação de um biossensor enzimático de glicose, por apresentar o formato de fibras mesmo após a calcinação a 600 °C, o que é de suma importância para aplicação em biossensores de glicose. As nanofibras de ZnO foram então utilizadas para a imobilização da enzima glicose oxidase formando um compósito na superfície do eletrodo de carbono vítreo para detecção de glicose em PBS pH 7,2. O biossensor enzimático (CGE/ZnO/GOx) desenvolvido apresentou excelentes propriedades eletroquímicas em relação ao eletrodo CGE puro e o CGE/ZnO. Na presença de 1,67 mmol/L de glicose o eletrodo CGE/ZnO/GOx aumentou a corrente de oxidação da glicose em cerca de 60 % em relação ao PBS. Estudo de estabilidade mostrou a alta bioatividade e estabilidade da enzima imobilizada na nanofibra de ZnO, pois reteve cerca de 75% da corrente de pico inicial mesmo após 300 ciclos de voltametria cíclica. Esses resultados sugerem que o eletrodo modificado com as nanofibras de ZnO e GOx exibe elevado potencial para aplicação como biossensor de glicose.

Palavras-chave: nanofibras, óxido de zinco, eletrofição, biossensores, glicose, glicose.

Abstract

Diabetes is a chronic disease that causes one death every 10 seconds throughout the world. In view of this scenario, zinc oxide (ZnO) nanofibers were synthesized by electrospinning technique followed by thermal treatment for use as glucose biosensors for demonstrating good chemical, physical and biological properties. The composite nanofibers were obtained from a 2: 1, 1: 1 and 1: 2 aqueous solution of vinyl alcohol (PVA) and zinc acetate (AcZn). Studies have demonstrated the effects of the 2: 1, 1: 1 and 1: 2 mass concentration of zinc acetate (PVA: AcZn) and calcination temperature for 2 hours at (500 ° C, 600 ° C and 700 ° C) on morphology and structure of composite nanofibres and of ZnO. The nanofibers obtained from the 1: 1 condition (PVA: AcZn) were chosen for the manufacture of an enzymatic glucose biosensor, because remaining the fiber format even after calcination at 600 ° C. This is of paramount importance for application in glucose biosensors. The ZnO nanofibers were then used to immobilize the glucose oxidase enzyme by forming a composite on the surface of the glassy carbon electrode for glucose detection in PBS pH 7.2. The developed enzymatic biosensor (CGE / ZnO / GOx) showed excellent electrochemical properties in relation to the pure CGE electrode and CGE / ZnO. In the presence of 1.67 mmol / L glucose the CGE / ZnO / GOx electrode increased the glucose oxidation current by about 60% relative to PBS. Stability study showed the high bioactivity and stability of the immobilized enzyme in the ZnO nanofiber, because it retained about 75% of the initial peak current even after 300 cycles of cyclic voltammetry. These results suggest that the electrode modified with the ZnO and GOx nanofibers exhibits high potential for application as a glucose biosensor.

Keywords: nanofibres, zinc oxide, electrospinning, biosensors, glucose, glucose.

Lista de Figuras

Figura 1- Estruturas cristalinas do ZnO. (adaptado de Chin Boog Ong et. al. ¹).....	16
Figura 2 - Imagens TEM das nanopartículas de ZnO em diferentes ampliações (adaptado Manoj Pudukudy et. al. ¹³).	17
Figura 3- Nanofibras de acetato de zinco / PVA dopado com acetato de cobalto e calcinado a 520 °C (adaptado de R. Bouzerara et. al. ¹⁶).	18
Figura 4 - Imagens FESEM de nanofolhas de ZnO (adaptados de Amir Mehralizadeh et. al. ¹⁸).	20
Figura 5- Imagens FESEM de nanofolhas de ZnO (adaptados de Amir Mehralizadeh et. al. ¹⁸).	21
Figura 6- Microrregiões formadas durante o processo de eletrofição ²⁴	23
Figura 7- Esquema típico da eletrofição.....	24
Figura 8- Esquema de um biossensor, mostrando a organização dos seus componentes ²⁸	26
Figura 9- Representação Esquemáticas dos tipos de gerações de biossensores. (a) Primeira Geração. (b) segunda Geração. (c) Terceira Geração.(adaptados de Héctor Fernández et. al. ²).....	28
Figura 10- Representação da dupla hélice da glicose oxidase ³⁸	29
Figura 11- Métodos comuns de imobilização usados em biossensores: (A) ligação covalente; (B) adsorção; (C) reticulação; (D) encapsulamento; e, (E) aprisionamento (adaptados de Melissa M. Rodríguez-Delgado e. al. ⁴³).	31
Figura 12- Aparato da eletrofição utilizado para produção das nanofibras.....	34

Figura 13- Cadinho de porcelana utilizado na calcinação.....	36
Figura 14- Configuração de uma célula eletroquímica de três eletrodos (adaptados de Joshi P. S.at.al. ³).....	38
Figura 15- Esquema de preparação dos eletrodos de carbono vítreo modificados com ZnO e GOx.	39
Figura 16- TG das nanofibras de PVA e compósitas em (a) e em (b) TG das nanofibras compósitas calcinadas a 500 °C.	43
Figura 17- Imagens de MEV: (a) PVA, (b) 2:1, (c) 1:1 e (d) 1:2; Espectros de EDS: (a1) 1:0, (b1) 2:1, (c1) 1:1 e (d1) 1:2, Histograma de distribuição de diâmetros: (a2) 1:0, (b2) 2:1, (c2) 1:1 e (d2) 1:2.	45
Figura 18- Perfil de Condutividade Elétrica x Razão PVA/AcZn.	46
Figura 19- Imagem de MEV das nanofibras compósitas 2:1 (a) 500 °C, (b) 600 °C, (c) à 700 °C. Histograma de distribuição de diâmetros (d) 2:1(500 °C). Espectro de EDS das nanofibras calcinadas a 2:1 (e) 500 °C.....	48
Figura 20- Imagens de MEV das nanofibras 1:1), Calcinadas: (a) 500 °C, (b) 600 °C, (c) 700 °C. Histograma de distribuição de diâmetro: (d) 1:1(600 °C). Espectro de EDS das nanofibras calcinada(e) 1:1(500 °C).....	50
Figura 21- Imagens de MEV das nanofibras 1:2. Calcinadas: (a) 500 °C, (b) 600 °C, (c) 700 °C. Histograma de distribuição de diâmetro: (d) 1:1(600 °C). Espectro de EDS das nanofibras calcinada(e) 1:1(500 °C).....	52
Figura 22- Espectros de FT-IR: (a) nanofibras antes da calcinação e (b) nanofibras após calcinação à 500 °C.....	53

Figura 23- Espectros Raman: (a) 2:1 / 1:1 / 1:2 calcinadas a 500 °C e (b) 1:1(500 °C) / 1:1(600 °C) / 1:1(700 °C).	55
Figura 24 - Difractogramas das nanofibras compósitas de razões mássicas 2:1 / 1:1 / 1:2.	56
Figura 25- Difractogramas de Raios-X: (a) 2:1(500 °C) / 1:1(500 °C) / 1:2(500 °C) e (b) 1:1(500 °C) / 1:1(600 °C) e 1:1(700 °C).....	58
Figura 26- Voltametria Cíclica (a) eletrodo de CGE; CGE/ZnO; CGE/ZnO/GOx em PBS 0,1 M (pH=7,2) a 10 mV.s ⁻¹ ; (b) em PBS 0,1 M (pH=7,2) após a adição de 1,67 mM de glicose a 10 mV.s ⁻¹ ; (c) eletrodo de CGE/ZnO/GOx em PBS 0,1 M (pH=7,2) com e sem adição de 1,67 mM glicose 50 mV.s ⁻¹	61
Figura 27- Curvas de voltametria cíclica para o eletrodo CGE/ZnO/GOx em diferentes taxas de varredura obtidas em PBS 0,1 M (pH=7,2) com adição de 1,67 mM glicose.	62

Lista de Tabelas

Tabela 1- Reagentes, grau de pureza, peso molecular e fornecedor.....	35
Tabela 2 - Atribuições das principais bandas de FTIR das nanofibras compósitas.....	54
Tabela 3- Diâmetro Médio do Cristalito das nanofibras de ZnO, usando a fórmula de Debye-Scherrer ⁵⁴	59

SUMÁRIO

1.Introdução	14
2. Objetivos.....	17
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3.Revisão Bibliográfica.....	18
3.1.Óxido de zinco (ZnO)	18
3.2.Nanoestruturas de ZnO	19
3.2.1 .0D	20
3.2.2. 1D	21
3.2.3. 2D	22
3.2.4 .3D	23
3.3.Métodos de obtenção de nanoestrutura de ZnO.....	24
3.3.1.Método Hidrotérmico	25
3.3.2.Método Sol-Gel.....	25
3.3.3.Método de Precipitação Controlada	25
3.1.4. Método de Eletrofiação	26
3.4.Biossensores.....	29
3.4.1.Biossensores Enzimáticos.....	30
3.4.2.Glicose Oxidase (Gox)	32
3.4.3.Métodos de Imobilização Enzimática.....	33
3.4.4.Biossensor de Glicose.....	35
3.5.Voltametria	36
4.Experimental.....	38
4.1.Materiais.....	38
4.2.Preparação das nanofibras de Compósitas	38
4.3.Preparação das soluções utilizadas nos testes eletroquímicos	40
4.4.Preparação das amostras para calcinação.....	40

4.5. Preparação dos eletrodos.....	41
4.6. Instrumentação e procedimentos analíticos.....	42
5. Caracterizações.....	43
5.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	43
5.2. Espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (EDS).....	43
5.3. Difratometria de raios-X.....	43
5.4. Microscopia eletrônica de varredura.....	43
5.5. Análise Termogravimétrica (TG).....	44
5.6. Condutividade Elétrica.....	44
6. Resultados e Discussões.....	45
6.1. Caracterizações morfológicas e estruturais das nanofibras de ZnO.....	45
6.2. Caracterização eletroquímica dos eletrodos modificados com nanofibras de ZnO e GOx (CGE/ZnO/GOx).....	61
7. Conclusão.....	64
8. Perspectivas Futuras.....	65
9. Referências.....	66

1. Introdução

A nanotecnologia é um campo amplo e multidisciplinar que compreende grandes áreas das ciências, como Física, Química e Biologia. É uma tecnologia conduzida em escalas atômicas e moleculares variando na escala de nanômetros a submicrômetros⁴. A nanotecnologia traz ao mundo e a sociedade do século XXI impactos imensuráveis nas diversas áreas. As primeiras áreas as quais a nanotecnologia foi aplicada incluem a tecnologia da informação, biologia celular e molecular. A grande vantagem de materiais nanoestruturados em relação aos materiais em escala macroscópica é a de exibirem diferentes propriedades física e química, em setores como agricultura, medicina, eletrônica, robótica entre outras⁵.

A nanotecnologia tem contribuído muito para a sociedade de um modo geral, principalmente na medicina. A nanomedicina é um campo da nanotecnologia relativamente novo, a qual faz uso de nanodispositivos para entrega de fármacos e também de nanobiossensores⁶. Com a ajuda da nanomedicina, a detecção precoce, prevenção e melhores diagnósticos de doenças são possíveis⁷. Com o aumento da população mundial, cada vez mais são necessários instrumentos para monitorar, controlar e prevenir doenças que afetam a população. As doenças que mais afetam a população são as doenças cardiovasculares, respiratórias, crônicas, diabetes e câncer. Entre essas doenças a diabetes merece destaque, uma vez que 425 milhões adultos tem diabetes no mundo dados lançados pela Internacional Diabetes Federation (IDF). A diabetes está relacionada com a insuficiência de insulina ou quando o organismo não pode absorver efetivamente a insulina produzida. A insulina é responsável por quebrar as moléculas de glicose e fornecer energia para o corpo. A quantidade de glicose presente no sangue é chamada de glicemia, em pacientes com jejum de oito horas, a quantidade normal deve ser inferior a 100 mg de glicose em 1 dL de sangue, segundo a American Diabetes Association, Organização Mundial da Saúde e Sociedade Brasileira de Diabetes. Dessa forma

quadros de hiperglicemia ou aumento de açúcar no sangue é o efeito mais comum do diabetes descompensado.

Em décadas passadas o controle de glicose era feita apenas com medida domiciliar da glicosúria e dosagens ocasionais de glicemia em jejum. Desde então, houve avanços em métodos para o controle de glicose em longo prazo, como hemoglobina glicada, assim como teste que detectam flutuação da glicose ao longo dia, como automonitoramento da glicose capilar e o sistema de monitoramento contínuo da glicose em líquido intersticial⁸.

O desenvolvimento de nanodispositivos de alta eficiência e de baixo custo que possam detectar a glicose tem sido um desafio para os pesquisadores. Neste cenário, os métodos eletroquímicos se mostram bastante interessantes, pois são na maioria métodos rápidos, sensíveis e de baixo custo⁹, quando comparado com outras técnicas, tais como cromatografia líquida de alta performance (HPLC). O desenvolvimento de biossensores enzimáticos para a detecção de glicose tem sido amplamente estudado e continua sendo alvo de pesquisa de inúmeros grupos de pesquisa^{10,11,12}. Isso porque, esses biossensores são capazes de combinar a alta especificidade das enzimas com a elevada sensibilidade e seletividade dos transdutores eletroquímicos¹³.

Diante disso, este trabalho teve como finalidade desenvolver um biossensor de glicose utilizando a enzima glicose oxidase imobilizada em nanofibras de óxido de zinco (ZnO) obtidas por eletrofiação. Nanoestruturas 1D de ZnO apesar do curto período em desenvolvimento, mostram características promissoras em sensores e testes de ensaio que oferecem excelente sensibilidade e seletividade biomolecular para bioaplicação¹⁴. Nanomateriais 1D de ZnO tem sido empregado principalmente para detecção biomédica in vitro, mesmo sendo considerado um estudo recente para biossensorização e biodetecção em comparação as partículas, filmes finos e contrapartes a granel¹⁴. As questões relacionadas a elétrica e eletroquímica tendem a potencializar com a redução da dimensionalidade física, que produz uma alta razão

área/volume, bem como as propriedades elétricas do ZnO¹⁴. O ZnO foi escolhido por apresentar ótimas propriedades físicas, químicas, biológicas, incluindo boa estabilidade química, fotoquímica, transparência óptica, não toxicidade, biocompatibilidade e fácil preparação^{15 16}. Como resultado, o óxido de zinco tem emergido como um candidato com boas perspectivas para aplicações nas mais diferentes áreas, principalmente em biossensores.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver biossensor enzimático eletroquímico para a detecção de glicose utilizando nanofibras de ZnO, sintetizadas por eletrofiação, imobilizadas com glicose oxidase (GOx).

2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar nanofibras compósitas de PVA:AcZn em diferentes razões mássicas (2:1; 1:1 e 1:2);
- Calcinar as nanofibras compósitas em diferentes temperaturas (500 °C, 600 °C e 700 °C) por duas horas;
- Estudar a influência da concentração do acetato de zinco e da temperatura de calcinação nas propriedades morfológicas e estruturais das nanofibras de ZnO;
- Utilizar a melhor condição de obtenção das nanofibras para a modificação do eletrodo de carbono vítreo;
- Imobilizar a enzima glicose oxidase no eletrodo de carbono vítreo modificado com nanofibras de ZnO;
- investigar o comportamento eletroquímico desse biossensor enzimático na detecção de glicose utilizando a técnica de voltametria cíclica.

3.Revisão Bibliográfica

3.1Óxido de zinco (ZnO)

O ZnO é um material semicondutor que tem uma vasta aplicação nas áreas biomédicas, eletrônica, óptica, catalítica e fotocatalítica por apresentar um ponto isoelétrico de 9,5, *band-gap* de 3,44 eV e uma grande energia de ligação excitônica (par elétron-lacuna) de 60 meV conferindo a ele boas aplicações. Propriedades estas que torna o ZnO diferente de outros semicondutores ou óxidos metálicos pelas suas propriedades catalíticas, elétricas, optoeletrônicas e fotoquímicas¹⁷.

Óxido de zinco apresenta três diferentes estruturas cristalinas são elas: sal-gema, blenda de zinco e a wurtzita, como apresentada na **Figura 1**. Entre as estruturas cristalinas a sal-gema é obtida a partir da wurtzita sobre altas pressões, que faz com que a redução do parâmetro de rede favoreça a interação iônica de Coulomb (ionicidade) sobre o caráter covalente, fazendo com que estrutura fique seis vezes coordenada. Por outro lado, a blenda de zinco é uma fase metaestável que se estabiliza quando em crescimento num substrato cúbico conferindo compatibilidade topológica para superar a fase estável do ZnO. Já a Wurtzita sob condições ambientes é a fase termodinamicamente mais estável¹⁸.

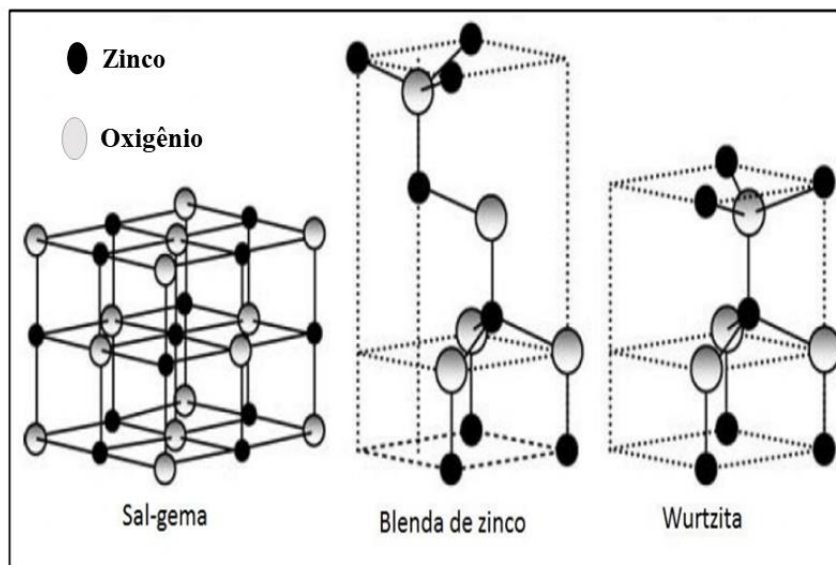


Figura 1 - Estruturas cristalinas do ZnO. (adaptado de Chin Boog Ong et. al.¹)

A Wurtzita tem uma célula unitária hexagonal com os parâmetros de rede a e c na proporção $c/a = \sqrt{8/3} = 1,633$ em disposição ideal e pertence a $P6_3mc$ da notação Hermann-Mauguin¹⁸. Na estrutura hexagonal cada ânion é circundado por quatro cátions no centro de um tetraedro coordenando uma típica ligação covalente sp^3 ¹⁸. Por ter uma estrutura hexagonal apresentam os parâmetros $a_1 = a_2 = a_3$ formando um plano basal com c perpendicular ao plano basal, e os ângulos $\alpha = \beta = 120^\circ$ do plano basal e $\gamma = 90^\circ$ perpendicular ao plano basal¹⁸.

3.2 Nanoestruturas de ZnO

ZnO é um material que pode ser obtido em diversas nanoestruturas, cujas configurações são muito mais ricas do que qualquer nanomaterial conhecido, incluindo nanotubos de carbono. O ZnO pode ser sintetizado em diferentes dimensões, 0D (sem dimensão), 1D (uma dimensão), 2D (duas dimensões) e 3D (três dimensões).

3.2.1. 0D

A representação mais comum de materiais sem dimensão são as nanopartículas, como mostrado na **Figura 2**, as quais tem desempenhado boas funções bactericidas e em fotocatalise¹⁹. Nanoestruturas 0D de ZnO melhoram sensivelmente a sensibilidade da corrente de eletrodo da enzima GOx por demonstrarem maior razão área superficial e volume quando comparadas com suas outras contrapartes de massa²⁰. Nanopartículas de ZnO foram sintetizadas a partir do método bioquímico verde, utilizando extrato de folhas *Corymbia Citriodora* como agente redutor e estabilizante. As nanopartículas foram usadas para modificação do eletrodo de carbono vítreo em biossensor eletroquímico de H₂O₂. O biossensor mostrou um limite de detecção para 0,07 µmol/L, reprodutibilidade aceitável e estabilidade de 93% da atividade original²¹.

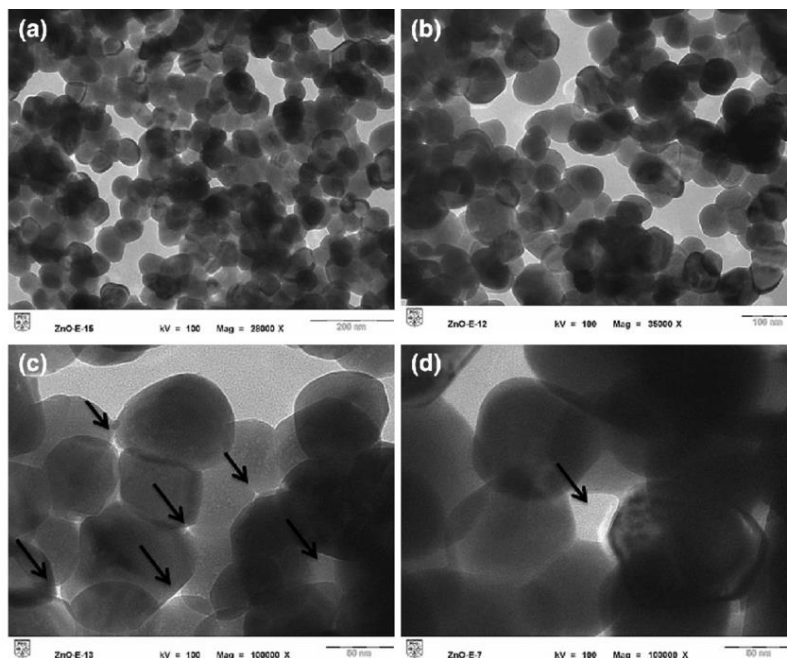


Figura 2 - Imagens TEM das nanopartículas de ZnO em diferentes ampliações (adaptado de Manoj Pudukudy et. al.¹³).

3.2.2. 1D

Nanoestruturas de ZnO em 1D, apresentam maior hidrofobicidade, boa capacidade de formar nanogrãos, maior resistência térmica e mecânica; características estruturais controláveis (comprimento/ diâmetro, área/massa e pequenos diâmetros), propriedades ópticas, elétricas e magnéticas ajustáveis. Nanoestruturas que podem exibir diferentes morfologias como nanofios, nanofibras, nanotubos, nanobastões, entre outros²² a qual induzem uma maior área específica, melhorando sua característica principalmente em sensores. Em uma dimensão, essas estruturas são de grande interesse para os pesquisadores e tem profundo impacto em dispositivos eletrônicos, materiais nanocompósitos e como fonte alternativa de energia²³. No que diz respeito a aplicações em nanodispositivos, tem demonstrado diversas vantagens eletroquímicas, devido a sua eficiente capacidade de transporte de elétrons²⁴. Um exemplo de uma estrutura em 1D é mostrado na **Figura 3**. Nanofibras de ZnO foram preparadas por eletrofiação a partir de solução de Poli(óxido etileno) e Acetato de Zinco pela calcinação das nanofibras compósitas a 600 °C. A película fina nanofibrosa de ZnO mostrou boa sensibilidade para detecção de vapores orgânicos, como metanol, etanol, cetona e propanol²⁵.

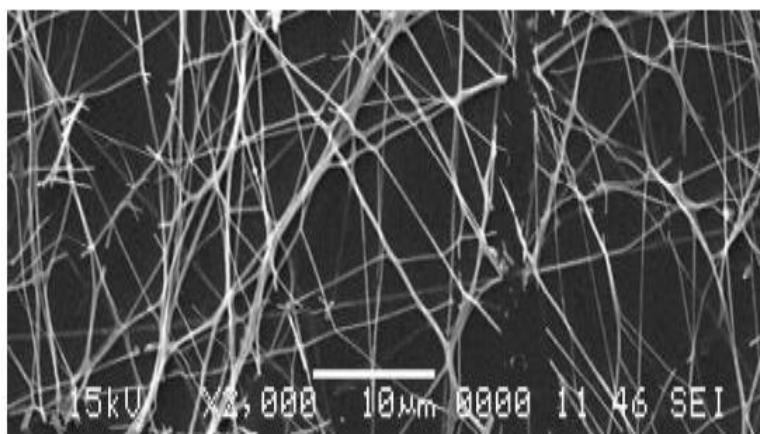


Figura 3 - Nanofibras de acetato de zinco / PVA dopado com acetato de cobalto e calcinado a 520 °C (adaptado de R. Bouzerara et. al¹⁶).

3.2.3. 2D

Nanoestruturas em 2D apresentam propriedades similares as de 1D. Compostos lamelares representam uma interessante classe de materiais que podem ser esfoliados para produzir estruturas bidimensionais (2D). Isso ocorre devido a fraca interação entre as camadas vizinhas, o que facilita o deslizamento de uma camada sobre a outra. Estruturas em nanofolhas podem ser consideradas como uma nova classe de materiais, pois apresentam espessura extremamente pequena, cerca de ~ 1 nm e tamanho lateral com até várias dezenas de micrômetros. Além disso, nanomateriais bidimensionais (2D), cuja espessura na direção horizontal é apenas de uma ou várias camadas atômicas, trazem vantagens sinérgicas de propriedades elétricas controláveis e elevadas áreas superficiais específicas, bem como atividades eletroquímicas superiores. A alta área de superfície específica introduz grandes números de sítios ativos para reações eletroquímicas e transporte de elétrons, os quais são altamente vantajosos para melhorar o desempenho eletroquímico²⁶. A **Figura 4**, apresenta estruturas de ZnO em 2D sintetizadas pelo método de precipitação a partir de sulfato de zinco heptahidratado e hidróxido de sódio, seguida de calcinação a 300 °C, estudo das propriedades ópticas indicou o desvio para o vermelho da energia do band-gap²⁷.

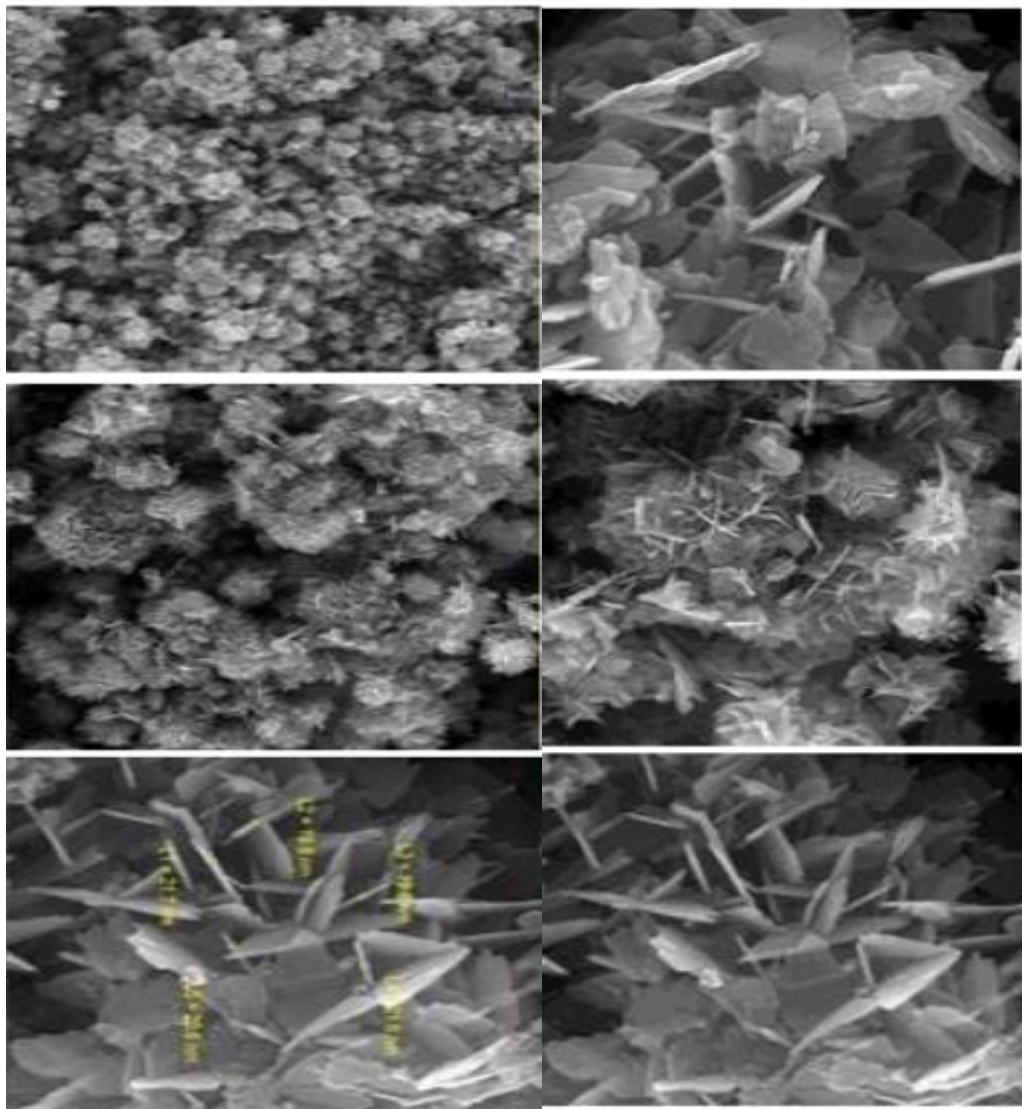


Figura 4 - Imagens FESEM de nanofolhas de ZnO (adaptados de Amir Mehralizadeh et. al.²⁷).

3.2.4.3D

Materiais 3D de ZnO possuem não só apenas grande área de superfície específica, mas também propriedades fotocatalíticas, eletrônicas e ópticas melhoradas em comparação com 0D, 1D e 2D. Na **Figura 5**, é mostrado um exemplo de uma nanoestrutura de ZnO do tipo flor. Essas nanoestruturas de ZnO foram auto-montadas a partir de nanobastões de ZnO pela interação eletrostática entre os planos do cristal com cargas opostas fornecendo um material multidimensional sem empregar qualquer intervenção externa, oferecendo boas aplicações

tecnológicas em eletroforese nanocapilar, nanofluídica, sensoriamento bioquímico, eletrônica em nanoescala e optoeletrônica.²⁸

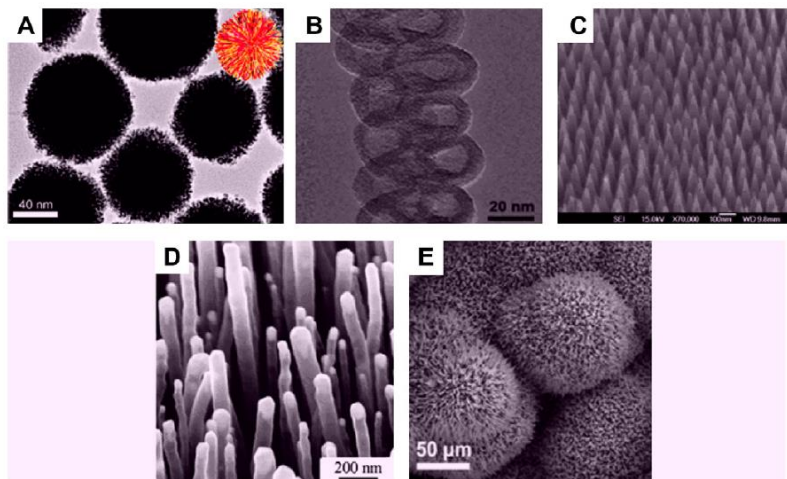


Figura 5 - Imagem típica de SEM e TEM de diferentes tipos de NSMs 3D, que é sintetizada por nossos e vários grupos de pesquisa. (A) Nanobolas (estruturas dendríticas) [61], (B) nanocontornos [62], (C) nanocones, (D) nanopillers [63] e (E) nanoflores [64]. Reimpresso com permissão do ACS Publishers. (adaptados de Jintendra N. Tiwari et. al.²³).

3.3 Métodos de obtenção de nanoestrutura de ZnO

Existem vários métodos de obtenção de nanoestruturas de ZnO, entre eles podemos citar o método hidrotérmico, sol-gel, precipitação controlada e a eletrofiação. Abaixo serão apresentadas as principais características de cada método e algumas vantagens relacionadas ao método.

3.3.1 Método Hidrotérmico

O método hidrotérmico não requer a utilização de solvente orgânico ou processamento adicional do material fabricado (calcinação) o que o torna simples. Por ser uma síntese ecologicamente correta e que não requer necessidade de controlar o pH, podemos preparar diferentes tipos de nanoestruturas²⁹. A obtenção do material ocorre numa autoclave que aquece gradualmente a mistura entre 100 °C e 300 °C, a qual é deixada por vários dias. Os núcleos cristalinos, formados do método, crescem a partir do aquecimento seguido do resfriamento. Entre as vantagens do método consta a que podem ser sintetizados materiais a baixas temperaturas e obter cristais de diversas formas e dimensões dependendo da composição da mistura, temperatura e pressão, com alta cristalinidade e pureza³⁰.

3.3.2 Método Sol-Gel

O método sol-gel apresenta custo relativamente baixo, simplicidade, confiabilidade e repetibilidade³⁰. A técnica é baseada na hidrólise e condensação de um precursor metálico, um alcoxido metálico por exemplo. Ele tem como característica modificar a superfície do óxido de zinco a partir de certos compostos orgânicos selecionados. Essa modificação superficial é que melhora, suas propriedades em diversos tipos de aplicações. Nanopartículas de ZnO foram sintetizadas utilizando o método sol-gel. As nanopartículas apresentaram boa pureza (55,38% de zinco e 44,62% de oxigênio), cristalinidade, estrutura semelhante a uma haste, homogêneas e apreciável tamanho 81,28 nm e 84,98 nm³¹.

3.3.3 Método de Precipitação Controlada

Método no qual ocorre a redução rápida e espontânea de uma solução de zinco ao ser usado um agente redutor. Agente que limita o crescimento da partícula em certas dimensões,

precipitando o precursor de zinco na solução. Posteriormente, o precursor é submetido a tratamento térmico e em seguida é moído para remoção de impurezas. A precipitação é controlada por variáveis como pH da solução, temperatura e tempo de reação³⁰.

3.3.4 Método de Eletrofiação

O método de eletrofiação é baseado no uso de um intenso campo elétrico para criar um jato de solução de polímero³². Também chamada de fiação eletrostática³³ foi proposto por Anton Formhals, de Mainz – Alemanha, em 1938 e redescoberta há cerca de duas décadas por Reneker e Doshi. A eletrofiação vem sendo muito estudada para produção de nanofibras e nanofios a partir de polímeros como poli(álcool vinílico)³⁴, poli(vinil pirrolidona)³⁵, poli(fluoreto de vinilideno)³⁶ entre outros.

Eletrofiação usa forças eletrostáticas para produção de fibras com diâmetros variando de micrômetros a centenas de nanômetros a partir de materiais poliméricos fundidos ou em solução. Por meio de observações experimentais Reneker e Yarin propuseram que o jato eletrofiado é dividido em quatro regiões, como mostrado na **Figura 6**.

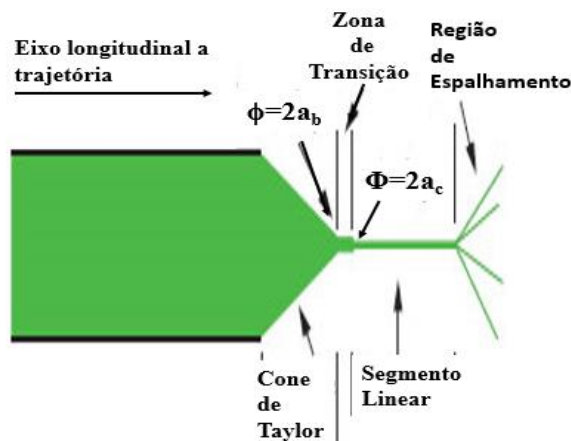


Figura 6 - Microrregiões formadas durante o processo de eletrofiação ²⁴.

O cone de Taylor foi proposto por Taylor como sendo uma gota, que ao ser submetida a um potencial elétrico cada vez maior se estira até o ponto em que se tem um formato cônico. Região em que Reneker propôs como um fluxo newtoniano³⁷. A zona de transição é marcada pelo início de estiramento do fluido, região que fica entre o cone de Taylor onde a tensão de estiramento é pequena e o segmento linear, onde o fluido encontra pré-estirado, resultando em uma redução no diâmetro no seu início.

Na preparação, antes da eletrofiação, os materiais são dissolvidos em solventes apropriados caso se use solução, ou fundidos se a eletrofiação é por fusão. Após o preparo são introduzidos em seringas (com agulhas metálicas de diâmetro adequado) caso se use solução, ou um tubo capilar (se a eletrofiação é por fusão) para a eletrofiação. O método é utilizado para produzir fibras em escala submicrométrica e nanométrica que se acumulam em forma de malhas, (tapete não tecido) que visualmente são contínuas. Normalmente, os experimentos são realizados em temperaturas próximas as do ambiente e em condições atmosféricas. Os componentes básicos da eletrofiação são: uma fonte de alta tensão, uma unidade de alimentação (bomba de seringa) e uma placa metálica aterrada (coletor) como visto na **Figura 7**.

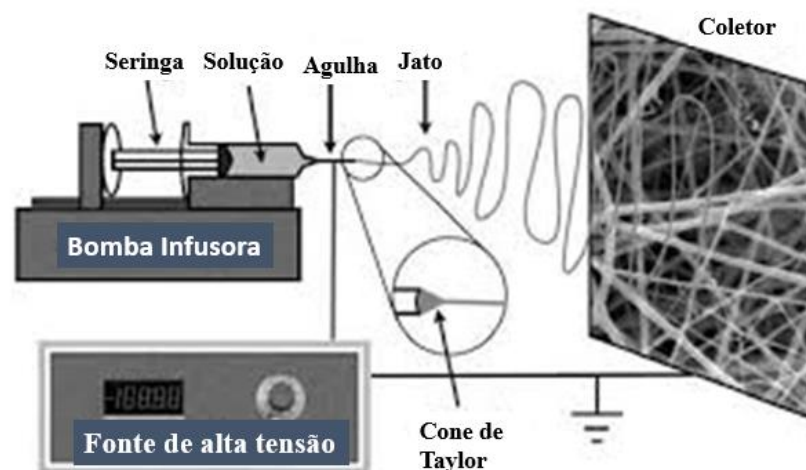


Figura 7 - Esquema típico da eletrofiação.

As dimensões e as morfologias das fibras formadas dependem de um conjunto de parâmetros^{33,38}, tais como:

- Propriedades do polímero: Massa Molar, Distribuição de Massa Molecular (DMM), Temperatura de Transição Vítrea (T_g), Solubilidade;
- Propriedades da solução: Viscosidade, Concentração, Condutividade Elétrica, Viscoelasticidade, Tensão Superficial, Pressão de Vapor do solvente;
- Parâmetros do Processo: Tensão Aplicada, Distância entre o coletor e o tubo capilar, Taxa de Alimentação da Solução, Geometria dos Eletrodos e Propriedades do Substrato;
- Parâmetros Ambientais: Umidade Relativa, Temperatura e Velocidade do Ar.

Para várias aplicações é desejável ter uma arquitetura alinhada ou específica e um diâmetro controlado das nanofibras acumuladas. Por ser um método em que vários parâmetros influenciam na morfologia e no diâmetro, exige-se um controle das condições experimentais de forma a obter um melhor resultado³⁸. A vantagem da técnica de eletrofiação é a sua versatilidade e baixo custo, além de ser atualmente a única que permite obtenção de fibras contínuas de diâmetro micrométrico e nanométrico conferindo uma excepcional área de superfície ativa, morfologia fibrosa porosa, eletro funcionalidade, estrutura complexa (fibras ocas ou casca central), diâmetro e espessura controlada^{33,39}. Portanto nesse trabalho a eletrofiação foi utilizada para produzir nanofibras (1D) de ZnO, que são estruturas excelentes para a aplicação na área de biossensores, proposta nesse trabalho.

3.4 Biossensores

No ano de 1906 começa a história do biossensor quando M. Cremer confirmou que a concentração do ácido em um líquido é proporcional ao potencial elétrico surgido entre as partes do líquido em lados opostos de uma membrana de vidro. Entre 1909 e 1922 em que o conceito de pH e eletrodo de medição de pH foi introduzido, relataram pela primeira vez a imobilização de enzima invertase em hidróxido de alumínio e carvão. O primeiro trabalho desenvolvido sobre biossensor para detecção de oxigênio foi feito por Leland C. Clark Jr. em 1956 conhecido como pai dos biossensores⁴⁰.

Biossensor pode ser definido como um dispositivo analítico ao qual é incorporado um elemento biológico que por meio de reações químicas geram sinais proporcionais a concentração de um analito específico na reação⁴¹. Biossensores são utilizados para detecção de doenças, drogas e poluentes⁴⁰, entre outros materiais. Esses dispositivos tem uma configuração como representado na **Figura 8**, são constituídos pelos seguintes componentes.

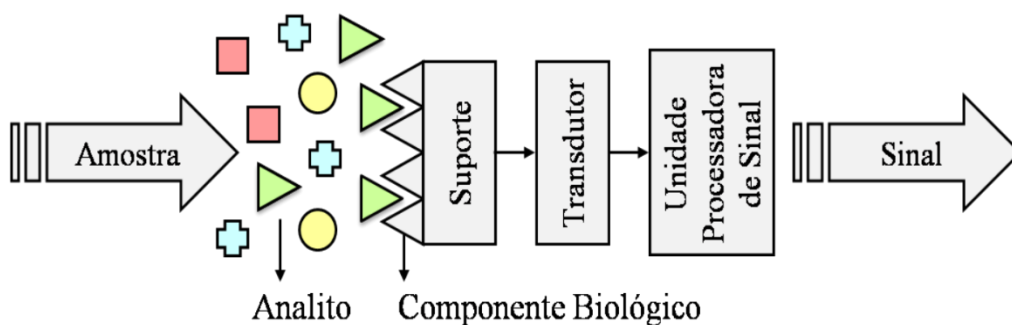


Figura 8 - Esquema de um biossensor, mostrando a organização dos seus componentes ²⁸.

- **Analito:** substância de interesse para detecção. Exemplo, a penicilina é o analito em um biossensor projetado para detecção de penicilina⁴².
- **Bioreceptor:** molécula que especificamente reage com o analito. Alguns exemplos de bioreceptores são enzimas, células, anticorpos, aptâmeros, ácidos desoxirribonucleico (DNA).

-
- **Transdutor:** elemento que converte uma forma de energia em outra. Ex: energia química em elétrica.
 - **Visor:** é o sistema de interpretação do usuário.

Existem certas características estáticas e dinâmicas atribuídas a cada biossensor, que juntas melhoram desempenho do biossensor, são elas⁴⁰:

- **Seletividade** é a capacidade de um bioreceptor detectar o analito específico dentre outros elementos da amostra. Como exemplo de seletividade é a interação entre glicose com a glicose oxidase.
- **Reprodutibilidade** é a capacidade do biossensor em gerar respostas idênticas a experimental.
- **Estabilidade** é o quão suscetível a perturbações externa e interna o biossensor resiste.
- **Sensibilidade** é a menor quantidade de analito que pode ser detectada pelo biossensor, também chamado de limite de detecção (LOD).

3.4.1 Biossensores Enzimáticos

Biossensores amperométricos enzimáticos tem sido amplamente estudados nas últimas décadas, pois são fáceis de miniaturizar, são robustos e podem operar com pequenos volumes de amostras de matrizes complexas⁴³. A detecção é baseada em processos de transferência eletrônica entre o sitio ativo da enzima imobilizada e o eletrodo de trabalho⁴⁴.

Os biossensores amperométricos são comumente divididos em três principais classes, ou gerações, dependendo do método de transferência de elétron usado para a medida da reação bioquímica, ou do grau de separação dos componentes do biossensor (transdutor, enzima,

⁴³mediadores e cofatores). Em todos, a presença da enzima é requerida e, portanto, o desempenho do sensor depende de diferentes parâmetros, tais como pH e temperatura.

Nos biossensores de primeira geração, a medida da concentração do analito é feita pela reação enzimática dos produtos que se difundiram para a superfície do transdutor⁴³, o material biológico encontrasse diretamente imobilizado sobre o transdutor, detecção de O₂ e H₂O₂ como mostrado na **Figura 9(a)**. Os de segunda geração usam um mediador de transferência de elétrons entre o material biológico e o transdutor⁴³ como é visto na **Figura 9(b)** e no de terceira geração o mecanismo é baseado na transferência direta de elétrons de enzimas ou proteínas para o substrato⁴³ ilustrado na **Figura 9(c)**.

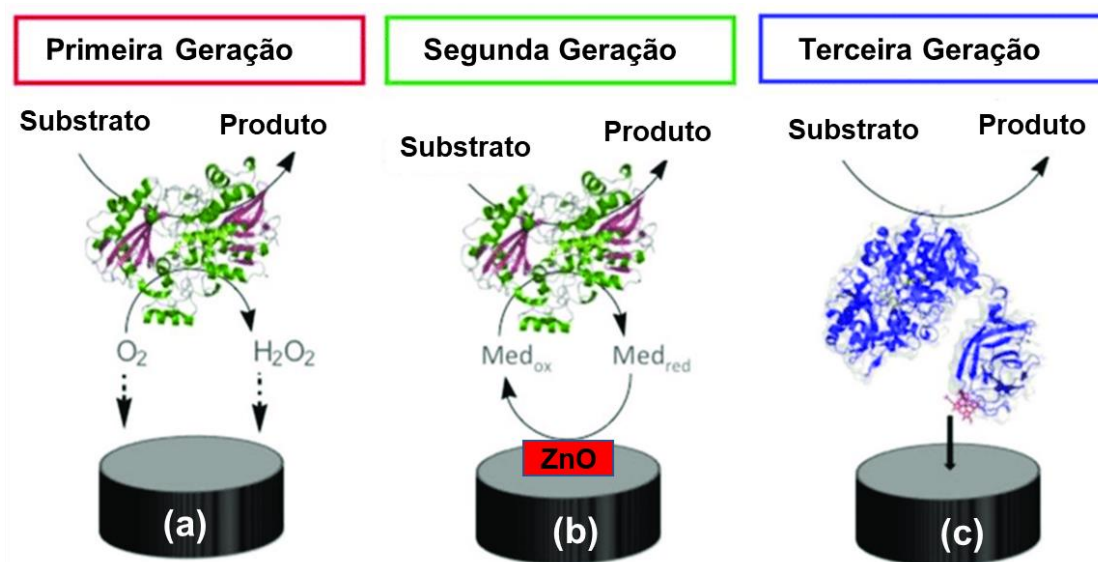


Figura 9 - Representação Esquemáticas dos tipos de gerações de biossensores. (a) Primeira Geração. (b) segunda Geração. (c) Terceira Geração.(adaptados de Héctor Fernández et. al.²).

Nesse último caso, para melhorar o desempenho do biossensor as enzimas são utilizadas junto com nanoestruturas de óxido metálico⁴⁵. Algumas enzimas são bastante utilizadas para o reconhecimento do analito, tais como, glutamato oxidase⁴⁶, álcool oxidase⁴⁷, lactose oxidase, glicose oxidase⁴⁸ entre outras. Essa última é responsável por catalisar a oxidação da glicose e, portanto, tem sido bastante utilizada em biossensores enzimáticos para detecção de glicose.

3.4.2 Glicose Oxidase (Gox)

Enzimas são catalisadores biológicos compostos de alto peso molecular formadas por cadeias de aminoácidos ligados por ligações peptídicas. Ligações peptídicas são formadas quando o grupo carboxila (-COOH) de um aminoácido liga ao grupo amina do outro aminoácido, formando amida. Dependendo de como a amida está interconectada ao longo da cadeia polipeptídica a enzima assume uma conformação específica⁴⁹.

A Glicose Oxidase (GOx) é uma flavoproteína e uma enzima homodimérica representada pela família oxidoredutase glucose / metanol / colina (GMC). Essa família tem uma grande diversidade de enzimas, industrialmente aplicadas na área de diagnósticos, como a oxidase do colesterol, álcool oxidase, aminoácidos oxidase e piranose oxidase.

A GOx é obtida principalmente da cultura de fungos *Aspergillus niger*, que tem como característica, alta especificidade a substrato de glicose⁵⁰. Na **Figura 10** é mostrada a estrutura em forma de fitas da Glicose Oxidase.

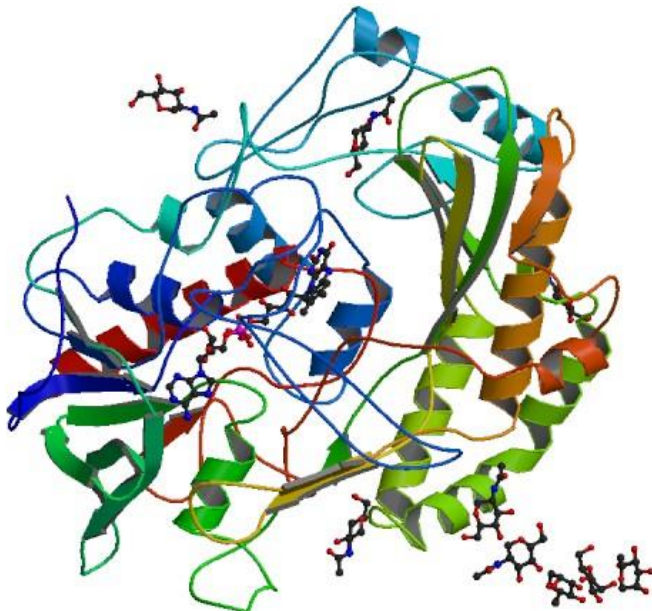
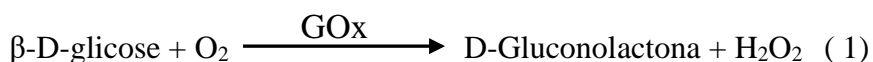


Figura 10 - Representação da dupla hélice da glicose oxidase⁵¹.

Enzima GOx apresenta alta estabilidade quando liofilizada, 0 °C (2 anos), -15 °C (8 anos) e em pH 5⁵². Possui ponto isoelétrico (IEP) de 4,2 no pH fisiológico 7,4⁵³. A GOx é responsável por catalisar a oxidação da β-D-Glicose, utilizando um oxigênio molecular como acceptor de elétrons para produzir o D-Gluconolactona e peróxido de hidrogênio, como mostrada na reação (1).



A maneira mais viável para fabricar um biossensor é aquela em que o componente biológico não perde sua atividade enzimática ao interagir diretamente a um transdutor. Processo que é conhecido como imobilização enzimática. Biossensores são arquitetados com uma grande quantidade de enzimas para garantir sua boa atividade catalítica. A estabilidade da enzima é fortemente influenciada pelos fatores químicos (ex. pH) e térmicos³².

3.4.3 Métodos de Imobilização Enzimática

O método de imobilização depende de vários fatores como a natureza do elemento biológico, tipo de transdutor usado, propriedades físico-químicas do analito e as condições de operação do biossensor. Esses fatores são essenciais para o elemento biológico exibir uma máxima atividade ao ser imobilizado³². Os métodos de imobilização enzimática podem ser ligação covalente, adsorção, reticulação, encapsulamento e aprisionamento, como descrito abaixo e ilustrado na **Figura 11**.

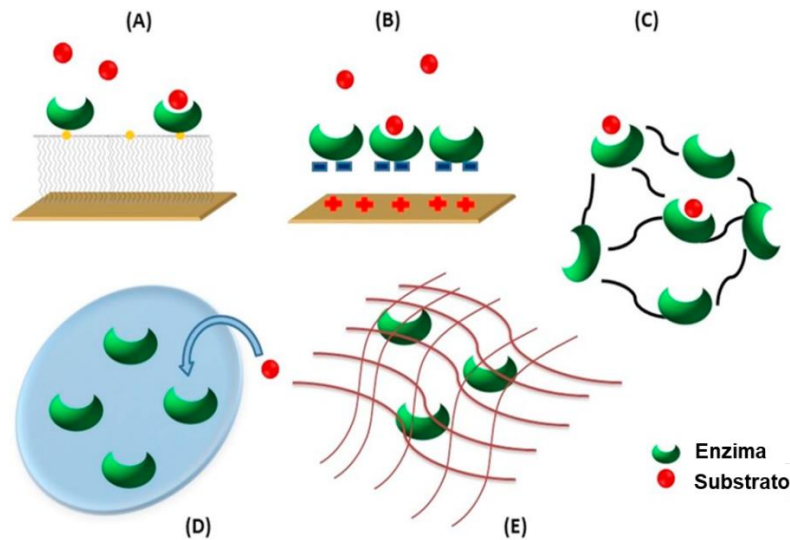


Figura 11 - Métodos comuns de imobilização usados em biossensores: (A) ligação covalente; (B) adsorção; (C) reticulação; (D) encapsulamento; e, (E) aprisionamento (adaptados de Melissa M. Rodríguez-Delgado e. al.⁴³)

- **Ligação Covalente:** método que depende principalmente da ligação covalente entre a superfície do substrato e a enzima. A ligação covalente entre a enzima e o substrato acontece nos aminoácidos da cadeia lateral como histidina, arginina, ácido aspártico, etc.
- **Adsorção:** é um método simples e rápido em que as moléculas de enzima aderem à superfície do substrato por combinação de interações hidrofóbicas e hidrofílicas. A adsorção é classificada como física ou química. Na adsorção física ocorrem diversas interações dipolo-dipolo, dipolo instantâneo, ligação de hidrogênio, íon-dipolo e de Van der Waals, que são relativamente fracas, enquanto na adsorção química a formação de ligações covalentes que são fortes⁵⁴.
- **Reticulação:** método em que ocorre a reticulação intermolecular entre as moléculas das enzimas por ligação covalente. Processo que utiliza um agente multifuncional, que atua ligando as moléculas da enzima em três dimensões formando um agregado cruzado. Reticulação em que a enzima imobilizada está no meio reacional e não no substrato. Existem

duas vertentes para imobilização enzimática por reticulação são elas: usos de agregado de enzima de ligação cruzada (CLEA) e de cristal de enzima de ligação cruzada (CLEC)⁵⁵.

- **Encapsulamento:** método em que o agente bioativo fica no interior de um material de formato esférico e tamanho microm, de membrana semipermeável como polímero⁵⁶.
- **Aprisionamento:** método baseado na retenção da enzima no interior da rede polimérica com ou sem ligação covalente permitindo apenas travessia de substrato e produtos. Processo que é realizado em duas etapas: i) A enzima é misturada em uma solução monomérica em seguida ii) A polimerização da solução monomérica por reação química ou por alteração na condição experimental⁵⁵.

3.5 Biossensor de Glicose

Biossensor de glicose é um biossensor eletroquímico que fornece informações quantitativas ou semiquantitativas específicas, usando um elemento de reconhecimento biológico, contido espacialmente direto no transdutor eletroquímico⁵⁷. A enzima ao se operar, deve catalisar uma reação bioquímica específica e ser estável na condição de operação. A intenção do biossensor é o conhecimento sobre o analito alvo, mesmo com a complexidade em quantificar o analito na matriz⁴³.

Clark e Lyons desenvolveram em 1962 o primeiro biossensor de glicose⁵⁸. O biossensor sintetizado foi composto por uma membrana semipermeável a oxigênio interno, uma fina camada da enzima GOx, uma membrana de diálise externa e eletrodo de oxigênio. A glicose foi detectada pelo consumo de oxigênio na oxidação da glicose, catalisada pela GOx. Depois disso, inúmeros trabalhos têm sido desenvolvidos nessa vertente. Por exemplo, nanocombas de ZnO a granel foram sintetizadas pelo método de transporte em fase de vapor e usadas em biossensor de glicose. As nanocombas foram usadas como material de suporte para GOx. O

biossensor enzimático, em que o GOx é imobilizada em nanocombas de ZnO é o único trabalho relatado que apresentaram uma alta afinidade, alta sensibilidade e resposta rápida para detecção de glicose⁵⁹.

Biossensor amperométrico de glicose baseado em nanofibra de ZnO foi sintetizado pelo método de eletrofição da solução polimérica de poli(vinil pirrolidona)/Acetato de Zinco. As nanofibras sintetizadas melhoraram significativamente a atividade eletrocatalítica da enzima com sensibilidade para detecção de glicose de $70,2 \mu\text{A}/(\text{cm}^2\text{mM})$, tempo de reposta inferior a 4s, boa capacidade anti-interferência (Colesterol, Ácido Ascórbico, L-Cisteína e Uréia) e estabilidade de armazenamento a longo prazo (mais de 4 meses)⁶⁰.

Nanonilhas de ZnO produzidas por evaporação térmica foram utilizadas como suporte para imobilização da glicose oxidase na fabricação de um biossensor de glicose. O GOx apresentou maior liberdade espacial de orientação, facilitando a transferência de elétrons para o eletrodo. Biossensor que mostrou alta sensibilidade ($24,613 \text{ A}/\text{cm}^2\text{mmol/L}$), tempo de resposta inferior a 10 s ⁴⁸.

Biossensor eletroquímico enzimático com excelente reprodutibilidade intra-sensor, sensibilidade, especificidade e limite de detecção ($0,9 \mu\text{mol/L}$) foi proposto para determinação de glicose em amostra de sangue¹³. Uma das desvantagens desafiadora na detecção biossensora do biossensor amperométrico enzimático é na redução da interferência de substâncias químicas e contaminantes presentes na amostra⁴³.

3.6. Voltametria

Foi descoberta a partir da polarografia em 1922 por Jaroslav Heyrovsky, químico que recebeu o Prêmio Nobel em 1959 em Química. A partir dos anos 60 e 70 ocorreram avanços significativos nas áreas da voltametria, como teoria, metodologia e instrumentação, o que aumentou a sensibilidade e o conjunto de métodos analíticos⁶¹.

As técnicas voltamétricas tem como característica comum, a aplicação de um potencial (V) no eletrodo e o controle da corrente elétrica resultante fluindo na célula eletroquímica. Voltametria é considerada uma técnica ativa, pelo fato de podermos variar o potencial aplicado ou a corrente em função do tempo. Enquanto a potenciometria é uma técnica passiva que não tem o seu potencial aplicado variado em função do tempo. O potencial aplicado é que causa mudança na concentração da espécie eletroativa, reduzindo ou oxidando na superfície do eletrodo⁶¹.

Um experimento voltamétrico que é realizado numa célula eletroquímica formada por um eletrodo de trabalho (indicador), eletrodo de referência e geralmente um eletrodo contador (auxiliar ou contra-eletrodo) como mostrado esquematicamente na **Figura 12**. O eletrodo de trabalho é onde a reação ou fenômeno de interesse ocorre. A substância na superfície do eletrodo de trabalho experimenta reação de oxidação ou redução quando é aplicado um potencial apropriado. O potencial aplicado que provoca transporte de massa de para a (ou a partir da) superfície do eletrodo de trabalho e movimento de cargas elétricas⁶¹.

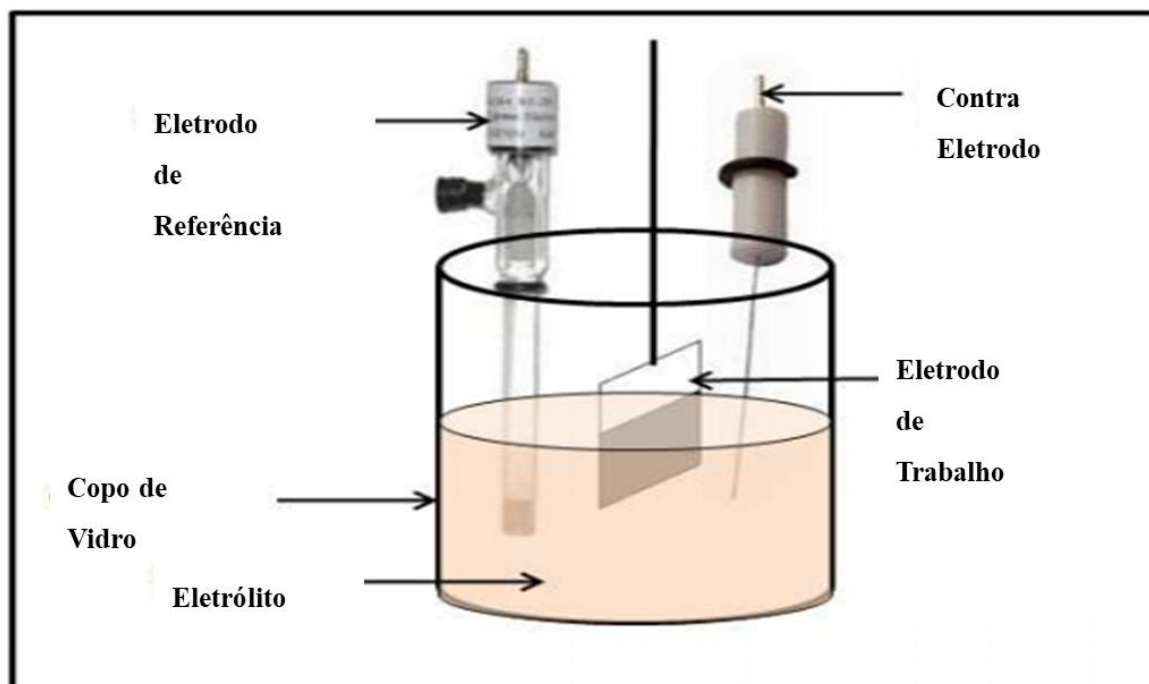


Figura 12 - Configuração de uma célula eletroquímica de três eletrodos (adaptados de Joshi P. S. at.al.³).

4.Experimental

4.1 Materiais

Os reagentes utilizados no presente trabalho são mostrados na **Tabela 1** com o grau de pureza, massa molar e empresa.

Tabela 1 - Reagentes, grau de pureza, peso molecular e fornecedor.

Reagentes	Grau de Pureza(%)	Massa Molar(g/mol)	Empresa Fornecedora
Acetato de Zinco(AcZn)	98%-101%	219,53	Synth
Álcool Polivinílico(PVA)		104.500,00	Neon
D -(+) Glucose		180,16	Sigma Aldrich
Glucose Oxidase from <i>Aspergillus niger</i>			Sigma Aldrich
Nafion			Sigma Aldrich

Fonte: tabela elaborada pelo autor

4.2 Preparação das nanofibras de Compósitas

Primeiramente, foi preparada uma solução de PVA 12,4% (m/v) em água destilada. Essa solução foi deixada sobre agitação e aquecimento a uma temperatura entre 80 °C e 90 °C durante 2 horas para que houvesse completa solubilização do polímero e homogeneização da mistura. Posteriormente, foram preparadas soluções de acetato de zinco (AcZn) a partir da solubilização de 0,3 g, 0,6 g e 1,2 g em 3 mL de água para alcançar uma razão mássica PVA:AcZn de 2:1, 1:1 e 1:2, respetivamente. Em seguida, as soluções de AcZn foram vertidas sobre 5 mL da solução de PVA a mistura foi agitada por três minutos para formar uma solução homogênea da razão mássica desejada. Após o preparo as soluções aquosas foram deixadas em repouso de um dia para outro.

Para os experimentos de eletrofiação foi utilizado um equipamento como mostrado na **Figura 13**. As soluções aquosas anteriormente preparadas foram transferidas para uma seringa de 5 mL (0,7 x 30 mm) e acoplada numa bomba infusora (Harvard Apparatus 22), ajustada para

trabalhar em uma vazão de 0,20 mL/h. A agulha da seringa foi conectada ao terminal positivo de uma fonte de alta tensão sobre uma tensão de 22 kV, enquanto um coletor metálico foi conectado ao terminal negativo. A distância do tubo capilar e do coletor utilizado foi de 15 cm. Esses parâmetros do processo de eletrofiação foram mantidos constantes para todas as soluções preparadas. As nanofibras foram coletadas diretamente de um coletor metálico, estático, de chapa circular com espessura de 1,40 mm e diâmetro de 32 cm. Os experimentos de eletrofiação foram realizados controlando-se a umidade relativa, mantendo sempre em uma média de 60% e temperatura e pressão ambiente (em torno de 25 °C e 1 atm).

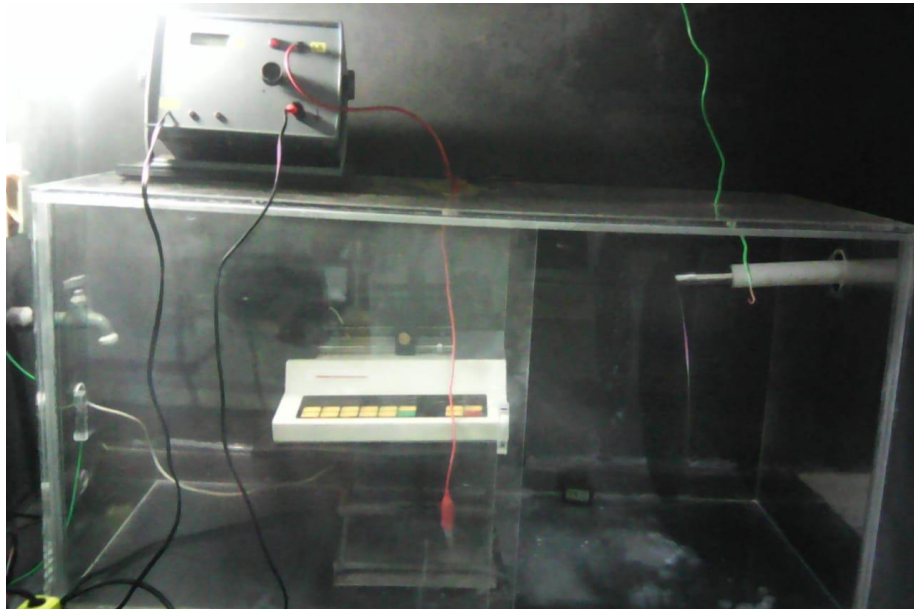


Figura 13 - Aparato da eletrofiação utilizado para produção das nanofibras.

4.3.Preparação das soluções utilizadas nos testes eletroquímicos

Solução-tampão fosfato (PBS) 0,1 mol/L, com pH 7,2, foi preparada a partir de uma solução 1 mol/L de hidrogenofosfato de sódio (Na_2HPO_4) e 1 mol/L de dihidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4). Essa solução tampão foi utilizada como eletrólito suporte e também no preparo da solução de glicose oxidase (GOx). A solução enzimática foi preparada pela adição de 3 mg de GOx em 1 mL da solução PBS 0,1 mol/L preparada anteriormente. Foi também preparada uma solução 1 mol/L de D-Glicose dissolvendo-se 1,80 g de D-Glicose em 10 mL de água destilada e essa solução foi utilizada como analito de interesse.

4.4.Preparação das amostras para calcinação

As nanofibras compósitas passaram por tratamento térmico com temperatura pré-determinada para obtenção das nanofibras de ZnO. Para isso, as amostras foram colocadas em cadinhos de porcelana, estável e resistente a altas temperaturas, e levadas para um forno do tipo mufla, da marca Quimis, como mostrado na **Figura 14**. As amostras foram tratadas termicamente nas temperaturas de 500 °C, 600 °C e 700 °C como objetivo de estudar a influência da temperatura na morfologia das nanofibras de ZnO. Após chegarem à temperatura requerida, a amostra permaneceu nela por 2 horas. A taxa estimada, com que as amostras foram aquecidas foi de aproximadamente 5 °C/min. As seguintes denominações foram dadas para as amostras não calcinadas PVA, 2:1, 1:1 e 1:2, enquanto as calcinadas foram identificadas por 2:1(500 °C), 2:1(600 °C), 2:1(700 °C); 1:1(500 °C), 1:1(600 °C), 1:1(700 °C); 1:2(500 °C), 1:2(600 °C), 1:2(700 °C).



Figura 14 - Cadinho de porcelana utilizado na calcinação.

4.5. Preparação dos eletrodos

Os eletrodos foram preparados pelo método de evaporação do solvente (*casting*), **Figura 15**. Antes de revestir a superfície do eletrodo de carbono vítreo (CGE), os mesmos foram polidos com uma pasta de alumina e lavados rigorosamente com etanol e água. Para a preparação dos eletrodos modificados 2 mg de nanofibras de ZnO foram dispersas em 1 mL de água destilada. A dispersão resultante foi colocada em banho de ultrassom por 1 hora para dispersar completamente o material. Posteriormente, 5 μ L dessa dispersão foram gotejados na superfície do eletrodo e deixado secar a temperatura ambiente. Em seguida, 5 μ L de solução de Nafion(5%) foram gotejados em cima do ZnO para que houvesse a fixação do material no eletrodo. O eletrodo modificado apenas com nanofibras de ZnO foi denominado CGE/ZnO.

Foram preparados também eletrodos modificados com ZnO e GOx. Para o preparo desse eletrodo foi utilizado o mesmo procedimento acima, exceto que nesse caso 5 μ L da solução de GOx foram gotejados após a secagem do ZnO, seguida da adição de Nafion[®]. O eletrodo modificado com GOx recebeu a denominação de CGE/ZnO/GOx.

Para efeito de comparação, o eletrodo de carbono vítreo sem modificação também foi testado e recebeu a denominação de CGE.

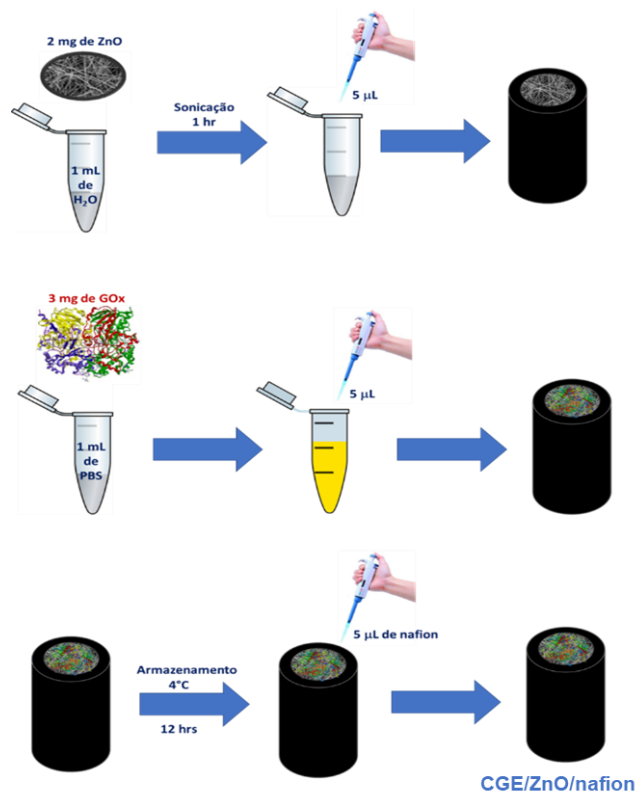


Figura 15 - Esquema de preparação dos eletrodos de carbono vítreo modificados com ZnO e GOx.

4.6. Instrumentação e procedimentos analíticos

Técnica de voltametria cíclica foi realizada utilizando um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT controlado pelo software Nova 1.8. As medidas voltamétricas foram realizadas em uma célula de vidro de compartimento único. A célula tem capacidade de 50 mL, com compartimentos para o posicionamento de três eletrodos. Como eletrodo de trabalho foram utilizados os eletrodos CGE, CGE/ZnO e CGE/ZnO/GoX; como eletrodo auxiliar foi utilizado fio de Pt e de referência um eletrodo de calomelano saturado ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ (solução saturada), $E^\circ = 0,2444 \text{ V}$). Todos os potenciais são referentes a esse eletrodo de referência. Os voltamogramas cíclicos foram adquiridos na faixa de potencial de $-0,2 - 0,8\text{V}$ a uma taxa de varredura de $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ em 30 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,2. Para o teste de estabilidade foram realizados 300 ciclos com uma varredura de 50 mV/s. Todos os experimentos eletroquímicos foram realizados a temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$).

5. Caracterizações

5.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Para identificar os grupos químicos presentes nas nanofibras, foi utilizado o equipamento marca Perkin Elmer, modelo Spectrum Two para obter espectros FTIR, via UATR, na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} .

5.2. Espectroscopia Raman

Para caracterizar a formação de ZnO nas nanofibras calcinadas foi utilizado o equipamento Alpha 300, marca Witec e laser 532 nm para se obter espectros Raman na faixa de 200 a 700 cm^{-1} .

5.3. Espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (EDS)

A composição química das nanofibras, antes e após a calcinação, foi analisada por meio da técnica de espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (EDS) pelo uso do equipamento Ox-Ford Instruments, modelo X-Act operando a 25 kV.

5.4. Difractometria de raios-X

As estruturas cristalinas das nanofibras de ZnO formadas após a calcinação das nanofibras compósitas, foram caracterizadas por meio da técnica de difratometria de raios-X pelo uso do equipamento Shimadzu, XRD - 6000 e fonte $\text{Co K}_\alpha = 1,78897 \text{ nm}$. Tensão de 40 kV, corrente de 30,0 mA, faixa de varredura 2θ ($10^\circ - 80^\circ$) e velocidade de varredura 2 $^\circ/\text{min}$. Para o cálculo do tamanho dos cristalitos foi utilizado a fórmula de Debye Scherrer⁶².

5.5. Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia das nanofibras compósitas (PVA/AcZn) e nanofibras de ZnO foram analisadas por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) pelo uso do equipamento Quanta 250, marca FEI-MEV e metalizadas com uma fina camada de ouro pelo

uso do metalizador Bal-tec, modelo SCD 050. O diâmetro das nanofibras foi estimado com a ajuda do software Size Meter versão 1.1 a partir da contagem de 40 fibras diretamente da imagem de MEV.

5.6. Análise Termogravimétrica (TG)

As nanofibras compósitas (PVA/AcZn) antes e após a calcinação foram submetidas a variação de temperatura num analisador TGA, da marca TA Instruments, modelo Q50, operando na faixa de temperatura entre 30°C a 800°C, com uma taxa de aquecimento de 10°C/min, utilizando fluxo de 50mL/min de ar sintético. Para melhor compreensão das perdas de massas foi realizado a DTG das nanofibras de PVA e compósitas não calcinadas.

5.7. Condutividade Elétrica

Medidas da condutividade elétrica das soluções poliméricas de PVA, 2:1, 1:1 e 1:2 foram realizadas por meio do uso de um Condutivímetro MS Tecnocon Instrumentação, marca Lucadema, modelo Luca-150.

6. Resultados e Discussões

6.1. Caracterizações morfológicas e estruturais das nanofibras de ZnO

Diversos fatores influenciam nas propriedades das nanofibras obtidas pela técnica de eletrofição, os quais podem ser categorizados em 4 grupos: i) propriedades do polímero; ii) propriedades da solução, ii) parâmetros do processo da eletrofição e; iv) condições ambientais. Além do mais, a temperatura de calcinação das nanofibras para a formação do óxido também pode influenciar nas propriedades das mesmas. Nesse trabalho, os parâmetros relacionados ao processo de eletrofição, tais como concentração da solução poliméricas, tensão, distância da agulha ao coletor, e vazão da solução, bem como a temperatura e umidade foram mantidas constantes em todos os experimentos realizados. No entanto, foram avaliados os efeitos da adição de diferentes quantidades de AcZn e da temperatura de calcinação nas propriedades das nanofibras formadas. Na primeira etapa do trabalho, diferentes soluções de PVA/AcZn em razões mássicas 2:1, 1:1 e 1:2 foram eletrofiadas. Posteriormente, essas nanofibras foram calcinadas nas temperaturas de 500 °C, 600 °C e 700 °C por 2 horas, para que houvesse a remoção do polímero e a formação de fibras, de preferência altamente cristalinas. Além disso, foi eletrofiada a solução de PVA para se obter nanofibra pura de PVA.

A decomposição térmica das nanofibras eletrofiadas foi investigada utilizando análise de curvas de TG e os resultados são apresentados na **Figura 16**. Para as nanofibras de PVA puro, **Figura 16(a)** foram observados quatro estágios de perda de massa. No primeiro estágio, na faixa de 184 – 263 °C, observou-se uma perda de massa de 10%, a qual está relacionada a evaporação da água adsorvida. Entre 263 – 410 °C, observa-se perda 50% de massa correspondente a desidratação parcial do PVA seguida pela formação do polieno. Na faixa de 410- 464 °C ocorre uma perda de massa de 17% da decomposição do poliéster na posição do carbono terciário para formação de macrorradicais, seguida da destruição desses macrorradicais

que contém oxigênio e a decomposição dos macrorradicais do polieno em derivados cis e trans. No último estágio na faixa de 464 – 559 °C há uma perda de massa de 22,95%, que é referente a termo-oxidação do resíduo carbonizado⁶³. Acima de 559°C nenhuma perda de massa foi observada, mostrando que acima dessa temperatura todo o PVA já está totalmente degradado resíduos volatilizados. Já para o acetato de zinco dihidratado o primeiro estágio de perda de massa ocorre entre 64-104 °C e é decorrente da remoção da água de cristalização do $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ e a formação de acetato de zinco anidro com 21% de perda de massa. Entre 175-360 °C cerca de 75% de massa é perdida devido a decomposição adicional do acetato de zinco anidro que tem um valor teórico de 46,5% de perda de massa se o ZnO puro é o único resíduo. Esta diferença de 27,5% pode ser devido a sublimação de compostos de acetato de zinco ou a compostos voláteis de zinco^{64,65}.

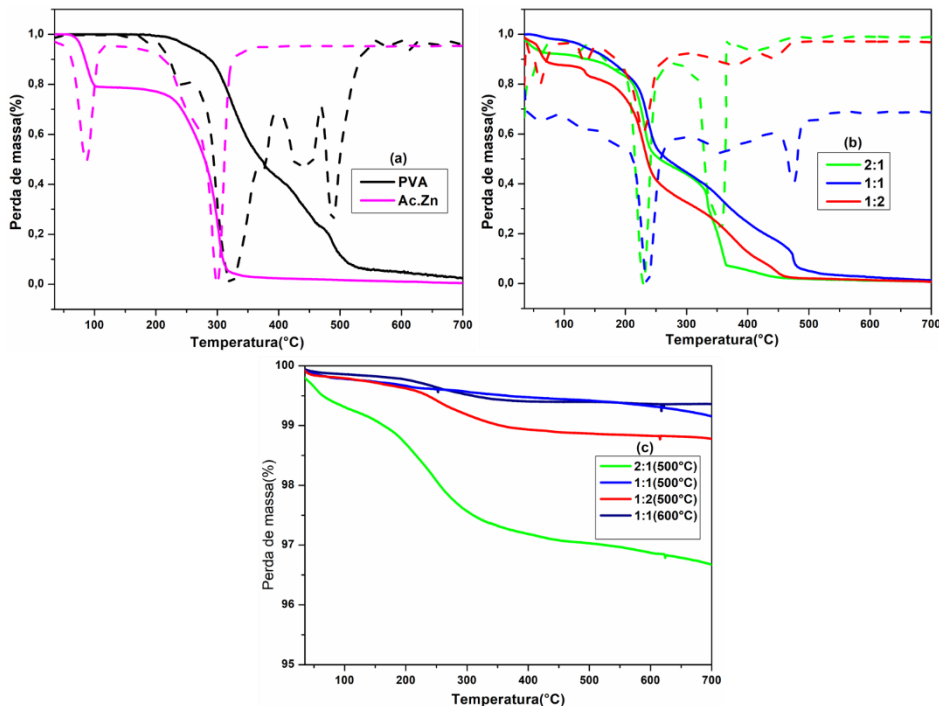


Figura 16 - TG (a) Acetato de Zinco comercial e nanofibras de PVA (b) Nanofibras compósitas (c) Nanofibras compósitas calcinadas a 500 °C e 1:1(600°C). Em pontilhado, as curvas dTG/dT para as respectivas curvas de TGA.

Para as nanofibras compósitas como mostrado na **Figura 16(b)** com uma menor relação (2:1), essas apresentaram 4 estágios de decomposição: 1) região entre 35-87 °C (8%); 2) região entre 102 – 365°C (92%) 3) região entre 366 – 443°C (0.05%). Os primeiros estágios são decorrentes da evaporação da água adsorvida, da desidratação de água cristalina e de uma lenta decomposição parcial do acetato de zinco e PVA. Enquanto os estágios finais são decorrentes da degradação da matéria orgânica do PVA e do acetato de zinco, com uma grande perda de massa de 92,05%.

Foram observados 4 estágios de perda de massa nas nanofibras obtidas da solução PVA/AcZn (1:1), que são os seguintes: 1) na região entre 50- 84°C (3%); 2) entre 88-324°C (57%); 3) na região entre 325- 445°C (23%); 4) entre 446-600°C (17%). Pode-se dizer que os estágios 1 e 2 são decorrentes da evaporação de água adsorvida, da desidratação de água cristalina e da decomposição parcial do acetato de zinco e PVA, assim como na condição 2:1. A partir do estágio 3 há uma perda acentuada de massa, cerca de 40% indicando que acima da temperatura de 600°C todo material foi consumido. Esses últimos estágios são correspondentes a degradação da matéria orgânica provenientes do PVA e do acetato de zinco, indicando que essa degradação ocorre em diferentes etapas.. Em relação as nanofibras compósitas 1:2, o mesmo fenômeno foi observado, ou seja, uma degradação em diferentes etapas, relacionadas a evaporação da água e degradação da matéria orgânica.

Foram realizadas ainda análises de TG para as amostras depois de calcinadas a 500°C e 1:1(600°C) para verificar se ainda havia a presença de matéria orgânica após o processo de calcinação. Como mostrado nas análises termogravimétricas na **Figura 16(c)**, todas as nanofibras compósitas não apresentaram vestígios de material orgânico, o que era esperado pelas análises. Portanto, indica que o material inorgânico ZnO esperado foi formado após a calcinação.

As nanofibras obtidas da solução de PVA e de PVA/AcZn com diferentes razões mássicas de AcZn foram caracterizadas por MEV e EDS. As imagens de MEV e os histogramas de distribuição dos diâmetros das fibras são mostrados na **Figura 17**.

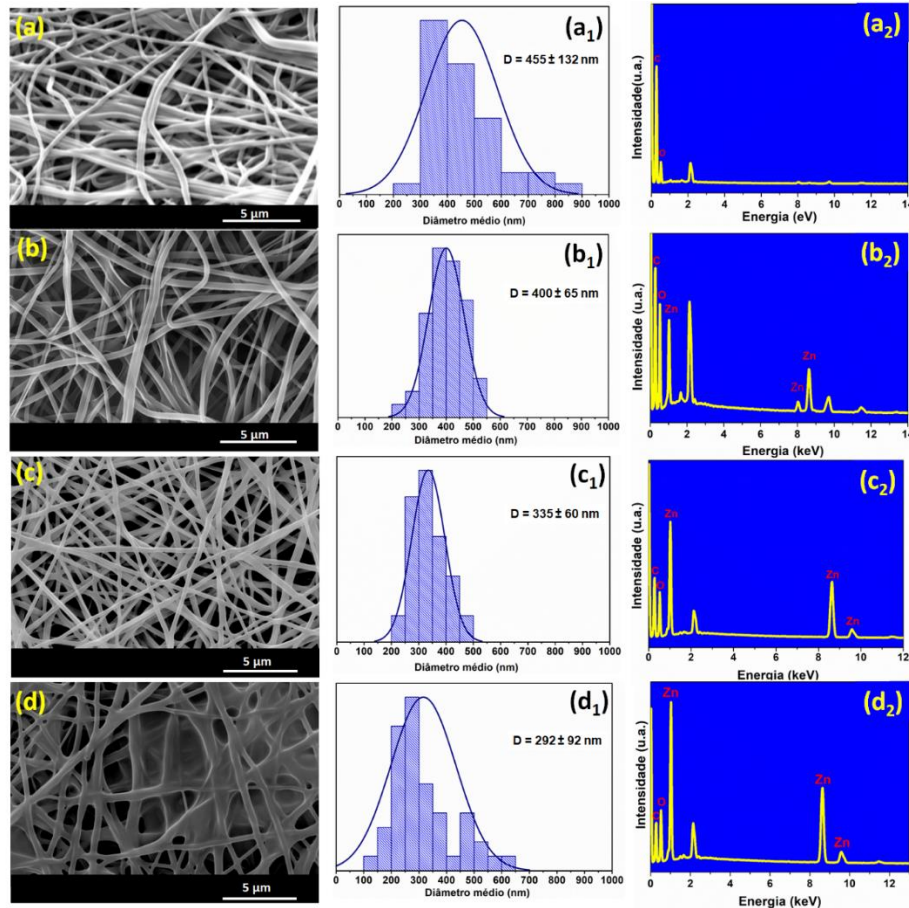


Figura 17 - Imagens de MEV: (a) PVA, (b) 2:1, (c) 1:1 e (d) 1:2; , Histograma de distribuição de diâmetros: (a₁) 1:0, (b₁) 2:1, (c₁) 1:1 e (d₁) 1:2. Espectros de EDS: (a₂) 1:0, (b₂) 2:1, (c₂) 1:1 e (d₂) 1:2.

A presença de AcZn na solução eletrofiada não afeta drasticamente a morfologia das fibras, ou seja, as nanofibras permaneceram com a superfície lisas e sem formação de “beads”. Entretanto, a presença do sal afeta o diâmetro das fibras. Foi observada uma leve diminuição no valor do diâmetro médio de 455 nm nas fibras obtidas da solução de PVA puro para 400 nm nas fibras compósitas 2:1. Com o aumento da quantidade de acetato de zinco na solução eletrofiada, foi observada uma redução ainda maior no diâmetro médio das fibras, chegando a 292 nm quando a razão foi de 1:2. Essa redução no diâmetro das fibras pode estar relacionada

a presença do sal, a qual aumenta a densidade de carga da solução na eletrospinação, o qual impõe maior estiramento no jato ejetado do capilar devido a repulsão do excesso de cargas nas cadeias do polímero exposto ao campo elétrico, o que resulta em fibras mais finas, alongadas e com estreita distribuição de tamanho⁶⁶.

Análises de EDS foram realizadas para verificar a presença de contaminantes e também a presença do acetato de zinco nas nanofibras formadas, como mostrado na **Figura 17 (a1-d1)**. Análises estas que mostraram a presença dos elementos carbono, oxigênio e zinco nas fibras compósitas, confirmando a presença de acetato de zinco e PVA.

Nesse estudo, foram avaliadas mudanças na condutividade elétrica da solução após a adição de acetato de zinco, como mostrado na **Figura 18**.

O aumento na condutividade elétrica foi observado em relação a solução PVA/água com a adição de pequenas quantidades de sais. A presença do acetato de zinco aumenta a densidade de carga da solução, como mencionado anteriormente, e justifica a redução do diâmetro das fibras para as nanofibras compósitas.

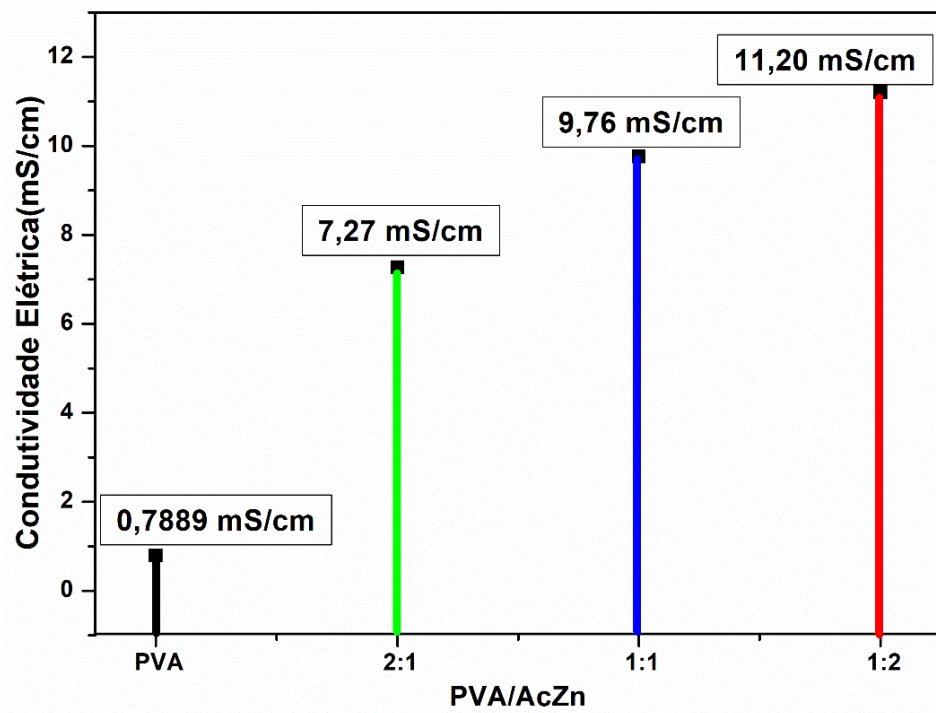


Figura 18- Perfil de Condutividade Elétrica x Razão PVA/AcZn.

Nas **Figuras 19, 20 e 21**, são mostradas as imagens, histograma de distribuição de tamanhos e os espectros de EDS das nanofibras compósitas 2:1, 1:1 e 1:2, respectivamente, e calcinadas a 500 °C, 600 °C e 700 °C por duas horas. Foi observado que a temperatura de calcinação tem influência direta na morfologia das nanofibras mas de maneira distinta em relação a variação da razão mássica.

As nanofibras obtidas na razão 2:1 (calcinadas a 500 °C), **Figura 19(a)**, apresentaram-se contínuas e com pouca rugosidade, sem a presença de nanogrãos. A maior quantidade de nanogrãos foi observada nas nanofibras 2:1 (calcinadas a 600 °C), **Figura 19(b)**, porém o formato das fibras é mantido. A completa remoção do polímero, que ocorre acima de 600 °C, e a nucleação e crescimento de cristais de ZnO justificam esse comportamento. A calcinação a 700 °C, **Figura 19(c)**, leva a formação de grande quantidade de grãos interconectados. A análise do diâmetro das fibras calcinadas a 500 °C mostram que houve uma redução do diâmetro médio após o tratamento térmico, passando de 400 nm (antes da calcinação) para 110 nm após serem

calcinadas a 500 °C. Essa drástica redução no diâmetro está relacionada a remoção do PVA, o qual tem um papel fundamental na formação de nanofibras de óxidos metálicos, que é a de encapsular o precursor e formar os fios. Com a sua remoção as fibras se tornam mais finas e frágeis.

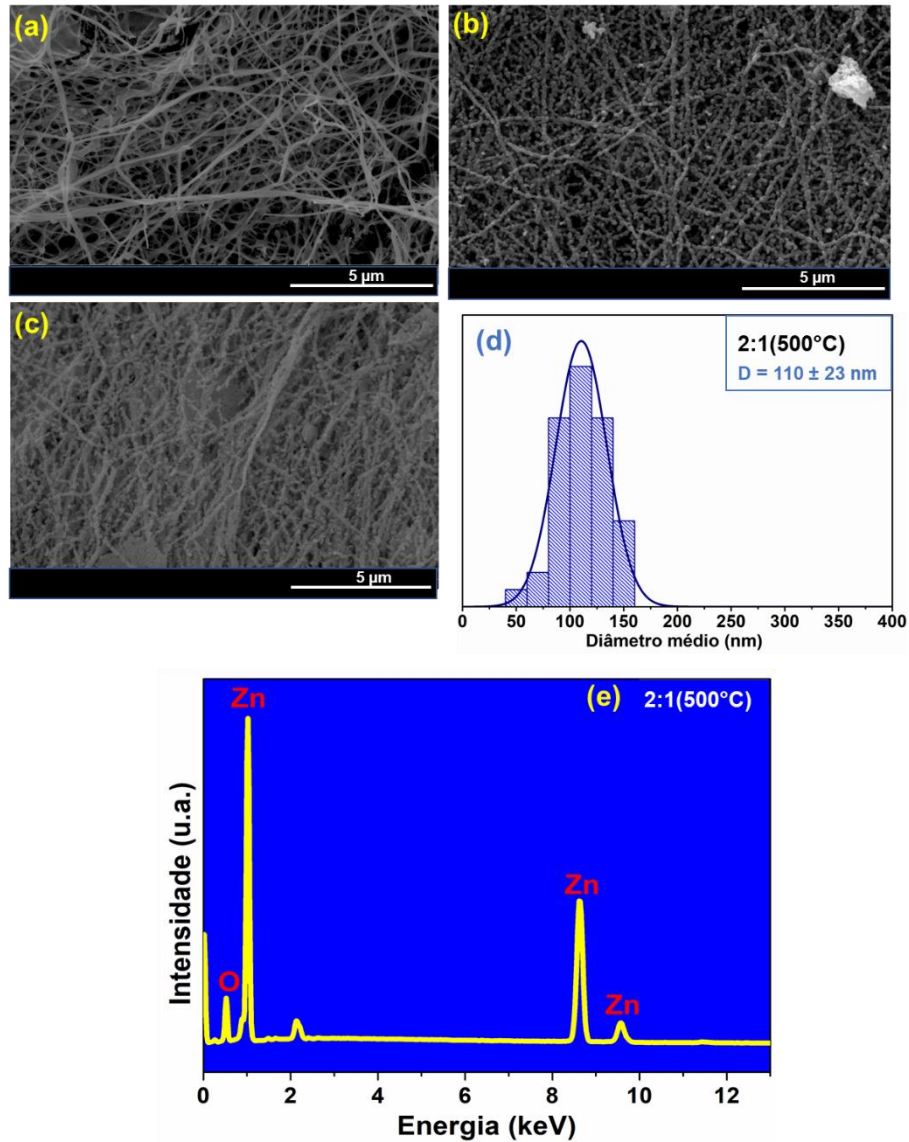


Figura 19 - Imagem de MEV amplificação 20000x das nanofibras 2:1 Calcinadas (a) 500 °C, (b) 600 °C, (c) 700 °C por 2 horas. Histograma de distribuição de diâmetros (d) 2:1(500 °C). Espectro de EDS das nanofibras calcinadas; (e) 2:1(500 °C).

Em relação a amostra 1:1 (calcinada a 500 °C), **Figura 20(a)**, a temperatura de 500 °C é o suficiente para formação de grãos de ZnO, interconectados. Em 600 °C a amostra de razão

1:1, **Figura 20(b)**, as fibras e os grãos soltos se unem para formar estruturas contínuas, devido a nucleação e o crescimento dos cristalitos de ZnO. As análises de diâmetro mostraram que as nanofibras obtidas nessa temperatura apresentaram diâmetro médio de 216 nm, também menor que o diâmetro médio da amostra antes da calcinação. Acima de 700 °C a razão 1:1, **Figura 20(c)**, o formato de fibras é desfeito e partículas de ZnO aparecem na forma de aglomerados.

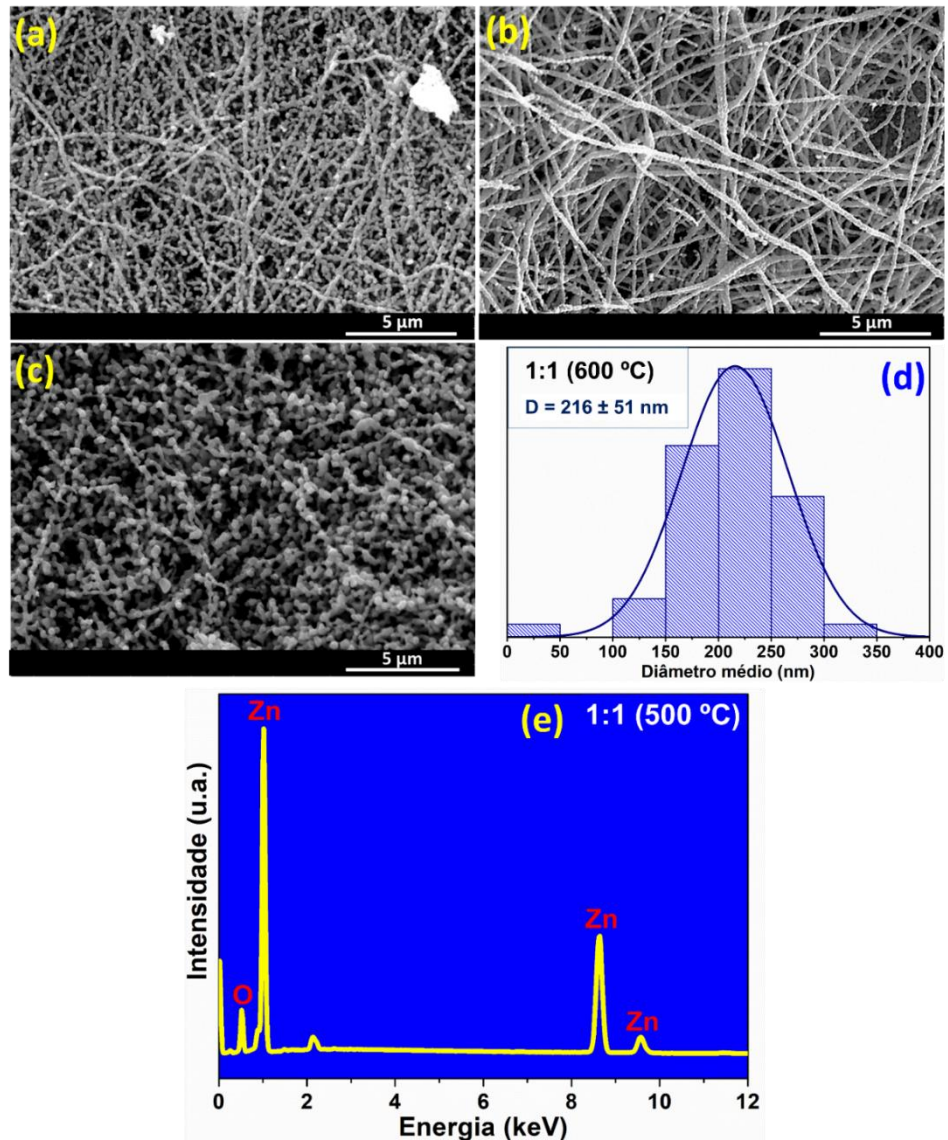


Figura 20 - Imagens de MEV das nanofibras 1:1, Calcinadas: (a) 500 °C, (b) 600 °C, (c) 700 °C por 2 horas. Histograma de distribuição de diâmetro: (d) 1:1(600 °C). Espectro de EDS das nanofibras calcinada; (e) 1:1(500°C).

As fibras que foram obtidas a partir da solução com maior teor de acetato de zinco, 1:2 ao serem calcinadas na temperatura de 500 °C, **Figura 21(a)**, mostraram grande quantidade de grãos aglomerados e conectados, em formato de fibras. O aumento da temperatura de calcinação favorece o crescimento dos grãos perdendo a forma de fibras, como observado nas fibras calcinadas a 600 °C, **Figura 21(b)**. Já em 700 °C, **Figura 21(c)**, os grãos mantêm a conectividade ao longo das fibras. Os resultados do cálculo do diâmetro médio obtido para as nanofibras calcinadas a 700 °C foram de 203 nm, mostrando da mesma forma que a remoção do polímero afeta na morfologia e diâmetro das fibras. De acordo com os resultados apresentados acima, conclui-se que o equilíbrio entre a concentração de AcZn e a temperatura são essenciais para que os cristais de ZnO cresçam sem perder o formato de fios.

Os EDS para as amostras 2:1, 1:1 e 1:2 e calcinadas a 500 °C são mostradas nas **Figuras 19(d), 20(d) e 21(d)**, respectivamente. A análises dos elementos na superfície das amostras mostraram apenas presença de Zn e O e não mostraram o elemento carbono, o que confirma a remoção do PVA e a pureza do material obtido.

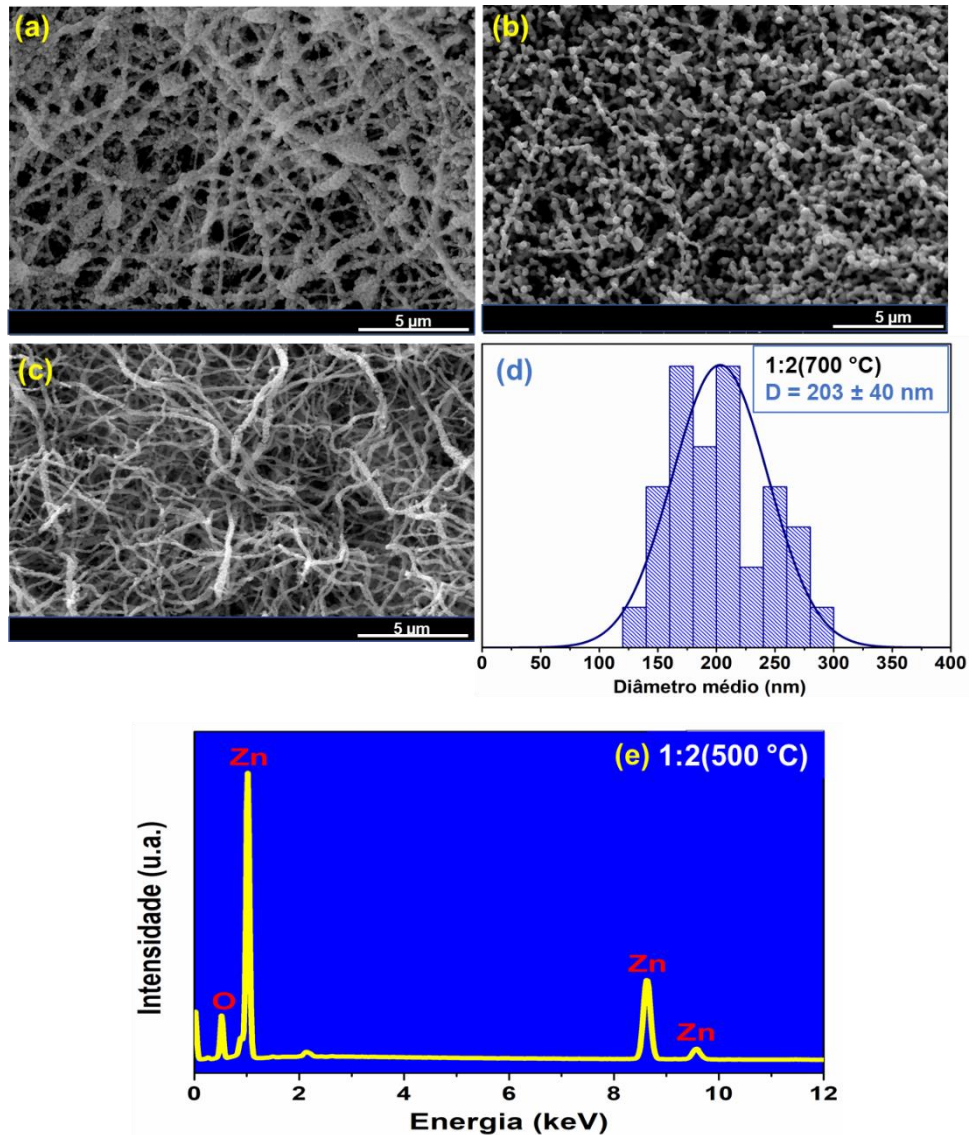


Figura 21 - Imagens de MEV amplificação 20000x das nanofibras 1:2. Calcinadas: (a) 500 °C, (b) 600 °C, (c) 700 °C por 2 horas. Histograma de distribuição de diâmetro: (d) 1:1(600 °C). Espectro de EDS das nanofibras calcinada(e) 1:1(500 °C).

Análises de espectroscopia de FT-IR, **Figura 22**, foram realizadas para identificar os grupos químicos presentes nas fibras compósitas e verificar se o PVA após a calcinação a 500 °C foi removido.

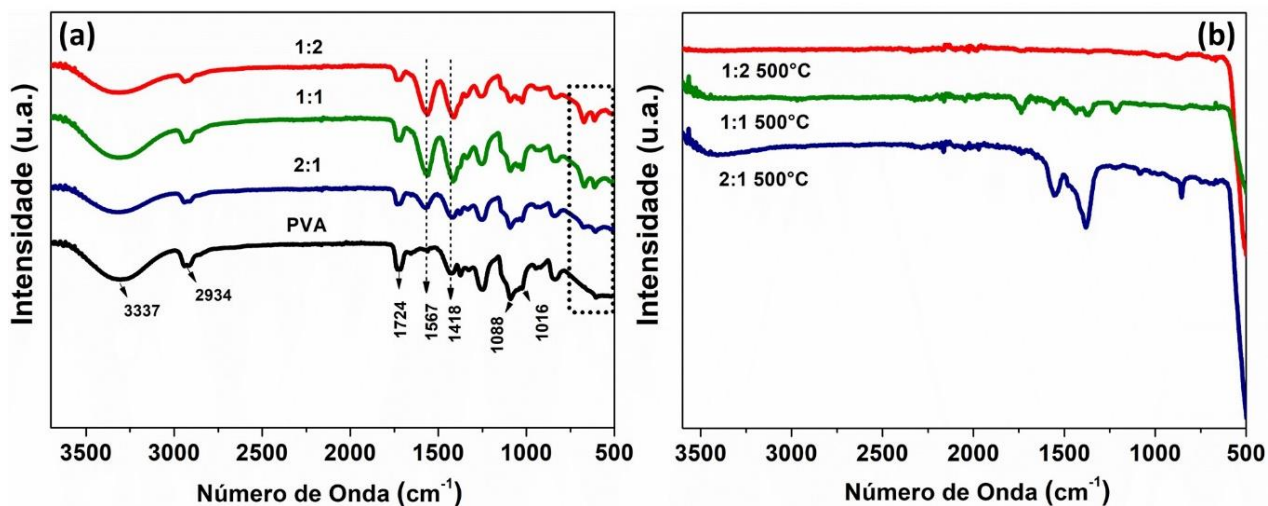


Figura 22 - Espectros de FT-IR: (a) nanofibras antes da calcinação e (b) nanofibras após calcinação à 500 °C.

Na **Figura 22(a)** são apresentados os espectros de FT-IR das nanofibras de PVA e das nanofibras compósitas, não calcinadas. No espectro FT-IR de fibras obtidas da solução de PVA observa-se somente as bandas características do polímero, como por exemplo em 3337 cm^{-1} , 2934 cm^{-1} , 1724 cm^{-1} , as quais são atribuídas ao estiramento O-H, modo alongamento C-H, ao grupo carbonila (C=O), respectivamente⁶⁷. Foi observado o surgimento de novas bandas nos espectros FT-IR das nanofibras compósitas, as quais se intensificam com o aumento da quantidade de acetato de zinco. Por isso, foram atribuídas a grupos do íon acetato e da interação acetato-zinco. Por exemplo, duas bandas intensas em 1567 cm^{-1} e 1418 cm^{-1} são atribuídas aos estiramentos assimétricos e simétricos de grupos carboxilatos (COO^-), provenientes dos íons acetato. Outras bandas em 1063 cm^{-1} e entre 500 – 700 cm^{-1} são os modos de deformação e frequência do grupo $-\text{CH}_3$ ⁶⁸ e os modos de estiramento da ligação Zn-O, confirmando a formação das fibras nanocompósitas PVA/AcZn.

Nos espectros de FT-IR das nanofibras compósitas calcinadas a 500 °C, **Figura 22(b)**, foi observado que todas as nanofibras mostraram uma banda larga na região entre 500-600 cm^{-1} indicando vibração do tipo flexão de ZnO. Entretanto, foi observado que as nanofibras de razão 2:1 e 1:1 apresentaram bandas características de matéria orgânica residual, como

discutido na análise de TG, **Figura 22(b)**. Esses resultados sugerem que a temperatura de 500 °C não foi suficiente para obtenção de nanofibras de ZnO puras e que as nanofibras compósitas 2:1 e 1:1 necessitam de temperatura superior a 500 °C para completa remoção da matéria orgânica. Por outro lado, as fibras com maior teor de zinco 1:2, calcinadas a 500 °C não apresentaram indícios da presença de matéria orgânica. Isto indica que o um alto teor de zinco auxilia na degradação da matéria orgânica (PVA) a 500 °C. Assim, infere-se que a reação deve ser via formação de radicais livres e uma maior quantidade de ZnO pode induzir a completa degradação do polímero. Os modos de vibração citados acima são mostrados na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Atribuições das principais bandas de FTIR das nanofibras compósitas.

Número de Onda (cm ⁻¹)	Grupo Característico	Atribuído	Material
3337	O-H	Estiramento	PVA
2934	C-H	Alongamento	PVA
1724	C=O	Estiramento da ligação dupla do grupo carbonila	PVA
1576	O=C-O-	Estiramento do grupo <u>carboxilato</u>	Acetato de Zinco
1418	O=C-O-	Estiramento simétrico do grupo <u>carboxilato</u>	Acetato de Zinco
1063	-CH ₃	Deformação	Acetato de Zinco
500 – 700	-CH ₃	Frequência	Acetato de Zinco
500 – 600	<u>ZnO</u>	Vibração do tipo flexão	Acetato de Zinco

Fonte: tabela elaborada pelo autor

Análises de espectroscopia Raman também foram realizadas para acompanhar a formação das nanofibras de ZnO, **Figura 23**.

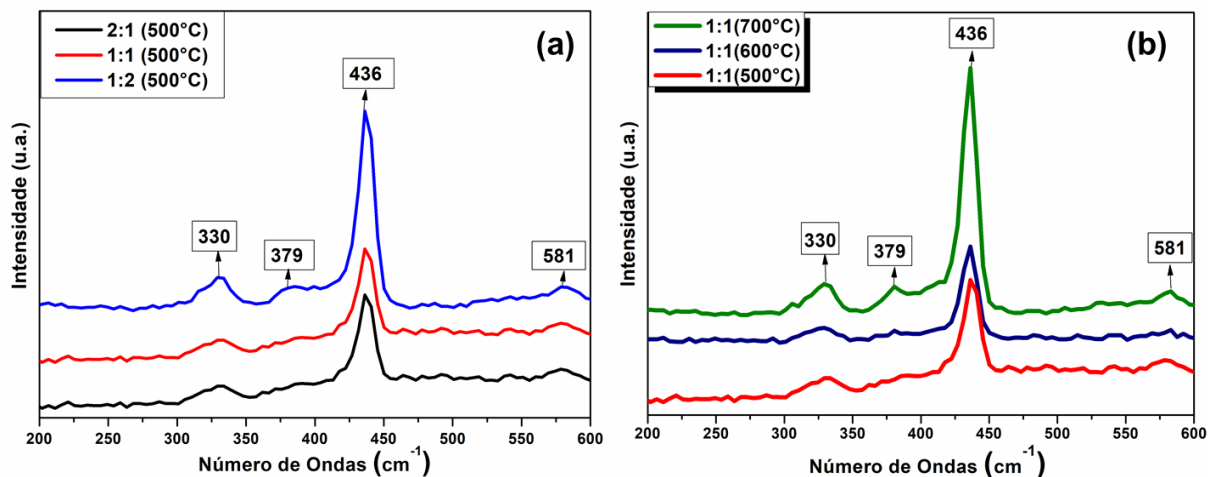


Figura 23 - Espectros Raman: (a) 2:1 / 1:1 / 1:2 calcinadas a 500 °C e (b) 1:1 (500 °C) / 1:1 (600 °C) / 1:1 (700°C).

Na **Figura 23(a)** são apresentados os espectros Raman das nanofibras de ZnO com várias razões PVA/AcZn obtidas após a calcinação a 500 °C e na **Figura 23(a)** são apresentados os espectros Raman das nanofibras de ZnO com razão PV/AcZn 1:1 obtidas após a calcinação a 500 °C, 600 °C e 700 °C. Em todas as amostras foram observados modos ativos característicos de ZnO. Por exemplo, em 436 cm^{-1} (E_2), em 330 cm^{-1} ($3E_{2H} - E_{2L}$), em 379 cm^{-1} (A_{1T}) e em 581 cm^{-1} (B_1). O pico em 436 cm^{-1} de maior se relaciona a estrutura hexagonal wurtzita das nanofibras de ZnO⁶⁹, enquanto que a banda em 330 cm^{-1} é decorrente do espalhamento múltiplo de fônon⁶⁹ e o pico em 581 cm^{-1} ocorre em virtude de defeitos estruturais como vacância de oxigênio, etc⁶⁹. Como mostrado nos espectros, com o aumento da quantidade de acetato de zinco adicionado à solução precursora das quais foram obtidas as fibras por eletrofiação, os picos ficam mais acentuados, caracterizando uma maior formação de ZnO. Para as nanofibras compósitas, calcinadas à 500 °C, 600 °C e 700 °C sob mesma razão 1:1, **Figura 23(b)**, os espectros mostraram os mesmos modos ativos, sendo que houve intensidade com o aumento da temperatura. Isso ocorre porque em temperaturas maiores forma-se uma fase mais cristalina de ZnO.

Os difratogramas das nanofibras compósitas (de PVA/AcZn), **Figura 24**, mostram claramente a natureza predominantemente amorfa. Apenas dois sinais estão presentes nos difratogramas, um halo em aproximadamente 22° e um sinal em 38° , os quais são característicos da estrutura semi-cristalina do PVA ⁷⁰. A adição e o aumento da quantidade de acetato de zinco, não leva a mudanças significativas nos difratogramas, observa-se apenas um leve alargamento do halo entre 25° e 30° .

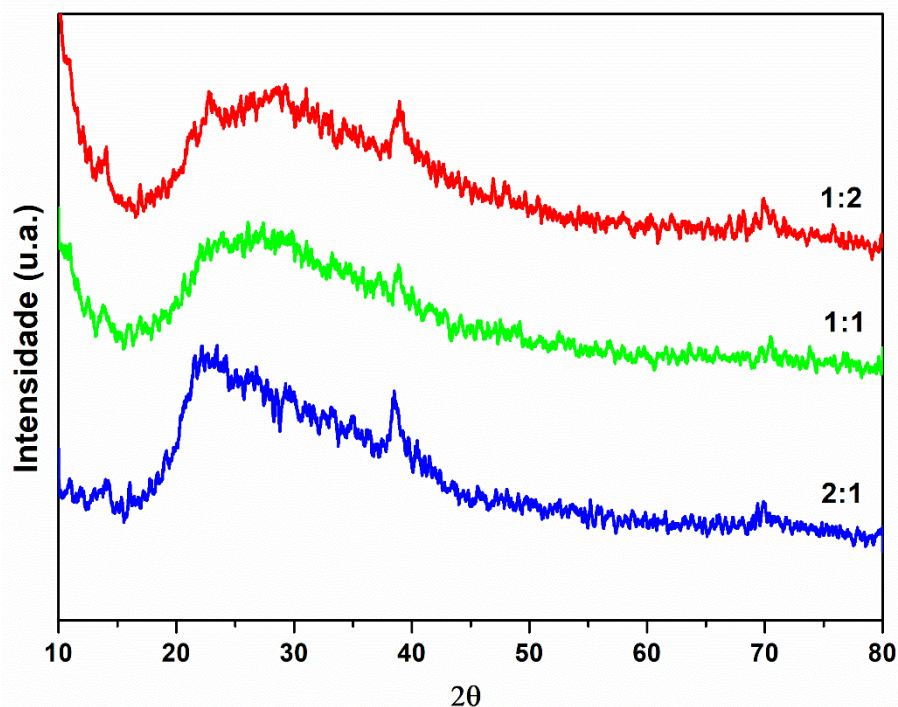


Figura 24 - Difratogramas das nanofibras compósitas de razões mássicas 2:1 / 1:1 / 1:2.

A calcinação das nanofibras levam a estruturas altamente cristalinas, como apresentado na **Figura 25**. Todos os difratogramas exibem picos que estão relacionados à única fase hexagonal do ZnO, a wurtzita, com planos em $37,08^\circ$ (103); $40,21^\circ$ (104); $42,37^\circ$ (105); $55,86^\circ$ (114); $66,77^\circ$ (205); $74,55^\circ$ (210); $78,96^\circ$ (213) (JCPDS card no. 36-1451). Os resultados do estudo da adição de AcZn na cristalinidade do material são mostrados na **Figura 25(a)**. Foi observado que o aumento da quantidade de acetato de zinco resulta em picos mais intensos e

estreitos, indicando uma maior cristalinidade das nanofibras de ZnO puro. Em relação ao ZnO comercial observa-se um leve deslocamento dos sinais de difração para menores valores de 2θ , conforme mostrado no *inset* da figura. O deslocamento dos picos de DRX pode estar relacionado a mudanças nos parâmetros de rede, como constantes de rede, volume de célula unitária, e tamanho de grão⁷¹, devido a síntese e calcinação do material. Quando se avalia o efeito da temperatura de calcinação nas nanofibras de ZnO, **Figura 25(b)**, observa-se também um ligeiro deslocamento nos picos de difração para menores valores de 2θ . De forma semelhante, esse deslocamento está relacionado a mudanças nos parâmetros de rede com o aumento da temperatura de anelamento. No entanto, essa variação é muito pequena, sendo a influência da temperatura mais refletida no tamanho dos cristalitos.

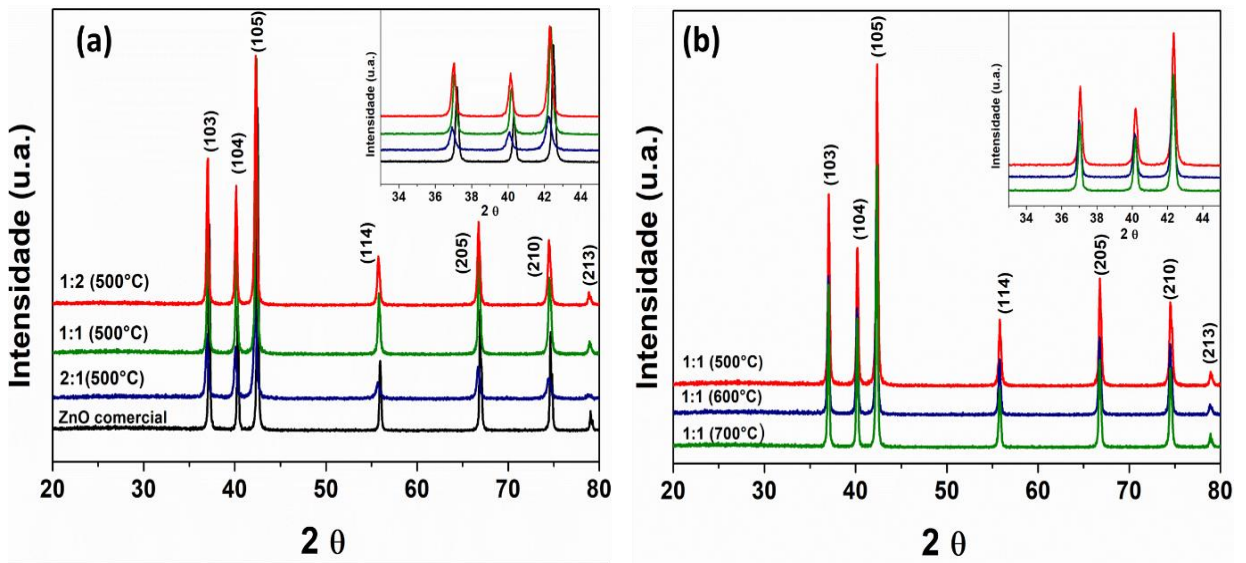


Figura 25 - Difratogramas de Raios-X: (a) 2:1(500 °C) / 1:1(500 °C) / 1:2(500 °C) e (b) 1:1(500 °C) / 1:1(600 °C) e 1:1(700 °C).

O diâmetro médio dos cristalitos foi calculado a partir das médias dos picos de difração obtidas utilizando a equação de Scherer:

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta}$$

Onde, D é o do grão numa orientação particular, $\kappa = 0,9$ é o fator forma λ é o comprimento de onda de raio X, θ é o ângulo de difração em escala 2θ , correspondente a uma orientação em particular e β é a largura a meia altura (FWHM = *Full With at Half Maximum*) do pico de difração. Os valores obtidos são mostrados na **Tabela 3**.

Tabela 3- Diâmetro Médio do Cristalito das nanofibras de ZnO, usando a fórmula de Debyer-Scherrer⁵⁴.

Diâmetro Médio do Cristalito (nm)							
Amostra (temperatura)	Planos cristalográficos						Média \pm DP*(nm)
	(103)	(104)	(105)	(214)	(205)	(210)	
ZnO comercial	4,4	4,6	4,0	3,5	3,8	3,3	3,9 \pm 0,5
2:1(500 °C)	2,6	2,6	2,3	2,2	2,5	1,7	2,3 \pm 0,3
1:1(500 °C)	4,0	3,7	3,9	2,9	2,7	2,3	3,2 \pm 0,7
1:2(500 °C)	3,2	3,1	3,4	2,6	2,8	2,4	2,9 \pm 0,3
1:1(600 °C)	3,5	3,5	3,7	3,2	3,1	2,7	3,2 \pm 0,3
1:1(700 °C)	4,0	3,7	3,9	2,8	3,1	2,5	3,3 \pm 0,6

Resultados da medida do tamanho dos cristalitos mostraram que houve uma ligeira diminuição do tamanho em relação a amostra comercial, e que o aumento da concentração de AcZn e um aumento da temperatura leva a um leve aumento no tamanho do cristalito. Esses resultados mostram que uma maior quantidade de acetato resulta numa melhor qualidade do cristal e que o aumento do tamanho do cristalito com a temperatura de calcinação é atribuído ao colapso dos pequenos cristais que, devido ao efeito de sinterização, formam aglomerados maiores.

6.2. Caracterização eletroquímica dos eletrodos modificados com nanofibras de ZnO e GOx (CGE/ZnO/GOx)

O desempenho do biossensor desenvolvido com as nanofibras de ZnO (CGE/ZnO/GOx) foi avaliado na detecção de glicose por voltametria cíclica. Para os testes eletroquímicos foram escolhidas as nanofibras sintetizadas na razão mássica 1:1 e calcinadas a 600 °C, pois foram a que apresentaram uma melhor estrutura morfológica. A manutenção da estrutura das nanofibras mesmo após a calcinação com alta cristalinidade é excelente para que o biossensor apresente uma melhor resposta eletroquímica. A estrutura em 1D ajuda a aumentar a condutividade do material reduzindo a resistência para o transporte de elétrons⁷².

Para demonstrar o desempenho eletroquímico do eletrodo modificado com nanofibras de ZnO e GOx, foram realizadas análises de voltametria cíclica com diferentes eletrodos, a fim de comparação. A **Figura 26(a)** mostra os voltamogramas dos eletrodos CGE, CGE/ZnO e CGE/ZnO/GOx em PBS 0,1 M (pH = 7,2) utilizando uma janela de potencial entre -0,2V e 0,8V e uma taxa de varredura de 10 mV.s⁻¹.

Pode ser visto a partir dos voltamogramas que na ausência de glicose os eletrodos puros (CGE) e o eletrodo modificado com nanofibras de ZnO apresentaram semelhante comportamento eletroquímico, enquanto o eletrodo CGE/ZnO/GOx mostrou um aumento na intensidade da corrente de pico de 35% quando comparado aos eletrodos CGE e CGE/ZnO. Esses resultados sugerem que a enzima GOx pode ser um excelente mediador de elétrons, melhorando a transferência de elétrons e a sensibilidade do sistema. A presença de glicose na solução, **Figura 26(b)**, leva a um aumento de cerca de 60% na magnitude da corrente de pico para o eletrodo CGE/ZnO/GOx em relação ao PBS puro, **Figura 26(c)**. Esse aumento significativo mostra que a glicose pode ser eletroquimicamente oxidada pela GOx imobilizada nas nanofibras de ZnO, mantendo uma alta bioatividade e estabilidade.

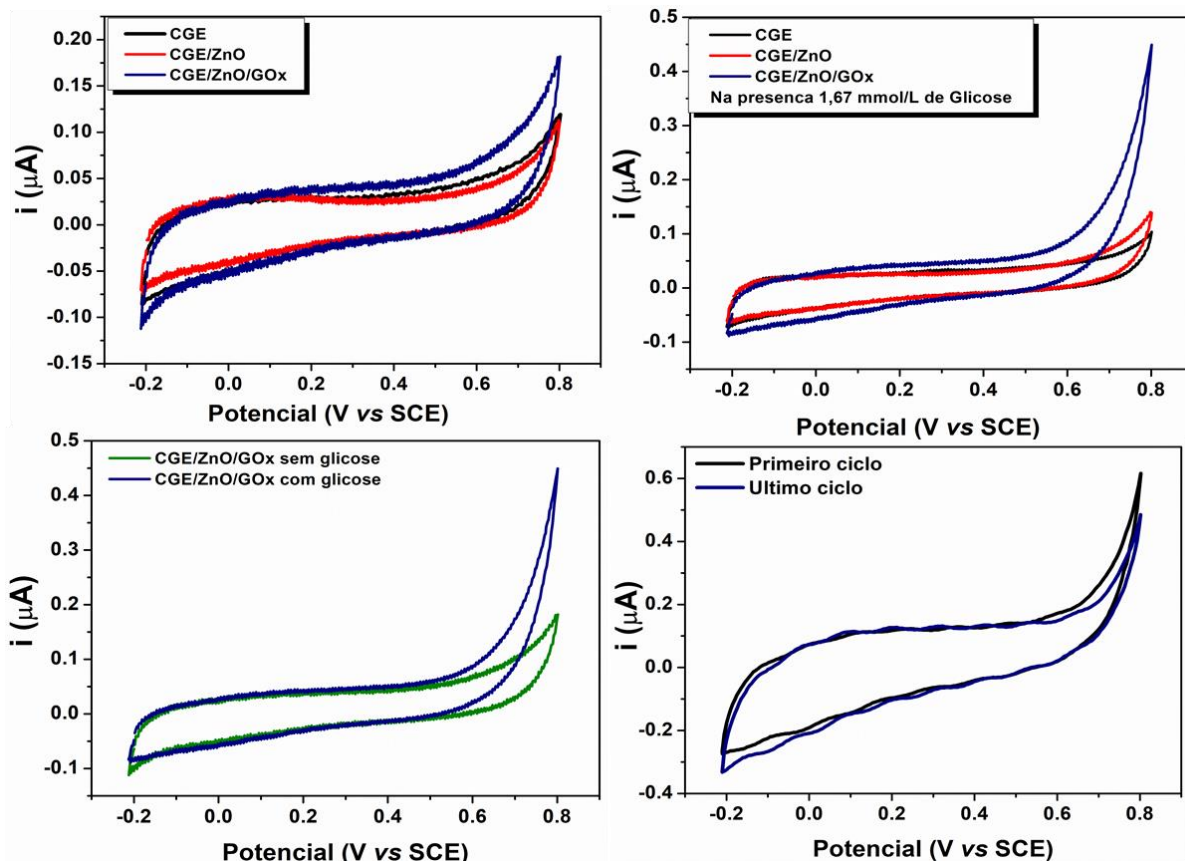


Figura 26 - Voltametria Cíclica (a) eletrodo de CGE; CGE/ZnO; CGE/ZnO/GOx em PBS 0,1 mol/L (pH=7,2) a $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; (b) em PBS 0,1 mol/L (pH=7,2) após a adição de 1,67 mmol/L de glicose a $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; (c) eletrodo de CGE/ZnO/GOx em PBS 0,1 mol/L (pH=7,2) com e sem adição de 1,67 mmol/L glicose $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

A estabilidade do biossensor CGE/ZnO/GOx foi estudada a partir da obtenção de 300 voltamogramas cíclicos sucessivos em PBS (pH 7,2) com 1,67 mmol/L de glicose a uma taxa de varredura de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, **Figura 26(d)**. Cerca de 75% do valor da corrente de pico inicial foram mantidos mesmo após 300 ciclos. Esse resultado mostra que a GOx imobilizada no eletrodo modificado apresenta uma boa estabilidade eletroquímica. A capacidade de imobilização da enzima GOx pelas nanofibras de ZnO está relacionada ao fato de o ZnO apresentar um ponto alto isoelétrico (PI = 9,5), enquanto a GOx tem um ponto isoelétrico igual a 4,2. Nas condições de trabalho, onde o pH do eletrólito foi igual a 7,2 a superfície do ZnO encontra-se carregada positivamente, e a da GOx negativamente⁷³. Dessa forma a interação eletrostática é altamente favorecida, levando a uma melhora na atividade da enzima. Além do

mais, a estrutura em 1D das nanofibras podem ainda melhorar o desempenho do biossensor devido a sua excelente capacidade de transporte de elétrons.

O processo eletródico de uma reação pode ser avaliado por meio de alguns parâmetros relacionados à influência da velocidade de varredura de potencial estudada por voltametria cíclica. Portanto, para obter informações sobre o processo eletroquímico entre o eletrodo modificado CGE/ZnO/GOx e o analito, o processo de oxidação da glicose foi estudado avaliando-se a influência da velocidade de varredura (v) no intervalo de $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ a $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ em PBS ($\text{pH} = 7,2$) com $1,67 \text{ mmol/L}$ de glicose, **Figura 27**. Como mostrado no *inset* da **Figura 27**, a corrente de pico aumenta linearmente com a raiz quadrada da taxa de varredura, e que a curva de i versus $v^{1/2}$ apresentou um excelente coeficiente de correlação ($r^2 = 0,9909$). Essa variação linear da corrente com a raiz quadrada da velocidade é característica de processos controlados por difusão. Este estudo indica que o processo de oxidação da glicose a partir do eletrodo CGE/ZnO/GOx é um processo onde a etapa determinante da velocidade de reação é controlada por um processo de difusão das espécies da solução para a superfície do eletrodo⁶⁰.

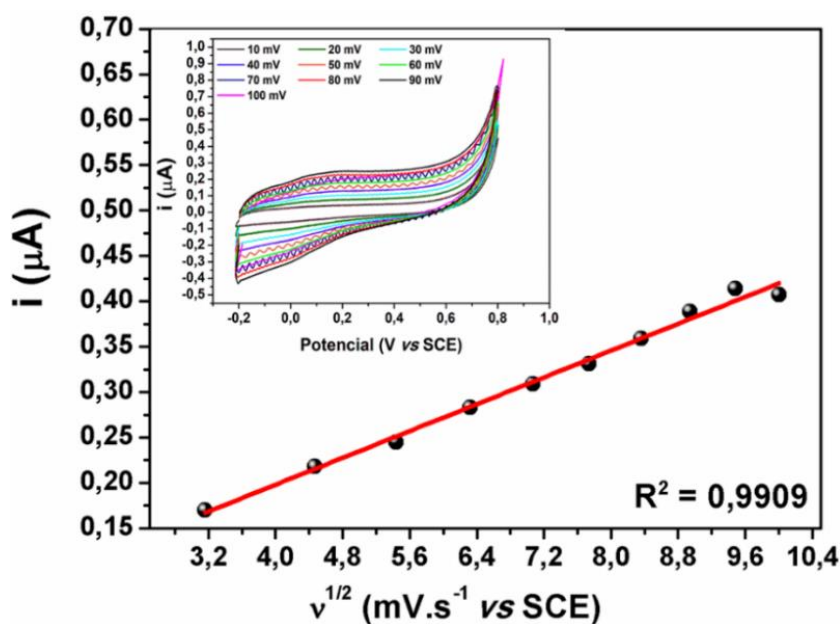


Figura 27 - Curvas de voltametria cíclica para o eletrodo CGE/ZnO/GOx em diferentes taxas de varredura obtidas em PBS $0,1 \text{ M}$ ($\text{pH}=7,2$) com adição de $1,67 \text{ mmol/L}$ glicose.

7. Conclusão

Neste trabalho nanofibras de óxido de zinco em diferentes razões mássicas foram obtidas por meio da técnica de eletrofiação para produzir biossensores para detecção de glicose. Foram avaliados parâmetros tais como concentração de acetato de zinco na solução de PVA e a temperatura de calcinação das nanofibras compósitas na morfologia e estrutura do material. Foi observado que a adição de acetato de zinco aumenta a condutividade da solução e reduz o diâmetro das nanofibras de 495 nm para 292 nm após a adição de uma maior quantidade do sal 1:2. Após a calcinação, todas as nanofibras reduziram o diâmetro médio, devido a remoção do polímero. O aumento da temperatura de calcinação provoca mudanças tanto na morfologia quanto no diâmetro das nanofibras, e essas mudanças variam também com a concentração do acetato de zinco. Resultados das análises de DRX mostraram que todas as amostras após calcinadas apresentaram natureza altamente cristalina, cuja estrutura cristalina é a wurtzita, a forma mais estável do ZnO. O aumento da concentração do acetato de zinco e da temperatura de calcinação tiveram efeito na cristalinidade do material. De um modo geral, o aumento da temperatura favoreceu o aumento no tamanho dos cristalitos, ocasionado pelo efeito de sinterização dos microcristais.

As nanofibras sintetizadas na razão mássica 1:1 (600 °C) foram utilizadas na modificação do eletrodo do carbono vítreo. Essas nanofibras apresentaram boa interação com a enzima GOx, sem a necessidade de nenhum ligante ou agente de reticulação. Análises de voltametria mostraram que o eletrodo modificado CGE/ZnO/GOx apresentou um melhor comportamento eletroquímico em PBS quando comparado ao eletrodo puro (CGE) e ao eletrodo CGE/ZnO, mesmo na ausência de glicose. Após a adição de glicose no PBS foi observado um aumento de cerca de 60% na corrente de pico para esse mesmo

eletrodo. Estudo de estabilidade mostrou que a corrente de pico foi mantida mesmo após 300 ciclos sucessivos de voltametria cíclica, indicando uma alta bioatividade e estabilidade da enzima imobilizada na nanofibra de ZnO. Acreditamos que o material apresenta grande potencial para aplicação como biossensor de glicose, devido a excelente resposta do eletrodo na presença de glicose.

8. Perspectivas Futuras

Como perspectivas futuras, pode-se estudar uma melhor condição para a produção das nanofibras de ZnO variando outros parâmetros de eletrofição, não avaliados nesta dissertação. Sugere-se também determinar a capacidade de detecção de glicose do biossensor sintetizado, fazer um estudo de interferentes, a repetibilidade e a estabilidade por meio de ensaios após o armazenamento do eletrodo durante 30 dias. Sugere-se ainda fazer testes em amostras reais, para validar o biossensor sintetizado.

9.Referências

1. Boon, C., Yong, L. & Wahab, A. A review of ZnO nanoparticles as solar photocatalysts : Synthesis , mechanisms and applications. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **81**, 536–551 (2018).
2. Fernández, H. *et al.* Electrochemical Biosensors for the Determination of Toxic Substances Related to Food Safety Developed in South America : Mycotoxins and Herbicides chemosensors Electrochemical Biosensors for the Determination of Toxic Substances Related to Food Safety *Dev. Chemosensors* 1–21 (2017). doi:10.3390/chemosensors5030023
3. P.S., J. & Sutrave, D. S. A Brief Study of Cyclic Voltammetry and Electrochemical Analysis. *Int. J. ChemTech Res.* **11**, 77–88 (2018).
4. Brushan, B. *Springer Handbook of Nanotechnology.* (2010).
5. Graeff, C. *NANOTECNOLOGIA ciência e engenharia.* (2012).
6. Rita, A. *et al.* Nanotecnologia na saúde: aplicações e perspectivas Nanotechnology in healthcare: applications and perspective. 14–26 (2014).
7. Villa Verde, Flávia Romano; Santos, Priscila Rohem dos; Weide, I. von der. *NANOTECNOLOGIA APLICADA À EMHO Equipamentos médicos hospitalares e odontológicos - 2008-2015.* 1–20 (2017).
8. Sbd, D. Métodos para avaliação do controle glicêmico. 110–119 (2015).
9. Cock, L. S. & Aponte, A. A. USE OF ENZYMATIC BIOSENSORS AS QUALITY INDICES : A SYNOPSIS OF PRESENT AND FUTURE TRENDS IN THE FOOD INDUSTRY. *Chil. J. Agric. Res.* **69**, 270–280 (2009).
10. Wang, J. Electrochemical Glucose Biosensors. **108**, 814–825 (2008).
11. Monteiro, T. & Almeida, M. G. Critical Reviews in Analytical Chemistry Electrochemical Enzyme Biosensors Revisited : Old Solutions for New Problems Electrochemical Enzyme Biosensors Revisited : Old Solutions for New Problems. *Crit.*

-
- Rev. Anal. Chem. **0**, 1–23 (2018).
12. Xu, C. & Wang, J. Enzyme Biosensors for Point-of-Care Testing. *MEMS Sensors- Des. Appl.* 49–70 (2018). doi:10.5772/intechopen.73249
 13. Sapountzi, E., Braiek, M., Vocanson, F., Jaffrezic-renault, N. & Lagarde, F. Sensors and Actuators B : Chemical Gold nanoparticles assembly on electrospun poly (vinyl alcohol)/ poly (ethyleneimine)/ glucose oxidase nanofibers for ultrasensitive electrochemical glucose biosensing. *Sensors and Actuators* **238**, 392–401 (2017).
 14. Hahm, J. Fundamental Properties of One-Dimensional Zinc Oxide Nanomaterials and Implementations in Various Detection Modes of Enhanced Biosensing. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **67**, 691–717 (2016).
 15. Janotti, A. & Van De Walle, C. G. Fundamentals of zinc oxide as a semiconductor. *Reports Prog. Phys.* **72**, (2009).
 16. Ishioka, K., Petek, H., Kaydashev, V. E., Kaidashev, E. M. & Misochko, O. V. Coherent optical phonons of ZnO under near resonant photoexcitation. *J. Phys. Condens. Matter* **22**, (2010).
 17. Baskoutas, S. Special issue: Zinc oxide nanostructures: Synthesis and characterization. *Materials (Basel)*. **11**, 11–14 (2018).
 18. Ozgur, H. M. and U. Zinc Oxide Fundamentals, Materials and Device Technology. (2007).
 19. Iqbal, T., Khan, M. A. & Mahmood, H. Facile synthesis of ZnO nanosheets : Structural , antibacterial and photocatalytic studies. *Mater. Lett.* **224**, 59–63 (2018).
 20. Kumar, D. & Dubey, K. K. Optimization of Zinc Oxide nanoparticles synthesis to fabricate glucose oxidase sensor. *Pelagia Res. Libr.* **3**, 3081–3088 (2012).
 21. GUO, D.-S. *et al.* Preparation of H₂O₂ Biosensor Based on Graphene-polydopamine Nanomaterials . *Chinese J. Anal. Chem. (Chinese Version)* **40**, 72 (2013).
 22. Zhao, W. *et al.* Sustainable seaweed-based one-dimensional (1D) nanofibers as high-

-
- performance electrocatalysts for fuel cells. *J. Mater. Chem. A* **3**, 14188–14194 (2015).
23. Tiwari, J. N., Tiwari, R. N. & Kim, K. S. Progress in Materials Science three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices. *Prog. Mater. Sci.* **57**, 724–803 (2012).
 24. Tong, Z., Liu, S., Li, X. & Zhao, J. Nanoscale Horizons enhanced electrochromism. *Nanoscale Horizons* 1–32 (2018). doi:10.1039/c8nh00016f
 25. Samanta, P., Bagchi, S. & Mishra, S. Synthesis and Sensing characterization of ZnO nanofibers prepared by electrospinning. *Mater. Today Proc.* **2**, 4499–4502 (2015).
 26. Wu, C. Two dimensional nanomaterials for flexible supercapacitors. *Chem Soc Rev* **43**, 3207–3812 (2014).
 27. Mehralizadeh, A. & Gharbani, P. Facile Preparation of Novel Zinc Oxide Nano Sheets and Study of Its Optical Properties. *Asian J. Nanosci. Mater.* **2**, 27–35 (2018).
 28. Jiang, L. *et al.* High-Yield Self-Assembly of Flower-Like ZnO Nanostructures. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **6**, 1830–1832 (2006).
 29. Isik, T., Hilal, M. E. & Horzum, N. Green Synthesis of Zinc Oxide Nanostructures. *intechOpen* 1–30
 30. Kołodziejczak-radzimska, A. & Jesionowski, T. Zinc Oxide—From Synthesis to Application: A Review. *Materials (Basel)*. **7**, 2833–2881 (2014).
 31. Hasnidawani, J. N. *et al.* Synthesis of ZnO Nanostructures Using Sol-Gel Method. *Procedia Chem.* **19**, 211–216 (2016).
 32. Doshi, J. & Reneker, D. H. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Conf. Rec. 1993 IEEE Ind. Appl. Conf. Twenty-Eighth IAS Annu. Meet.* **35**, 151–160 (1993).
 33. Greiner, A. & Wendorff, J. H. Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers *Angewandte. Angew. Chemie* **46**, 5670–5703 (2007).
 34. Supaphol, P. & Chuangchote, S. On the Electrospinning of Poly (vinyl alcohol)

Nanofiber Mats : A Revisit. (2008). doi:10.1002/app

35. Huang, S., Zhou, L., Li, M., Wu, Q. & Kojima, Y. Preparation and Properties of Electrospun Poly (Vinyl Pyrrolidone)/ Cellulose Nanocrystal / Silver. doi:10.3390/ma9070523
36. Kim, Y. & Baek, C. Electrospinning of Poly (vinylidene fluoride)/ Dimethylformamide Solutions with Carbon. 1572–1577 (2003).
37. Rodrigo, G. F. *et al.* Eletrofiação de Polímeros em Solução . Parte I : Fundamentação Teórica. (2012).
38. Schiffman, J. D. & Schauer, C. L. A review: Electrospinning of biopolymer nanofibers and their applications. *Polym. Rev.* **48**, 317–352 (2008).
39. Kurečič, M. & Sfiligoj Smole, M. Electrospinning: Nanofibre Production Method. *Electrospinning Nanfibre Prod. Method* **56**, 4–12 (2013).
40. Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N. & Estrela, P. Introduction to biosensors. *Essays Biochem.* **60**, 1–8 (2016).
41. Serra, P. A. Biosensors. (2554).
42. Ibutoto, Z. H. *et al.* Determination of Penicillin. *Biosensors* **1**, 153–163 (2011).
43. Rocchitta, G. *et al.* Enzyme Biosensors for Biomedical Applications : Strategies for Safeguarding Analytical Performances in Biological Fluids. *Sensors* 1–21 (2016). doi:10.3390/s16060780
44. Schuhmann, W. Electron-transfer pathways in modified enzymes entrapped in conducting-polymer layers. *Biosens. Bioelectron.* **10**, 181–193 (1995).
45. Rahman, M., Ahammad, A. J. S., Jin, J., Ahn, S. J. & Lee, J. A Comprehensive Review of Glucose Biosensors Based on Nanostructured Metal-Oxides. *Open Access sensors* **10**, 4855–4886 (2010).
46. Şimşek, Ş., Aynacı, E. & Arslan, F. An amperometric biosensor for L-glutamate determination prepared from L-glutamate oxidase immobilized in polypyrrole-

-
- polyvinylsulphonate film. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* 1–6 (2015). doi:10.3109/21691401.2014.951723
47. Chinnadayala, S. R., Santhosh, M., Singh, N. K. & Goswami, P. Author 's Accepted Manuscript. *Biosens. Bioelectron.* 1–26 (2015). doi:10.1016/j.bios.2015.02.015
 48. Umar, A., Rahman, M. M., Kim, S. H. & Hahn, Y. B. ZnO Nanonails : Synthesis and Their Application as Glucose Biosensor of Medicine. *Nnoscience Nanotechnol.* **8**, 3216–3221 (2008).
 49. Parker, S. F. & Lennon, D. Characterisation of hydrocarbonaceous overlayers important in metal-catalysed selective hydrogenation reactions. *Chem. Phys.* 49–53 (2013). doi:10.1088/978-0-7503-1302-5ch1
 50. Ferri, S., Kojima, K. & Sode, K. Review of Glucose Oxidases and Glucose Dehydrogenases : *J. Diabetes Sci. Technol.* **5**, 1068–1076 (2011).
 51. Hecht, H. J., Kalisz, H. M., Hendle, J., Schmid, R. D. & Schomburg, D. Crystal Structure of Glucose Oxidase from *Aspergillus niger* Refined at 2.3 Å Reslution. 1–20 (1992).
 52. A, S. S. & Trivedi, R. A Review on Glucose Oxidase. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **4**, 636–642 (2015).
 53. Yang, K. *et al.* ZnO Nanotube Arrays as Biosensors for Glucose. *J. Phys. Chem.* **113**, 20169–20172 (2009).
 54. Sirisha, V. L., Jain, A. & Jain, A. Enzyme Immobilization : An Overview on Methods , Support Material , and Applications of Immobilized Enzymes. *Marine Enzymes Biotechnology: Production and Industrial Applications, Part II - Marine Organisms Pro* (Elsevier Inc., 2016). doi:10.1016/bs.afnr.2016.07.004
 55. Hiep, H. & Kim, M. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Appl.Sci.Converg.Tchnol.* **26**, 157–163 (2017).
 56. Rodríguez-delgado, M. M. *et al.* Trends in Analytical Chemistry Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. *Trends Anal. Chem.* **74**, 21–45 (2015).

-
57. Thevenot, D. *et al.* Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.* **16**, 121–131 (2014).
 58. Clark, L. C. & Lyons, C. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **102**, 29–45 (1962).
 59. Wang, J. X. *et al.* Zinc oxide nanocomb biosensor for glucose detection. *Appl. Phys. Lett.* **233106**, 10–13 (2006).
 60. Ahmad, M., Pan, C., Luo, Z. & Zhu, J. A single ZnO nanofiber-based highly sensitive amperometric glucose biosensor. *J. Phys. Chem. C* **114**, 9308–9313 (2010).
 61. Kounaves, S. P. Voltammetric Techniques. in *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry* 709–726 (1997).
 62. Alrokayan, S. A. Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. 845–857 (2012).
 63. Budrugaec, P. Kinetics of the complex process of thermo-oxidative degradation of poly(vinyl alcohol). *J. Therm. Anal. Calorim.* **92**, 291–296 (2008).
 64. Lin, C. & Li, Y. Synthesis of ZnO nanowires by thermal decomposition of zinc acetate dihydrate. *Chem. Phys. Lett.* **381**, 262–279 (2003).
 65. Duan, Y. *et al.* Kinetic analysis on the non-isothermal dehydration by integral master-plots method and TG-FTIR study of zinc acetate dihydrate. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **83**, 1–6 (2008).
 66. Son, W. K., Youk, J. H., Lee, T. S. & Park, W. H. The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer (Guildf)*. **45**, 2959–2966 (2004).
 67. Thomas, P. S., Guerbois, J., Russell, G. F. & Briscoe, B. J. FTIR STUDY OF THE THERMAL DEGRADATION OF POLY (VINYL ALCOHOL). **64**, 501–508 (2007).
 68. Zhang, Y., Zhu, F., Zhang, J. & Xia, L. Converting layered zinc acetate nanobelts to one-dimensional structured ZnO nanoparticle aggregates and their photocatalytic activity.

-
- Nanoscale Res. *Lett.* **3**, 201–204 (2008).
69. Singh, P., Mondal, K. & Sharma, A. Reusable electrospun mesoporous ZnO nanofiber mats for photocatalytic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon dyes in wastewater. *J. Colloid Interface Sci.* **394**, 208–215 (2013).
 70. Das, M. & Sarkar, D. Development of room temperature ethanol sensor from polypyrrole (PPy) embedded in polyvinyl alcohol (PVA) matrix. *Polym. Bull.* **75**, 3109–3125 (2018).
 71. Bodke, M. R., Purushotham, Y., Dole, B. N. & Materials, A. Comparative study on zinc oxide nanocrystals synthesized by two precipitation methods. *Cerâmica* **64**, 91–96 (2018).
 72. Sapountzi, E., Braiek, M., Chateaux, J. F., Jaffrezic-Renault, N. & Lagarde, F. Recent advances in electrospun nanofiber interfaces for biosensing devices. *Sensors (Switzerland)* **17**, (2017).
 73. Wei, A. *et al.* Enzymatic glucose biosensor based on ZnO nanorod array grown by hydrothermal decomposition. *Appl. Phys. Lett.* **123902**, 1–4 (2006).