



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Programa de Pós-graduação em Química - Doutorado

Instituto de Química

Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia

**Desenvolvimento e caracterização de filmes de
poli(ácidos hidroxifenilacéticos) para aplicação
na biodeteção de *Neisseria meningitidis* e
*Anaplasma marginale***

Doutorando: Luciano Pereira Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Graci Brito-Madurro

2014

Agosto



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Programa de Pós-graduação em Química - Doutorado

Instituto de Química

Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia

**Desenvolvimento e caracterização de filmes de
poli(ácidos hidroxifenilacéticos) para aplicação
na biodetecção de *Neisseria meningitidis* e
*Anaplasma marginale***

Tese apresentada ao Programa Institucional
de Doutorado em Química UFU, do Instituto
de Química da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do título de
Doutor em Química.

Área de Concentração: Química.

Doutorando: Luciano Pereira Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Graci Brito-Madurro

2014

Agosto



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



**Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química,
do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM QUÍMICA, NÚMERO 30/PPQUI.**

DATA: 8/8/2014

DISCENTE: Luciano Pereira Rodrigues

MATRÍCULA: 11113QMI004

TÍTULO DO TRABALHO: Sistemas poliméricos para detecção eletroquímica de doenças humanas e de animais.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Eletroquímica Aplicada.

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Plataformas funcionalizadas com biomarcadores específicos para diagnóstico de doenças cardiovasculares, processos inflamatórios, leishmaniose e meningite.

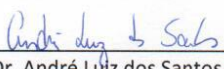
Às treze horas e trinta minutos do dia oito de agosto do ano dois mil e quatorze, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, Bloco 5I, Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Sergio Antonio Spinola Machado, da Universidade de São Paulo; Alzira Maria Serpa Lucho, da Universidade Federal de Alfenas; André Luiz dos Santos, da Faculdade de Ciências Integradas do Pontal/UFU e Sheila Cristina Canobre, do Instituto de Química da UFU e João Marcos Madurro, orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Regulamentar nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e A provou o(a) candidata(o). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE POLÍMEROS DE
HIÓROXIFENILACÉTICOS PARA APLICAÇÃO NA BIODETECÇÃO DE NEISSERIA
MENINGITIDIS E ANAPLASMA MARGINALE

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 19 horas e 35 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.


Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado – USP


Profª Dra. Alzira Maria Serpa Lucho – UNIFAL


Prof. Dr. André Luiz dos Santos – FACIP/UFU


Profª Dra. Sheila Cristina Canobre – IQUFU


Prof. Dr. João Marcos Madurro – IQUFU

AGRADECIMENTOS

- ❖ *A Deus que me adotou imerecivelmente como filho e moveu céus e terra, muitas vezes usando as intercessões do Pastor Balmir Rodrigues da Cunha, de maneira que eu e minha família só poderíamos dizer: Ebenézer “Até aqui nos ajudou o Senhor”;*
- ❖ *A minha esposa Rosilene e aos meus filhos Luís Felipe e Samuel que suportaram minha ausência mesmo quando fisicamente tão próximo, amo vocês de todo meu coração e digo que meu empenho até aqui é motivado pelas minhas responsabilidades com vocês;*
- ❖ *Aos meus pais e a minha irmã que mesmo longe, estão sempre presentes em minha vida;*
- ❖ *Aos componentes do grupo de pesquisa, Ana Cristina, Anderson, Felipe, Fellipy, Héden, Heliane, José Manuel, Jussara, Leandro, Lídia, Livia, Lucas, Mariana, Renata, Thalles, Vinícius e Larrissa pelas amizades.*
- ❖ *Aos Profs. Lucas Franco, Djenaine de Souza, Sheila Canobre, Adamo Ferreira, André Rezende, Deusmaque Carneiro, Odonório Abrahão, Milton Sonoda e Milivoj Lovric pelas discussões que contribuíram muito para este trabalho;*
- ❖ *Ao Prof. Roney Coimbra e a Profa. Sara Orellana pelas amostras de DNA da bactéria *Neisseria meningitidis* provenientes do Centro de Excelência em Bioinformática, FIOCRUZ-Minas.*
- ❖ *Ao Prof. Luiz Ricardo Goulart Filho e Paula de Souza Santos do Laboratório de Nanobiotectologia-INGEB-UFU pelas amostras de peptídeos e soros de sangue bovino.*
- ❖ *À amiga Mayta Peixoto, secretária do Programa de Pós-Graduação em Química, pela paciência, colaboração e grande demonstração de amizade;*
- ❖ *Aos membros da Banca pela disponibilidade em participarem e as valiosas contribuições no aprimoramento deste trabalho;*
- ❖ *À CAPES e ao CNPq pela concessão das bolsas de estudos, meu muito obrigado;*
- ❖ *Ao Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia, na pessoa dos coordenadores Prof. João Marcos Madurro e a Profa. Ana Graci Brito-Madurro que me convidaram para desenvolver este trabalho me proporcionando, o que considereei uma grande oportunidade para aquisição de conhecimento.*
- ❖ *Ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, na pessoa do diretor Wellington de Oliveira da Cruz e ao Programa de Pós-Graduação na pessoa da coordenadora Nívea M. M. Coelho, pela possibilidade de aprimoramento profissional;*

"A sabedoria é a coisa principal; adquiere pois a sabedoria, emprega tudo o que possuis na aquisição de entendimento". *Provérbios 4:7*

Shlomô (hebraico)

Jedidias (árabe)

Salomão (português)

SUMARIO

Lista de Abreviaturas e Siglas	i
Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tabelas.....	xi
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – Polímeros condutores.....	1
1.1.1 – Obtenção de polímeros condutores por eletropolimerização.....	7
1.1.2 – Aplicações dos polímeros condutores	9
1.1.3 – Eletrodos quimicamente modificados com polímeros	10
1.2 – Polímeros condutores aplicados em sensores.....	12
1.3 – Biossensores	14
1.3.1 – Técnicas de imobilização e transdutores	15
1.3.2 – Classificação dos biossensores	16
1.4 – Biossensores aplicados ao diagnóstico de doenças infectocontagiosas.....	17
1.5 – Genossensores	19
1.5.1 – Estrutura e propriedades da molécula de DNA.....	19
1.5.2 - Princípio de funcionamento dos genossensores	23
1.5.3 - Detecção da hibridização com brometo de etídio	25
1.5.4 - Voltametria	26
1.5.4.1 - Voltametria cíclica	27
1.5.4.2- Voltametria de pulso diferencial.....	28
1.5.4.3- Voltametria de onda quadrada	29
1.5.5– Genossensor para meningite	30
1.6 – Imunossensores.....	34

1.6.1 – Estrutura e propriedades dos antígenos e anticorpos	34
1.6.2– Imunossensores impedimétricos	36
1.6.2.1 – Aspectos teóricos da espectroscopia de impedância eletroquímica.....	36
1.6.3 - Imunossensor para anaplasmosse bovina	41
2 – OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	43
2.1 – Objetivo geral.....	43
2.2 – Objetivos específicos	43
3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	45
3.1 – Materiais e soluções.....	45
3.2 – Procedimento Experimental	48
3.2.1 – Preparação e construção dos eletrodos de trabalho	48
3.2.2 – Seleção dos eletrodos de grafite	49
3.2.3 – Eletropolimerização dos ácidos hidroxifenilacéticos	49
3.2.4 – Transporte iônico nos estudos de reversibilidade	50
3.2.5 – Determinação da massa dos polímeros.....	51
3.2.6 – Propriedades de troca iônica	51
3.2.7 – Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada.....	51
3.2.8 – Medidas de estabilidade eletroquímica	52
3.2.9 – Microscopia de força atômica	52
3.2.10– Estudos teóricos da eletropolimerização dos ácidos hidroxifenilácéticos.....	53
3.2.11 – Estudos de imobilização de bases nitrogenadas.....	54
3.2.12 – Procedimento de construção dos sistemas poliméricos para diagnóstico de <i>Neisseria meningitidis</i>	55
3.2.13 – Procedimento de construção dos sistemas poliméricos para diagnóstico de <i>Anaplasma marginale</i>	57
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	60

4.1 – Eletropolimerizações, atividades e estabilidades eletroquímicas dos filmes poliméricos derivados dos ácidos hidroxifenilacéticos	60
4.1.1 – Seleção dos eletrodos de grafite	60
4.1.2 – Eletropolimerizações dos ácidos hidroxifenilacéticos	62
4.1.3 – Comportamento eletroquímico dos ácidos poli-hidroxifenilacéticos.....	65
4.1.5 – Relação massa e carga dos ácidos poli-hidroxifenilacéticos	80
4.1.6 – Influência dos pares redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ e $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+}$ no comportamento eletroquímico dos filmes derivados de ácidos poli-hidroxifenilacéticos	82
4.1.7 – Estudos de propriedades elétricas dos filmes poliméricos por espectroscopia de impedância eletroquímica	85
4.1.8 – Estudo eletroquímico da estabilidade dos filmes derivados dos ácidos hidroxifenilacéticos.....	88
4.1.9 – Estudos morfológicos dos polímeros derivados dos ácidos hidroxifenilacéticos .	90
4.1.10 – Estudos teóricos das eletropolimerizações dos ácidos hidroxifenilacéticos	92
4.1.11 – Mecanismos propostos para eletropolimerizações dos ácidos hidroxifenilacéticos	97
4.1.12 – Estudos de imobilização das bases nitrogenadas nos polímeros derivados dos ácidos poli-hidroxifenilacéticos.....	108
4.1.13 – Estudos de imobilizações de biomoléculas.....	113
4.1.14 – Aplicação das plataformas de EG/POLI(3-HFA) em sistemas poliméricos para detecção de <i>Neisseria meningitidis</i>	114
4.1.15 – Aplicação das plataformas de EG/POLI(3-HFA) em sistemas poliméricos para detecção de <i>Anaplasma marginale</i>	120
5 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	127
6 – APÊNDICE	130
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	137

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(CH)_x – poliacetileno

2-HFA – ácido 2-hidroxifenilacético

3-HFA – ácido 3-hidroxifenilacético

4-HFA – ácido 4-hidroxifenilacético

AC – corrente alternada

Ac – anticorpo

Ag – antígeno

AM1 – Peptídeo sintético capaz de reconhecer anticorpos em soros contendo *Anaplasma marginale*

BE – brometo de etídio

BSA – albumina de soro bovino

C – capacitância

C_{dl} – capacitância da dupla camada

DNA – ácido desoxirribonucleico

dsDNA – dupla fita de DNA (híbrido)

E – potencial

EG – eletrodos de grafite

EG/POLI(2-HFA) – eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA)

EG/POLI(3-HFA) – eletrodos de grafite modificados com POLI(3-HFA)

EG/POLI(4-HFA) – eletrodos de grafite modificados com POLI(4-HFA)

EIE - espectroscopia de impedância eletroquímica

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

E_{ocp} – potencial de circuito aberto

E_p – potencial de pico

h – horas

IgG⁺ - anticorpos anti-MSP1a contidos nos soros sanguíneos de bovinos contaminados com *A. marginale*

IgG⁻ - anticorpos contidos nos soros sanguíneos de bovinos saudáveis

I_p – corrente de pico

m – massa

AFM – microscopia de força atômica

min. – minutos

cm³ – centímetros cúbicos

mV s⁻¹ – milivolts por segundo

nm – nanômetros

NM1 – Oligonucleotídeo sintético capaz de reconhecer DNA genômico de *Neisseria meningitidis*

OCP – potencial de circuito aberto

OLEDs – organic light-emitting diode ou diodo orgânico emissor de luz

PANI – polianilina

pb – pares de base

PBS – tampão de fosfato de sódio contendo NaCl

PC – polímeros condutores

PCR – reação em cadeia da polimerase

PIC – polímeros intrinsecamente condutores

Poli(2-HFA) – polímero derivado do ácido 2-hidroxifenilacético

Poli(3-HFA) – polímero derivado do ácido 3-hidroxifenilacético

Poli(4-HFA) – polímero derivado do ácido 4-hidroxifenilacético

Poli(HFA) – ácidos poli-hidroxifenilacéticos

R – resistência

R_{ct} – resistência a transferência de carga

S – siemens

s – segundos

SPAM - sistema polimérico para detecção de *Anaplasma marginale*

SPNM - sistema polimérico para detecção de *Neisseria meningitidis*

ssDna – simples fita DNA

V - volts

VC – voltamogramas cíclicos

VPD – voltametria de pulso diferencial

VOQ – voltametria de onda quadrada

Z' – componente real de impedância (resistiva)

Z'' – componente imaginária de impedância (capacitiva)

Z_w – impedância de Warburg

v – velocidade de varredura (mVs⁻¹)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Escala de condutividade.....	2
Figura 2: Principais classes de polímeros condutores.....	3
Figura 3: Dopagem do tipo p no poli(4-fenileno). A: Polarons e B: Bipolarons.....	4
Figura 4: Conversão entre os diferentes estágios da PANI.....	6
Figura 5: Mecanismo de eletropolimerização para heterociclos de cinco membros.....	7
Figura 6: Etapas de polimerização eletroquímica e dopagem da PANI.....	8
Figura 7: Esquema mostrando várias aplicações conhecidas e propostas para polímeros condutores, em função das suas propriedades.....	8
Figura 8: Esquema ilustrativo de um biossensor.....	15
Figura 9: Esquema ilustrativo de seleção de proteínas por phage display.....	19
Figura 10: Ligação fosfodiéster entre nucleotídeos.....	18
Figura 11: Bases nitrogenadas presentes na estrutura do DNA.....	19
Figura 12: Ligação fosfodiéster entre dois nucleotídeos e o respectivo crescimento da cadeia de DNA.....	19
Figura 13: Modelo de estrutura 3D de DNA no plano e retorcida proposto por Watson, Crick e Wilkins.....	20
Figura 14: Formação das ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas.....	21
Figura 15: Esquema ilustrativo para as etapas de obtenção de um genossensor eletroquímico, onde: (A) etapa de hibridização, (B) etapa de intercalação do composto eletroativo ao híbrido formado e (C) etapa de detecção eletroquímica.....	23
Figura 16: Estrutura molecular do brometo de etídio.....	23

- Figura 17:** (A) Brometo de etídio intercalado entre dois pares de bases nitrogenadas e (B) Distorções estruturais induzidas pela intercalação. Esquerda: DNA não-intercalado. Direita: DNA intercalado em três regiões (áreas vermelhas).....24
- Figura 18:** (A) Sinal de excitação para a voltametria cíclica e (B) Voltamograma cíclico para um processo redox reversível.....25
- Figura 19:** (A) Representação esquemática da aplicação do potencial em função do tempo (t) em VPD em: (A) em instrumentos analógicos, (B) em instrumentos digitais.....26
- Figura 20:** Sequência potencial vs. tempo (E vs. t) usada em VOQ.....29
- Figura 21:** (A) Esquema ilustrativo das meninges e (B) Meninges infectadas com *Haemophilus influenzae*. Vista inferior de um cérebro (Imagem do Centro para Controle e Prevenção de Doenças, Atlanta, EUA).....31
- Figura 22:** Esquema simplificado para as interações (A) covalentes entre antígeno e anticorpo e (B) sistema de seletividade do anticorpo.....35
- Figura 23:** Diagrama do potencial aplicado em função do tempo, para realização das medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica a potencial constante.....38
- Figura 24:** (A) Circuito equivalente de Randles para um sistema eletroquímico simples e (B) gráfico de Nyquist proveniente do circuito de Randles mostrado em A.....40
- Figura 25:** Transmissão de Anaplasmosse bovina pelo vetor carrapato.....42
- Figura 26:** Fluxograma de preparação dos eletrodos de grafite.....48
- Figura 27:** Ilustração do sistema eletroquímico utilizado para eletropolimerização dos ácidos hidroxifenilacéticos em HClO_4 e também para detecção de *Anaplasma marginale* em $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ por voltametria de pulso diferencial50
- Figura 28:** Ilustração do sistema eletroquímico utilizado na detecção das bases nitrogenadas e do brometo de etídio sinalizando a hibridização de DNA no sistema polimérico para detecção de meningite bacteriana.....58
- Figura 29:** (A) Construção do SPNM para detecção indireta através da oxidação do brometo de etídio por voltametria de pulso diferencial e direta através de espectroscopia

de impedância eletroquímica, (B) contendo SPNM e o alvo e em (C) a desnaturação térmica do alvo DNA genômico.....56

Figura 30: (A) Construção do SPAM e (B) SPAM contendo o alvo sendo detectado por espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria de pulso diferencial.....58

Figura 31: Primeiro ciclo de voltametria do eletrodo de grafite em: (A) solução 5,00 mmol.L⁻¹ K₄Fe(CN)₆/ K₃Fe(CN)₆ contendo 0,10 mol.L⁻¹ KCl e (B) solução HClO₄ 0,50 mol.L⁻¹, $v_A = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e $v_B = 50 \text{ mV s}^{-1}$61

Figura 32: Primeira voltametria cíclica de eletrodos de grafite modificados com 2-HFA (A), 3-HFA (B) e 4-HFA (C), 2,50 mmol.L⁻¹, em HClO₄ 0,50 mol.L⁻¹ a 50 mV s⁻¹....62

Figura 33: Voltametrias cíclicas consecutivas dos eletrodos de grafite modificados com (POLI(2-HFA) (A), (POLI(3-HFA) (B) e (POLI(4-HFA) (C), 2,50 mmol.L⁻¹, em HClO₄ 0,50 mol.L⁻¹, após 100 ciclos voltamétricos a 50 mV s⁻¹.....63

Figura 34: Voltametria cíclica do EG/POLI(2-HFA) em solução aquosa de HClO₄ 0,50 mol.L⁻¹ a 50 mV s⁻¹.....64

Figura 35: Voltametrias cíclicas do eletrodo de grafite em HClO₄ 0,50 mol.L⁻¹, após 100 ciclos voltamétricos a 50 mV s⁻¹.....65

Figura 36: Voltametria cíclica do eletrodo de grafite (a) e dos eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA) (b), POLI(3-HFA) (c) e POLI(4-HFA) (d) em solução aquosa de HClO₄ 0,50 mol.L⁻¹, 50 mV s⁻¹.....66

Figura 37: Deconvolução das VC dos processos de oxidação e redução para o EG/POLI(2-HFA) (A), EG/POLI(3-HFA) (B) e EG/POLI(4-HFA) (C). Resultados experimentais (o), deconvolução (---) e fitagem (—).....68

Figura 38: Voltametrias cíclicas consecutivas para o EG/POLI(2-HFA) (A), EG/POLI(3-HFA) (B) e EG/POLI(4-HFA) (C) em solução de HClO₄ 0,50 mol.L⁻¹; $v = 10 \text{ mVs}^{-1}$ a 110 mVs^{-1}70

Figura 39: ΔE_p vs. velocidade de varredura em solução de HClO₄ 0,50 mol.L⁻¹ para eletrodos de grafite modificados com (A) POLI(2-HFA), (B) POLI(3-HFA) e (C) POLI(4-HFA).....72

- Figura 40:** $E_p - E_{p/2}$ vs. velocidade de varredura do (■) pico anódico e (▲) pico catódico em solução de HClO_4 0,50 mol.L⁻¹ para eletrodos de grafite modificados com (A) POLI(2-HFA), (B) POLI(3-HFA) e (C) POLI(4-HFA).....73
- Figura 41:** I_{pa} / I_{pc} vs. velocidade de varredura em solução de HClO_4 0,50 mol.L⁻¹ para eletrodos de grafite modificados com (A) POLI(2-HFA), (B) POLI(3-HFA) e (C) POLI(4-HFA).....74
- Figura 42:** I_p vs. $v^{1/2}$ do (■) pico anódico e (▲) pico catódico em solução de HClO_4 0,50 mol.L⁻¹ para eletrodos de grafite modificados com (A) POLI(2-HFA), (B) POLI(3-HFA) e (C) POLI(4-HFA).....75
- Figura 43:** $I_p / v^{1/2}$ vs. E_p (■) pico anódico e (▲) pico catódico em solução de HClO_4 0,50 mol.L⁻¹ para eletrodos de grafite modificados (A) POLI(2-HFA), (B) POLI(3-HFA) e (C) POLI(4-HFA).....76
- Figura 44:** I_p vs. $t^{1/2}$ em solução de HClO_4 0,50 mol.L⁻¹ para eletrodos de grafite modificados com (A) POLI(2-HFA), (B) POLI(3-HFA) e (C) POLI(4-HFA).....79
- Figura 45:** I_p vs. $t^{-1/2}$ em solução de HClO_4 0,50 mol.L⁻¹ para eletrodos de grafite modificados com (■) POLI(2-HFA), (●) POLI(3-HFA) e (▲) POLI(4-HFA). (A) Oxidação dos polímeros e (B) redução dos polímeros.....80
- Figura 46:** Voltamogramas cíclicos obtidos para medidas das propriedades de troca aniônica do eletrodo de grafite (a) e eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA) (b), POLI(3-HFA) (c) e POLI(4-HFA) (d) em solução aquosa de: (A) 5,0 mmol.L⁻¹ de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ contendo KCl 0,10 mol.L⁻¹ e (B) 5,0 mol.L⁻¹ de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_2$ contendo KCl 0,10 mol.L⁻¹ a $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$83
- Figura 47:** Diagramas Nyquist (Z'' vs. Z') em KCl 0,1 mol.L⁻¹ contendo $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})]_6 / \text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})]_6$ 5 mmol.L⁻¹ do eletrodo de grafite (-□-) e dos eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA) (-○-), POLI(3-HFA) (-□-) e POLI(4-HFA) (-△-). $E_{pa} = 0,24 \text{ V}$; Amplitude 10 mV; Intervalo de Frequência: 10^6 a 10^{-2} Hz . As linhas sólidas representam o ajuste dos dados experimentais a um circuito equivalente.....86
- Figura 48:** Diagramas de Bode ($\log f$ vs. ângulo de fase) dos espectros de impedância eletroquímica do eletrodo de grafite (-□-) e dos eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA) (-○-), POLI(3-HFA) (-□-) e POLI(4-HFA) (-△-). $E_{pa} = 0,24$

- V; Amplitude 10 mV; Intervalo de Frequência: 10^6 a 10^{-2} Hz. As linhas sólidas representam o ajuste dos dados experimentais a um circuito equivalente.....86
- Figura 49:** Circuito equivalente proposto para simulação dos dados experimentais dos eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA), POLI(3-HFA) e POLI(4-HFA).....87
- Figura 50:** Porcentagem de carga relativa dos eletrodos de grafite modificados com (■) POLI(2-HFA), (●) POLI(3-HFA) e (▲) POLI(4-HFA) em HClO_4 $0,50 \text{ mol.L}^{-1}$ a 30 mV s^{-1} 89
- Figura 51:** Imagens de microscopia de força atômica do eletrodo de grafite (A) e eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA) (B), POLI(3-HFA) (C) e POLI(4-HFA) (D)92
- Figura 52:** Espectros de FTIR obtidos em pastilhas de KBr para os isômeros do ácido hidroxifenilacético e seus respectivos polímeros, com vinte ciclos consecutivos e resolução de 4 cm^{-1} , sendo (a) 2HFA e POLI(2-HFA) e (b) 3HFA e POLI(3-HFA) e (c) 4HFA e POLI(4-HFA).....89
- Figura 53:** Estruturas de ressonância para os cátions radicais do 2-HFA, 3-HFA e 4-HFA...94
- Figura 54:** Decâmeros otimizados dos ácidos hidroxifenilacéticos por DFT através da obtenção das estruturas conformacionais de mínimos globais de energias pelo método de Monte Carlo. dec2-HFA (A), dec3-HFA (B) e dec4-HFA (C).....96
- Figura 55:** Voltamograma de onda quadrada: Primeira e segunda varredura do 2-HFA em EG. Voltametria cíclica: Terceira varredura do 2-HFA eletropolimerizado em EG. Parâmetros: VOQ (Amplitude: 0,02 V, Incremento: 0,005 V, Frequência: 30 Hz) e VC ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$). Eletrólito suporte: HClO_4 $0,5 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de 2-HFA (não adicionado na terceira varredura).....98
- Figura 56:** À esquerda, voltamogramas de onda quadrada para oxidação de 2-HFA (A), 3-HFA (B) e 4-HFA (C). Amplitude: 0,02 V, Incremento: 0,005 V, Frequência: 1, 5, 15 e 25 Hz, Eletrólito suporte: HClO_4 $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ contendo $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de 2-HFA, 3-HFA e 4-HFA ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, Eletrólito suporte de HClO_4 $0,5 \text{ mol. L}^{-1}$). À direita, parâmetros de regressão linear da curva I_p vs. f100

- Figura 57:** Parâmetros de regressão linear da curva E_p vs. $\log f$ obtidos dos voltamogramas de onda quadrada para (A) 2-HFA, (B) 3-HFA e (C) 4-HFA. Amplitude: 0,02 V, Incremento: 0,005 V, Frequências: 1, 5, 15 e 25 Hz, Eletrólito suporte: HClO_4 0,5 mol.L⁻¹ contendo 2,5 mmol.L⁻¹ de 2-HFA, 3-HFA e 4-HFA.....101
- Figura 58:** Voltamogramas de eletropolimerização de 2,5 mmol.L⁻¹ de 3-HFA em presença de: (A) oxigênio molecular, (B) nitrogênio molecular e (C) oxigênio molecular na ausência de 3-HFA em HClO_4 0,5 mol. L⁻¹ a $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$102
- Figura 59:** (A) I_p vs. número de ciclos na eletrossíntese do POLI(3-HFA) na presença de oxigênio molecular (---) e nitrogênio molecular (—). (B) E_p vs. número de ciclos para o POLI(3-HFA) na presença de oxigênio molecular (-▲-) oxidação e (-▼-) redução; na presença de nitrogênio molecular (-■-) oxidação e (-●-) redução. (C) δE vs. número de ciclos na eletrossíntese do POLI(3-HFA) na presença de oxigênio molecular (-○-) e nitrogênio molecular (-▲-).....103
- Figura 60:** Mecanismo de eletropolimerização para POLI(2-HFA) via C3 (A) e C5 (B)....105
- Figura 61:** Mecanismo de eletropolimerização para POLI(3-HFA) via C4 (A) e C6 (B)....106
- Figura 62:** Mecanismo de eletropolimerização para POLI(4-HFA).....107
- Figura 63:** Mecanismo de oxidação para guanina e adenina.....109
- Figura 64:** Pareamento Watson-Crick de bases e seus sítios de oxidação e redução no DNA. (O) sítios de oxidação para guanina e adenina e (□) sítios de redução para a guanina, adenina e citosina.....109
- Figura 65:** À esquerda, voltamogramas de pulso diferencial dos eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA) (A), POLI(3-HFA) (B) e POLI(4-HFA) (C), contendo guanina, G, (2 mmol.L⁻¹), adenina, A, (2 mmol.L⁻¹), timina, T, (20 mmol.L⁻¹) e citosina, C, (20 mmol.L⁻¹). Eletrólito: tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹. $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. À direita, deconvolução dos voltamogramas de pulso diferencial dos eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA) (A), POLI(3-HFA) (B) e POLI(4-HFA) (C). Resultados experimentais (○), deconvolução (----) e fitagem (—), $R^2 > 0,99948$ e $\chi^2 < 3,25 \times 10^{-6}$ para todas as fitagens.....111
- Figura 66:** (A) Voltamogramas de pulso diferencial do brometo de etídeo na ausência de NM1 (---) e para SPNM antes (—) e depois da hibridação com o alvo complementar de DNA genômico de *Neisseria meningitidis* em diferentes

concentrações, 200 ng (—), 400 ng (—) e 600 ng (—). Eletrólito: tampão fosfato (0,10 mol.L⁻¹), pH 7,4. Velocidade de varredura: 20 mVs⁻¹. (B) Parâmetros de regressão linear da curva ΔI vs. [DNA]/SPNM.....115

Figura 67: (A) Diagramas Nyquist (Z'' vs. Z') em KCl 0,1 M contendo K₃[Fe(CN)]₆ / K₄[Fe(CN)]₆ 5 mmol.L⁻¹ para SPNM antes (-☆-) e depois da hibridação com o alvo complementar de DNA genômico à (-○-) 200 ng, (-□-) 400ng e (-△-) 600 ng. E_{pa} = 0,24 V; Amplitude 10 mV; Intervalo de Frequência: 10⁶ a 10⁻² Hz. As linhas sólidas representam o ajuste dos dados experimentais a um circuito equivalente. Inseto: Ampliação na região de alta frequência para SPNM após a hibridização com os alvos. (B) Parâmetros de regressão linear da curva Rct vs. [DNA]/SPNM.....116

Figura 68: Parâmetros de regressão linear após normalização das curvas ΔI vs. [DNA] / SPNM (-●-) e Rct vs. [DNA] /SPNM (-■-).....117

Figura 69: Imagens de microscopia de força atômica do (A) SPNM e SPNM com (B) 200 ng, (C) 400 ng e (D) 600 ng de DNA genômico.....118

Figura 70: Parâmetros estatísticos topográficos do SPNM antes e após a adição de DNA genômico de *Neisseria meningitidis* nas concentrações de 200 ng (SPNM:200 ng), 400 ng (SPNM:400 ng) e 600 ng (SPNM:600 ng).....119

Figura 71: Diagrama de Nyquist do eletrodo de grafite modificado com POLI(3-HFA) (-□-), (-△-) SPAM, (-☆-) SPAM:IgG⁺ (alvo complementar) e (-○-) SPAM:IgG⁻ (alvo não-complementar) em solução contendo 5 mol.L⁻¹ de ferrocianeto de potássio, 5 mmol.L⁻¹ de ferricianeto de potássio e 0,1 mol.L⁻¹ de cloreto de potássio. Potencial aplicado: +0.24 V, amplitude: 0,10 V. (—) Simulação. Inseto: Região de alta frequência ampliada.....121

Figura 72: Voltamogramas de pulso diferencial do SPAM (a), SPAM:igG⁻ (alvo não complementar) (b) e SPAM:IgG⁺ (alvo complementar) (c). Eletrólito: Solução de K₃[Fe(CN)]₆ / K₄[Fe(CN)]₆ 0,33 mmol.L⁻¹ e KCl 0,1 mol.L⁻¹. v = 16 mVs⁻¹..123

Figura 73: Voltamogramas de pulso diferencial do SPAM, curva a (A) e SPAM:IgG⁺, curva c (B). Eletrólito suporte: Solução de K₃[Fe(CN)]₆ / K₄[Fe(CN)]₆ 0,33 mol.L⁻¹ e KCl 0,1 mol.L⁻¹. v = 16 mVs⁻¹. Resultados experimentais (o), deconvolução (---) e fitagem (—). $R^2 > 0,99603$ e $\chi^2 = 1 \times 10^{-5}$ para todas as fitagens.....124

Figura 74: Imagens de microscopia de força atômica do eletrodo de grafite modificado com POLI(3-HFA) (A), SPAM (B) e SPAM:IgG⁺ (C)..... 126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Polianilina em seus diferentes estágios.....	8
Tabela 2: Principais sistemas de transdução de sinal físico-químico.....	16
Tabela 3: Intervalos de potenciais de oxidação e redução do POLI(2-HFA), POLI(3-HFA) e POLI(4-HFA) eletrodepositados sobre eletrodos de grafite.....	67
Tabela 4: Potenciais de pico dos eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA), POLI(3-HFA) e POLI(4-HFA) após a deconvolução.....	67
Tabela 5: Coeficiente de determinação (R^2) e chi-quadrado (χ^2) da deconvolução dos voltamogramas cíclicos para eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA), POLI(3-HFA) e POLI(4-HFA).....	69
Tabela 6: Massa e carga do POLI(2-HFA), POLI(3-HFA) e POLI(4-HFA) eletrodepositados sobre eletrodos de grafite.....	81
Tabela 7: Parâmetros obtidos, a partir dos resultados de simulação de espectroscopia de impedância eletroquímica para os eletrodos de grafite e eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA), POLI(3-HFA) e POLI(4-HFA).....	87
Tabela 8: Parâmetros topográficos estatísticos do eletrodo de grafite e dos eletrodos de grafite modificados com ácidos poli-hidroxifenilacéticos.....	91
Tabela 9: Densidades de spin atômicas Mulliken para os ácidos hidroxifenilacéticos usados como monômeros de partida nas eletropolimerizações.....	94
Tabela 10: Valores de pKas teóricos para os isômeros derivados dos ácidos hidroxifenilacéticos e seus cátions radicais.....	104
Tabela 11: Potenciais de oxidação de bases nitrogenadas imobilizadas, isoladamente, nos eletrodos modificados com ácidos poli-hidroxifenilacéticos.....	110
Tabela 12: Potenciais de oxidação de uma mistura das bases nitrogenadas imobilizadas em eletrodos de grafite modificados com ácidos poli-hidroxifenilacéticos.....	112

- Tabela 13:** Amplitude de corrente nos picos de potenciais de oxidação da mistura das bases nitrogenadas imobilizadas em eletrodos de grafite modificados com ácidos polihidroxifenilacéticos.....113
- Tabela 14:** Parâmetros topográficos estatísticos do SPNM antes e após as adições de DNA genômico de *Neisseria meningitidis*.....118
- Tabela 15:** Parâmetros obtidos, a partir dos resultados de simulação de espectroscopia de impedância eletroquímica para os SPAM e SPAM na presença do alvo complementar (IgG^+) e não complementar (IgG^-).....122

RESUMO

Neste trabalho foi investigada a eletropolimerização dos isômeros do ácido hidroxifenilacético, visando sua aplicação na construção de sistemas poliméricos, através da imobilização de moléculas sintéticas para o desenvolvimento de sensores biológicos. Os eletrodos de grafite eletroquimicamente modificados foram caracterizados quanto à morfologia e o comportamento eletroquímico, evidenciando que o poli(ácido 2-hidroxifenilacético), poli(ácido 3-hidroxifenilacético) e poli(ácido 4-hidroxifenilacético) são eletroativos, sendo que este último apresentou um menor rendimento em massa na eletrossíntese, em concordância com as imagens de microscopia de força atômica, que mostraram que a superfície dos eletrodos de grafite foram menos alteradas com este material em relação aos seus isômeros. Os espectros de impedância eletroquímica do poli(ácido 4-hidroxifenilacético), mostraram que esse material é mais resistivo em relação aos seus outros isômeros que são mais condutores em concordância com os valores de corrente e potencial evidenciados nos ensaios de troca iônica nas sondas positiva e negativa. A relação entre as massas eletrodepositadas e as cargas necessárias para realizar o processo redox nestes materiais foi constante, indicando que o mesmo número de elétrons está envolvido na oxidação e redução destes materiais, que se comportaram como sistemas reversíveis segundo os diagnósticos de reversibilidade aplicados por voltametria cíclica, todavia o poli(ácido 3-hidroxifenilacético) mostrou-se mais estável eletroquimicamente durante sucessivas ciclagens em ácido perclórico. As estruturas tridimensionais otimizadas justificam o comportamento eletroquímico e morfológico destas três plataformas, em que os poli(ácido 2-hidroxifenilacético) e poli(ácido 3-hidroxifenilacético) apresentam estruturas com um arranjo mais ordenado e por isso são mais condutores ao contrário do poli(ácido 4-hidroxifenilacético) que tem uma estrutura mais desordenada, e por isso mais resistiva. A proposta mecanística inicia-se com a eletrooxidação dos monômeros, cujas investigações experimentais por voltametria de onda quadrada, mostraram a perda de um elétron. Os acoplamentos entre os cátions radicais promovem uma formação de éter deixando os grupos acetato expostos na estrutura. O emparelhamento ocorre entre o oxigênio fenólico e carbonos do anel aromático, cujas possibilidades foram estudadas pela densidade de spin e concordantes com as estruturas de ressonância dos cátions-radicaais que estão nos mecanismos sugeridos. Nos testes de incorporação de bases nitrogenadas, verificou-se que o poli(ácido 3-hidroxifenilacético) mostrou-se mais eficiente na retenção das mesmas e por este motivo associado ao seu melhor comportamento eletroquímico, foi selecionado dentre os outros isômeros como o sistema polimérico mais adequado para aplicação nas detecções, através da imobilização por adsorção física de moléculas sintéticas de reconhecimento. No primeiro sistema, imobilizou-se oligonucleotídeos sintéticos compatíveis a fragmentos de DNA da bactéria *Neisseria meningitidis*, capazes de reconhecer seu DNA genômico em amostras por voltametria de pulso diferencial e espectroscopia de impedância eletroquímica, sendo que esta última mostrou uma melhor sensibilidade de resposta de sinal em relação ao aumento de concentração do alvo. No segundo sistema, ocorreu a imobilização de peptídeos sintéticos compatíveis à membrana celular da *Anaplasma marginale*, capazes de reconhecer seletivamente seus anticorpos em amostras de soros sanguíneos bovinos. As imagens feitas por microscopia de força atômica, respaldam o reconhecimento eficaz de ambos os sistemas poliméricos desenvolvidos para detecção das bactérias *Neisseria meningitidis* e *Anaplasma marginale*, causadores de meningite bacteriana e anaplasmoses bovina, respectivamente.

Palavras Chaves: ácidos hidroxifenilacéticos, eletropolimerização, eletroquímica, genossensor, imunossensor, meningite, anaplasmoses bovina.

ABSTRACT

In this study we investigated the electropolymerization isomers hydroxyphenylacetic acid, for their application in the construction of polymeric systems, by immobilizing synthetics molecules for development of biological sensors. The graphite electrodes electrochemically modified were characterized for morphology and electrochemical behavior showing that the poly(2-hydroxyphenylacetic acid), poly(3-hydroxyphenylacetic acid) and poly(4-hydroxyphenylacetic acid) are electroactive, and the latter showed a lower yield in electrosynthesis in agreement with the images of atomic force microscopy showed that the surface of graphite electrodes were changed less with this material compared to its isomers. The electrochemical impedance spectra of poly (4-hydroxyphenylacetic acid) showed that this material is more resistive with respect to its other isomers which are more conductive in accordance with the values of current and voltage shown by tests ion exchange the probes positive and negative. The ratio between the masses electrodeposited and the loads required to carry out the redox process these materials remained constant demonstrating that the same number of electrons are involved in reduction and oxidation of these materials according to the diagnostic reversibility applied by cyclic voltammetry are unanimously reversible systems, however poly(3-hydroxyphenylacetic acid) was more stable during repeated cycling electrochemically in perchloric acid. The optimized tridimensional structures justify the electrochemical and morphologic behavior of these three platforms, wherein the poly(2-hydroxyphenylacetic acid) and poly(3-hydroxyphenylacetic acid) have structures with a more ordered arrangement, unlike poly(4-hydroxyphenylacetic acid), which has a rather more disordered structure and therefore more resistive, while isomers are more conductors. The mechanistic proposal begins with the anodic oxidation of monomers whose square wave voltammetry experiments showed the loss of an electron. The couplings between cation radicals promote a formation of ether leaving the acetate groups exposed on the structure. The pairing occurs between the phenolic oxygen and carbon of the aromatic ring whose potential were studied by spin density and consistent with the resonance structures of the cation-radical that are in the suggested mechanisms. In tests incorporation of nitrogenous bases found that poly(3-hydroxyphenylacetic acid) also proved more effective in the retention of the same and for this reason associated with their better electrochemical behavior described above, it was selected among others for applying isomers polimeric systems by immobilizing synthetics molecules by physical adsorption. In the first system froze synthetic oligonucleotides that mimic fragments of DNA from the bacterium *Neisseria meningitidis* able to recognize their genomic DNA in samples of pure cultures by differential pulse voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy, and this latter showed a better response sensitivity signal in relation to the increasing concentration of the target. In the second system, there immobilization of synthetic peptides compatible to the cell membrane of *Anaplasma marginale* able to selectively recognize antibodies in their sera samples from cattle. The images made by atomic force microscopy of the two procedures backing the effective recognition of both polimeric systems developed for the detection of *Neisseria meningitidis* and *Anaplasma marginale* bacteria causing bacterial meningitis and bovine anaplasmosis, respectively.

Keywords: hydroxyphenylacetic acids, electrosynthesis, electrochemical, genosensor, immunosensor, meningitis, bovine anaplasmosis.

1 – INTRODUÇÃO

O grupo que desenvolve pesquisa atualmente no LAFIP-NANOTEC^a tem se dedicado em uma de suas vertentes a modificar quimicamente eletrodos com polímeros condutores buscando aplicações catalíticas e, principalmente, no sensoriamento de doenças humanas e de animais. Nosso grupo está em sincronismo com diversos outros alocados também em outros órgãos governamentais ou privados que tem produzido e divulgado pesquisas relacionadas à construção, diversificação, modificação e aplicação destas matrizes tão peculiares que exibem interessantes propriedades ópticas, elétricas, físicas e ou químicas. O interesse crescente da comunidade científica de maneira geral por este assunto, pode ser evidenciado pelo aumento do número de publicações associadas à nanotecnologia nesta área de investigação.¹

Eletrodos quimicamente modificados com filmes poliméricos são obtidos normalmente por rotas químicas ou eletroquímicas, sendo que nessa última a técnica mais utilizada é a eletropolimerização, que vem consolidando-se como uma metodologia que garante maior sensibilidade, reprodutibilidade e afinidade para a imobilização e incorporação de biomoléculas, tais como proteínas, enzimas, anticorpos/antígenos, fragmentos de DNA, bactérias, fungos, tecidos e mais recentemente, de outras moléculas sintéticas, tais como oligonucleotídeos e peptídeos que se apresentam estáveis por longo tempo. Estas moléculas de origem biológica ou sintética são capazes de realizar reconhecimento específico e seletivo de seus respectivos alvos biológicos complementares, quando imobilizadas sobre as superfícies de um transdutor funcionalizado, sendo chamados de biossensores, a junção entre o transdutor e o componente biológico.

1.1 – Polímeros condutores

A ciência dos materiais classifica os materiais em condutores, semicondutores ou isolantes em função de suas propriedades físicas, dentre elas a capacidade de

^aLaboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia – Instituto de Química - IQ-UFU.

conduzir ou não corrente elétrica é extensamente explorada nesta área de investigação. A associação entre polímeros e materiais isolantes é tradicionalmente comum. De fato, na tecnologia de processamento de polímeros evidencia-se que umas das propriedades importantes dos polímeros é a capacidade de comportarem-se como excelentes isolantes elétricos.

Nos últimos quarenta anos, uma revolução foi iniciada. No início da década de 70, Shirakawa e Ikeda mostraram habilidade em preparar filmes semicondutores de poliacetileno $(CH)_x$ através de polimerização direta do acetileno auto-suportada. MacDiarmid e colaboradores descobriram que a dopagem oxidativa do poliacetileno proporcionava um incremento de doze ordens de grandeza na escala de condutividade, conforme Figura 1.²⁻⁴

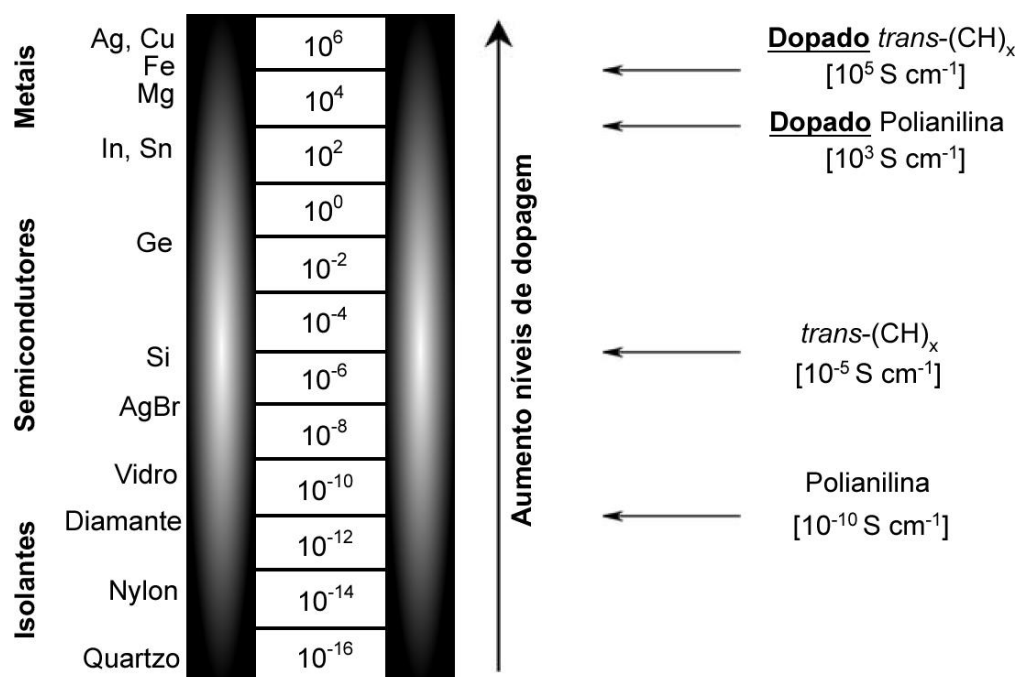


Figura 1: Escala de condutividade.⁴

A elevada condutividade do poliacetileno dopado é equivalente a dos metais e por isso esta nova classe de polímeros orgânicos condutores é comumente conhecida de “metais sintéticos”.

A importância desta descoberta não se restringe à condutividade e sim a uma combinação entre as propriedades de um semiconductor ou metal com as do polímero, desse modo um polímero orgânico possui propriedades elétricas, eletrônicas,

magnéticas e ópticas de um metal, mantendo ainda as propriedades mecânicas características de um polímero convencional, este material é também denominado de polímero intrinsecamente condutor (PIC) ou simplesmente polímero condutor (PC) que atraiu e tem atraído o interesse de inúmeros grupos de pesquisa em todo o mundo, promovendo um rápido crescimento científico estimulando a interdisciplinaridade de investigações nas áreas de Química, Eletroquímica, Bioquímica, Física Experimental e Teórica, Engenharia Eletrônica e Elétrica, dando origem a importantes aplicações tecnológicas destes materiais, além da produção de biossensores.⁵⁻¹⁰

Longos sistemas π conjugados são encontrados impreterivelmente nos PC e os mais estudados são o poliacetileno, polianilina, polipirrol e politiofeno. A Figura 2 mostra a estruturas monoméricas dos principais polímeros condutores estudados na atualidade.⁷

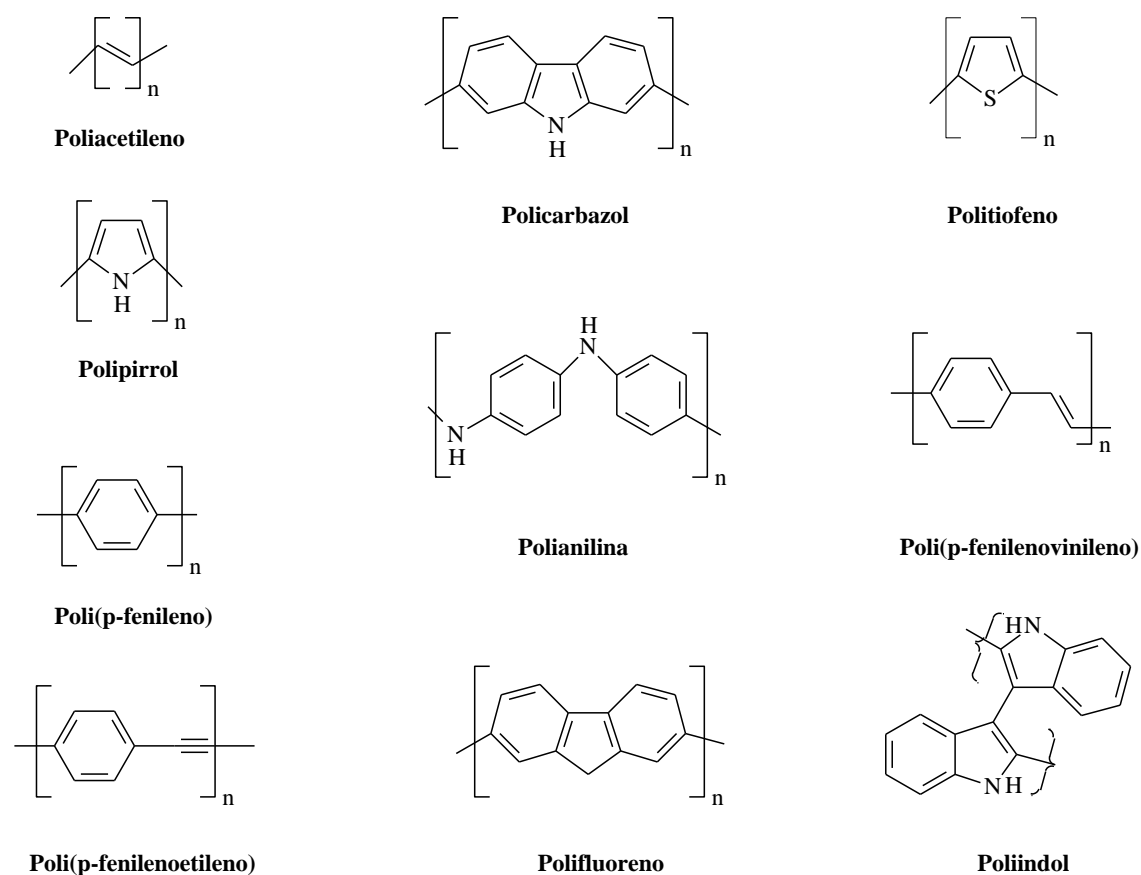


Figura 2: Principais classes de polímeros condutores.⁷

Os PC no estado neutro, ou seja, não carregado praticamente não mostram nenhuma condutividade. A dopagem é uma etapa imprescindível para que polímeros

adquiram cargas transportadoras e se convertam de isolantes a semicondutores ou condutores.



O processo de dopagem é reversível, podendo ser realizado quimicamente ou eletroquimicamente, promovendo a formação de um polímero com pequena ou nenhuma degradação do esqueleto do polímero. Tanto o processo de dopagem quanto o de desdopagem, envolvem os contra-íons, os quais estabilizam o estado dopado. Surge então uma condutividade intrínseca a partir da formação de cargas transportadoras mediante agentes oxidantes, dopagem tipo p, ou agentes redutores, dopagem tipo n, através da estrutura conjugada ao longo da cadeia polimérica. A oxidação do polímero neutro provoca a geração de polarons e na sequência de bipolarons, todavia é válido ressaltar que antes da formação dos bipolarons, a cadeia inteira dos PC deve tornar-se primeiramente saturada com polarons.¹¹⁻¹³

A Figura 3 mostra a formação de polarons e bipolarons na oxidação do poli(4-fenileno). A estrutura do polímero passa a apresentar dopagem do tipo p, embora os conceitos sejam igualmente aplicáveis aos portadores do tipo n, resultantes de um processo de redução em um polímero neutro.

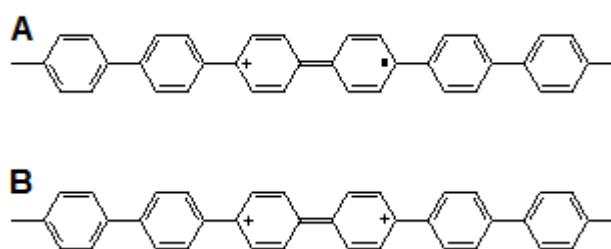


Figura 3: Dopagem do tipo p no poli(4-fenileno). A: Polarons e B: Bipolarons.

Polarons e bipolarons são termos usados na física da matéria condensada equivalentes a cátion-radical e di-cátion, respectivamente, na terminologia química. A oxidação do polímero inicialmente gera um polaron que compreende a região onde ocorre a distorção estrutural provocada pela vacância correspondente a saída do elétron, conforme ilustrado na Figura 3A. O cátion e o radical formam uma “espécie ligada”, já que qualquer aumento na distância entre as duas espécies exigiria a criação de unidades quinóides adicionais com energias superiores. Tratamentos teóricos¹⁴ demonstraram que dois polarons próximos se combinam para formar um bipolaron conforme mostrado na Figura 3B. Um bipolaron é mais estável do que dois polarons, apesar da repulsão coulômbica característica entre dois íons. Isso ocorre porque a cadeia de conjugação

infinita, permite a migração da carga sem afetar a energia da estrutura, desde que não exista barreira de energia significativa para o processo. É esta mobilidade dos portadores de carga que acarretam a elevada condutividade destes polímeros.



Na síntese eletroquímica a incorporação de íons geralmente provenientes do eletrólito suporte, leva à compensação de cargas ao longo da cadeia polimérica gerando o processo de dopagem. Filmes sintetizados por esta técnica, na presença de pequenos ânions que apresentam elevada mobilidade, conferem aos filmes eletrodepositados propriedades de troca aniônica, ocasionando o aumento de volume dos PC durante os ciclos de oxidação em que ocorre a inserção dos ânions na malha polimérica e a respectiva diminuição de volume devido aos ciclos de redução que promovem a expulsão destes ânions no polímero, sendo este efeito comumente usado para simular os processos de contração muscular na produção dos músculos artificiais.⁷

Otero e colaboradores investigaram este mecanismo eletro-hidro-mecânico. Eles estudaram a polarização de um eletrodo revestido com 15 μm de polipirrol. Altos potenciais de redução promoveram a compactação da estrutura polimérica. A oxidação desse polímero ocorre por meio de um processo de relaxamento conformacional, permitindo a abertura de canais na estrutura polimérica suficientemente grande para permitir a penetração de contra-íons no sólido. Eles também observaram que esse processo não é uniforme ocorrendo em pontos específicos da interface polímero/eletrólito.¹⁵

A dopagem dos PC não precisa ser necessariamente eletroquímica como mencionado acima, de fato ela pode ser realizada também quimicamente. Na dopagem química, a oxidação é acompanhada pela exposição do polímero condutor a oxidantes. A polianilina (PANI) é um exemplo clássico de dopagem química devido à protonação ocasionando uma reação redox interna sem que ocorra alteração no número total de elétrons da cadeia polimérica, convertendo a forma semicondutora da PANI (base emeraldina) para a forma condutora (sal de emeraldina). O grau de protonação da base emeraldina depende do grau de oxidação que polímero foi sintetizado, do pH da síntese e da solução dopante. As reações entre as diferentes formas de PANI são mostradas na Figura 4.^{6,7,16}

O processo de dopagem química é relativamente eficiente, entretanto quantitativamente pouco reprodutível, todavia a dopagem eletroquímica é por sua vez superior a dopagem química, uma vez que pelo controle da janela de potencial é

possível promover um ajuste fino no nível da dopagem, sendo esta particularidade aproveitada para construção de dispositivos eletrocromicos.

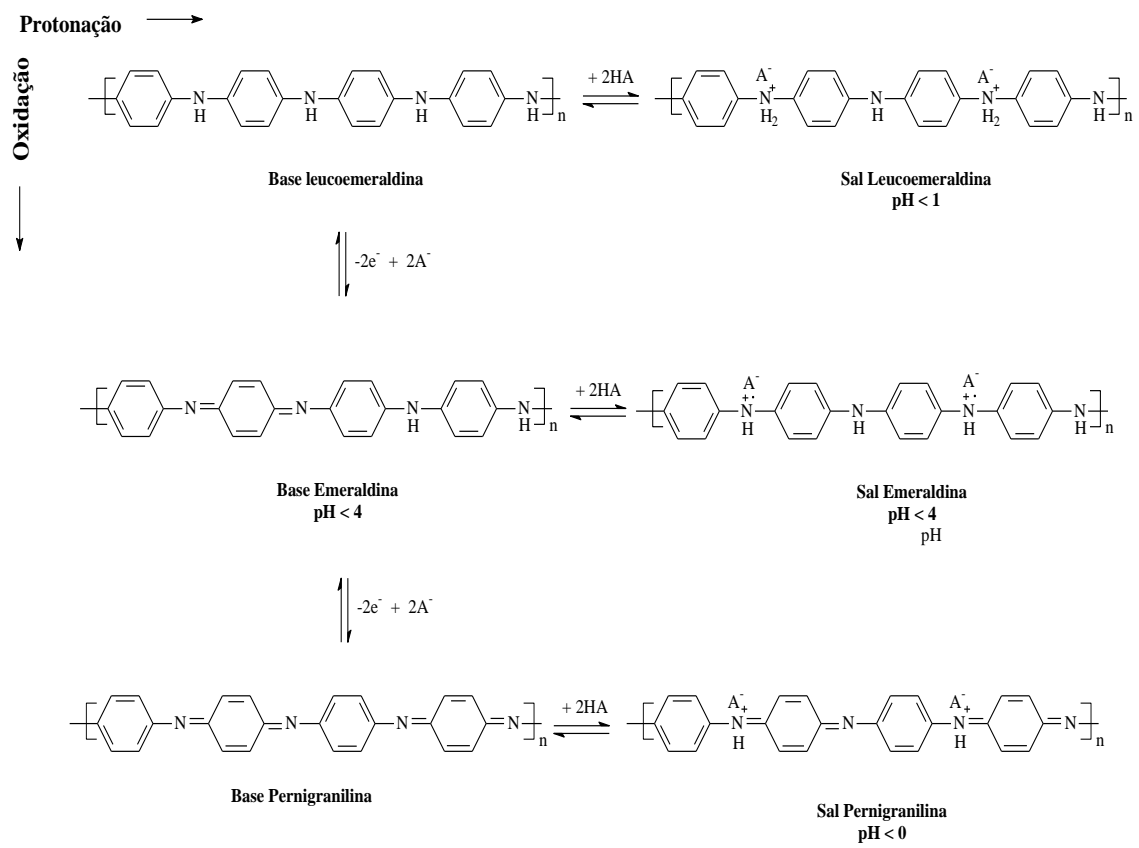


Figura 4: Conversão entre os diferentes estágios da PANI.⁷

O eletrocromismo da PANI foi amplamente estudado principalmente em eletrodos vítreos contendo finas camadas de óxido de índio dopado com estanho (ITO) e óxido de estanho dopado com flúor (FTO) em que o incremento de potenciais no sentido catódico para anódico proporciona modificações estruturais que estão associadas à condutividade e consequentemente ao espectro de absorção e emissão de luz dispostos na Tabela 1.^{5,7,17}

Tabela 1: Polianilina em seus diferentes estágios.

Formas	Condutividade	Cor
Leucoemeraldina	Isolante	Amarela
Sal de emeraldina	Condutora	Verde
Base emeraldina	Isolante	Azul
Pernigranilina	Isolante	Roxa

1.1.1 – Obtenção de polímeros condutores por eletropolimerização



O método eletroquímico é o mais relatado para obtenção dos polímeros condutores, com exceção do poliacetileno. Polimerização eletro-oxidativa tem sido considerada uma rota efetiva e versátil para as modificações de superfícies de eletrodos por compostos poliméricos orgânicos.^{18,19}

O mecanismo de polimerização mais aceito propõe a oxidação do monômero, produzindo um cátion-radical, seguido do acoplamento entre dois cátions radicais, com desprotonação e reconstituição do sistema aromático, conforme pode ser observado na Figura 5. A continuidade da reação ocorre com acoplamento de cátions radicais do monômero e cátions radicais dos oligômeros que se formam.¹⁸⁻²⁰

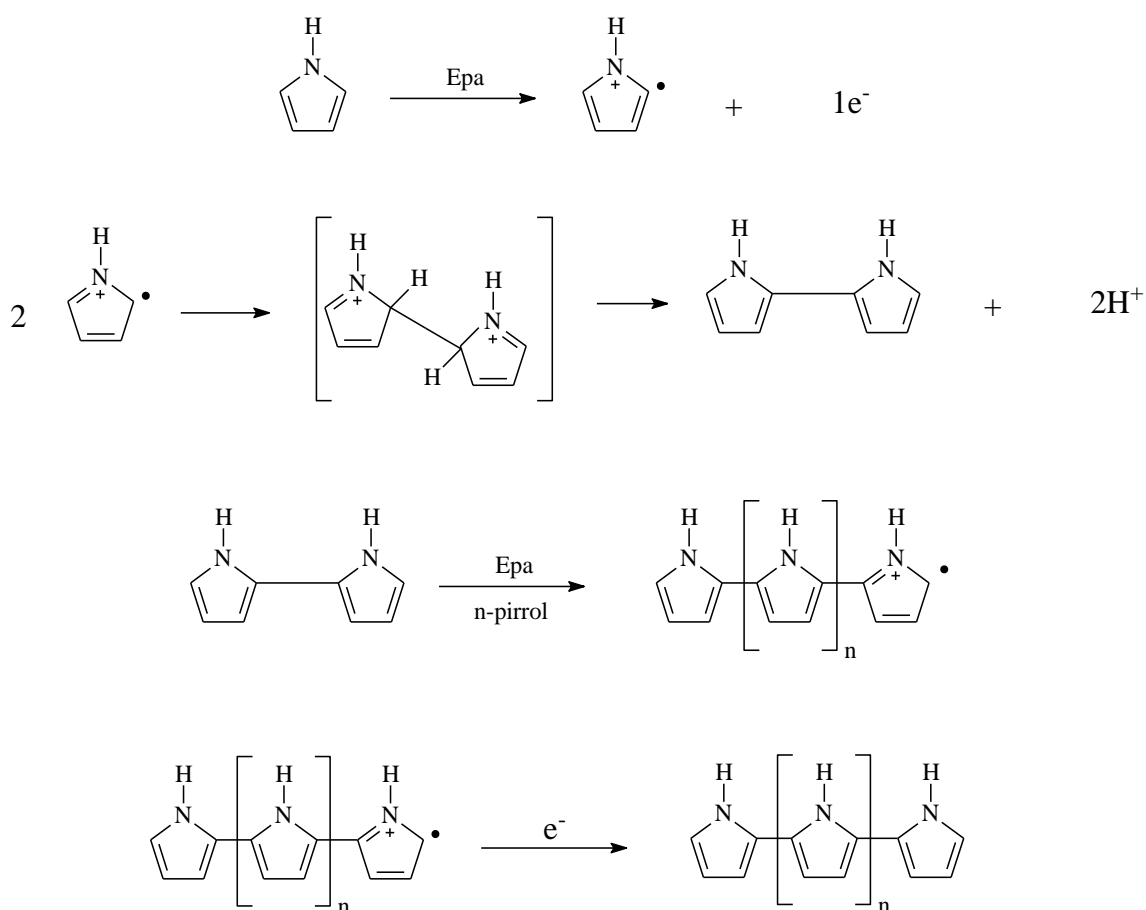


Figura 5: Mecanismo de eletropolimerização para heterociclos de cinco membros.²¹

A estabilidade do cátion-radical do monômero é o fator determinante para obtenção de um polímero com elevado grau de conjugação. Um cátion radical muito estável pode difundir do eletrodo dando origem a oligômeros solúveis, enquanto que um muito reativo pode sofrer reações secundárias. As propriedades elétricas e físico-químicas do material eletrossintetizado dependem fortemente das condições de síntese, principalmente da concentração do monômero, natureza do meio eletrolítico e da temperatura.^{20,22,23}

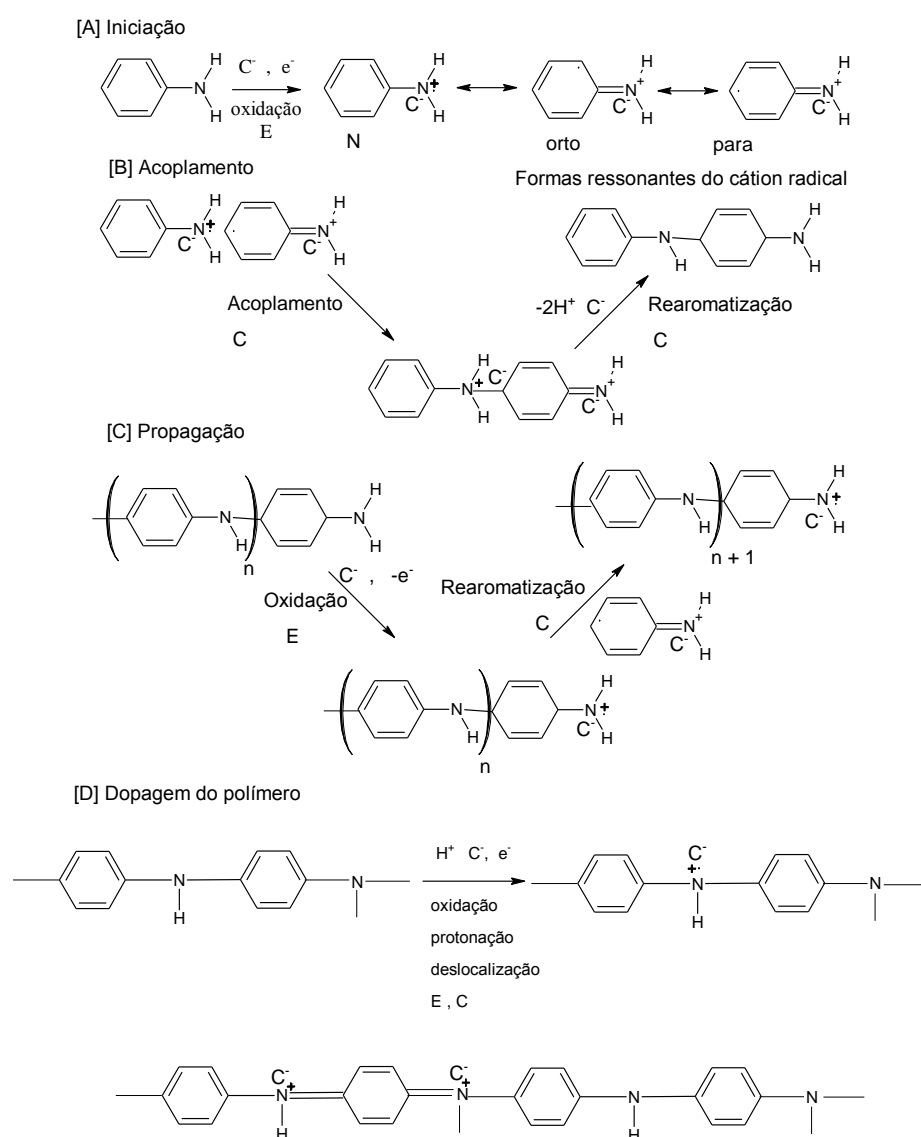


Figura 6: Etapas de polimerização eletroquímica e dopagem da PANI.²⁵

Existe outra possibilidade para obtenção dos polímeros condutores através da síntese química usando um iniciador químico, como um agente oxidante que possui um

potencial de redução suficiente para oxidar o monômero provocando a formação do cátion-radical.²⁴



Nos últimos 30 anos o polímero condutor mais utilizado foi a PANI. Quantidades significativas de artigos foram publicadas envolvendo aplicações distintas da PANI em baterias recarregáveis, dispositivos eletrocromicos, aparelhos de display, supercapacitores, recobrimentos anti-estático e biossensores que culminaram em que a polianilina fosse o primeiro polímero condutor a ter aplicações realmente comerciais. As principais razões para esse crescimento, além do interesse pelas suas propriedades promissoras, foram o baixo custo da polianilina, processamento fácil e estabilidade das formas condutoras.²⁵ A Figura 6 ilustra os mecanismos de síntese eletroquímica da PANI.²⁵

A polimerização eletroquímica da polianilina ocorre por oxidação eletroquímica da anilina num eletrodo de metal inerte como platina ou ouro, vidro condutor ou outros materiais como o carbono vítreo. Os métodos de eletropolimerização mais utilizados são os de corrente e potencial controlado. O eletrólito normalmente é uma solução ácida, cuja escolha do ácido influencia nas propriedades como condutividade, massa molar e solubilidade do polímero produzido.²³

1.1.2 – Aplicações dos polímeros condutores

Na Eletrônica os polímeros condutores estão sendo aplicados principalmente na construção de diodos emissores de luz,²⁶⁻²⁹ capacitores,³⁰ dispositivos para armazenamento e dissipação de carga^{31,32} e também em janelas eletrocromicas.^{33,34} Na Medicina, na fabricação dos músculos artificiais³⁵ e dos sensores encontra-se a principal área de ação dos polímeros condutores. Na Física, os polímeros condutores vem sendo utilizados como componentes de dispositivos de óptica não-linear³⁶. Na Eletroquímica, encontramos uma infinidade de sensores químicos³⁷ e biológicos³⁸, assim como inúmeras reações que podem ser catalisadas,³⁹⁻⁴¹ ambos através de polímeros condutores.

A aplicação destes polímeros está intrinsecamente ligada as suas propriedades como a condutividade elétrica, oxirredução, formação de estados excitados, morfologia e microestrutura. Algumas aplicações conhecidas e outras propostas para os polímeros condutores, em função das suas propriedades, estão ilustradas na Figura 7.²⁴

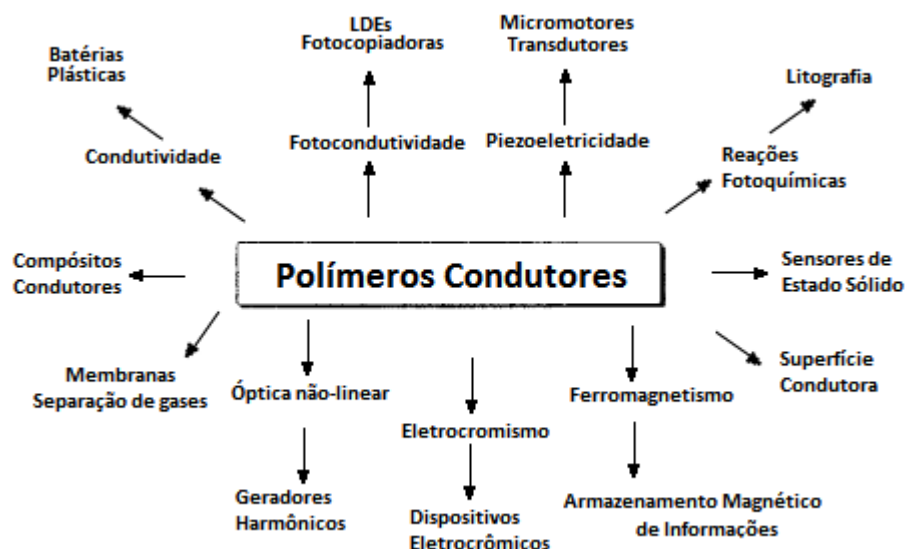


Figura 7: Esquema mostrando várias aplicações conhecidas e propostas para polímeros condutores, em função das suas propriedades.⁵

Melhorar e garantir o desempenho destes materiais tem sido um dos maiores desafios para os pesquisadores da área em todo mundo, buscando polímeros com menos defeitos, maior homogeneidade, estabilidade, organização tridimensional entre as cadeias, reprodutibilidade e condutividade.

Em relação à condutividade, sabe-se que um aumento de condutividade eletrônica está associado a um maior ordenamento molecular e supramolecular nos polímeros e as eletrossínteses estão sendo otimizadas para atingir este objetivo, já que o mecanismo através do qual os polímeros conduzem eletricidade está bem elucidado na literatura.^{11,42-44}

As propriedades elétricas e físico-químicas dos polímeros condutores estão associadas à sua estrutura. Muitas investigações têm sido relatadas utilizando novos monômeros e consecutivamente, obtendo novos polímeros que possam ser aplicados em Eletroquímica e nas demais áreas.^{16,45-47}

1.1.3 – Eletrodos quimicamente modificados com polímeros

Eletrodos quimicamente modificados tem se revelado como uma interessante área de pesquisa da Química Analítica. Isto porque é uma estratégia simples e eficiente

que tem aumentado a sensibilidade e a seletividade das técnicas eletroanalíticas em relação aos procedimentos com eletrodos convencionais. A possibilidade de elaborar sistemas analíticos com reagentes imobilizados tem se tornado uma das vertentes mais promissoras da Eletroanálise, principalmente no campo de análises biológicas e ambiental.⁴⁸

Uma técnica bastante atrativa para a preparação de eletrodos modificados é o recobrimento das superfícies dos eletrodos com filmes poliméricos, que são normalmente condutores ou permeáveis ao eletrólito de suporte e às espécies de interesse. A modificação dos eletrodos com filmes poliméricos tem permitido a imobilização de muitas monocamadas, aproximadamente de 1 a 20000, normalmente mensuradas por microbalança de cristal de quartzo, o que tem resultado na ampliação da resposta eletroquímica.⁴⁸

Embora as respostas eletroquímicas dos eletrodos modificados por polímeros sejam mais fáceis de detectar do que aquelas dos eletrodos modificados por monocamadas, elas também são complicadas pela sobreposição de processos como transporte e transferência de carga, movimento de contra-íons para dentro e fora do polímero, movimento do filme polimérico e inchaço com o solvente e difusão do analito no filme. Estes processos foram estudados para melhorar a interpretação da resposta voltamétrica.⁴⁹ Mesmo assim, a modificação polimérica do eletrodo permanece um procedimento conveniente e simples para melhorar o desempenho de eletrodos apresentando uma infinidade de aplicações.⁵⁰

O recobrimento polimérico do eletrodo pode ser obtido por vários métodos como, por exemplo, a cobertura por banho, evaporação, deposição oxidativa ou redutiva, cobertura e rotação, plasma, foto-induzida por UV e por eletropolimerização em que os produtos da reação no eletrodo são polímeros insolúveis no solvente utilizado que apresentam propriedade elétricas e analíticas muito interessantes.⁵⁰⁻⁵³

A síntese eletroquímica de um polímero pode ser feita por diferentes técnicas. A mais usada é a voltametria cíclica, todavia crescimento de filmes usando técnicas potencioestáticas ou ainda galvanostáticas promovem a formação de filmes mais espessos em um tempo menor de eletrossíntese.

Uma das características mais importantes diz respeito à estabilidade destes filmes poliméricos. De fato, o conhecimento da sua estrutura e de sua resposta eletroquímica, assim como o mecanismo de deposição e a cinética associadas a estas transições são extremamente importantes para suas respectivas aplicações.⁵⁴

1.2 – Polímeros condutores aplicados em sensores

Das diversas aplicações possíveis usando polímeros condutores, sem dúvida a sua utilização nos sensores é uma das que mais cresceram nos últimos anos.^{25,55} Isto, está associado diretamente às propriedades elétricas, eletroquímicas e óticas destes polímeros e que podem ser usadas, para converter informações físicas e químicas, tais como, concentração, atividade e pressão parcial para a análise dos gases em um sinal analiticamente mensurável. Os sensores que usam polímeros condutores são geralmente ferramentas de baixo custo na Química Analítica qualitativa ou quantitativa capazes de identificar e/ou quantificar uma grande quantidade de analitos químicos e biológicos imprescindíveis para o controle de qualidade de alimentos, bebidas, fármacos, diagnósticos clínicos e detecção de armas químicas e biológicas. Além disso, estes sensores podem diminuir custos e o tempo de análise, em relação à maioria dos métodos analíticos convencionais.⁵⁶⁻⁶⁰

Os sensores baseados em polímeros condutores são constituídos geralmente de um transdutor e de um material polimérico sensório que interage com o analito provocando uma mudança nas propriedades normalmente elétricas e óticas que, são convertidas em sinal mensurável em função da qualidade e/ou quantidade de analito em estudo.⁶¹

As principais vantagens de se usar polímeros condutores como matrizes para imobilização de moléculas biológicas e sintéticas dizem respeito principalmente à diversidade de tipos de polímeros que podem ser usados e seu custo relativamente baixo, assim como as técnicas usadas para obtenção do sinal elétrico ou óptico serem comparativamente mais baratas. Os polímeros condutores associados às moléculas de reconhecimento podem ser usados para análise de diversificados analitos, incluindo os biológicos, produzindo assim os biossensores.⁵⁶⁻⁶⁰

Nestes dispositivos a geração do sinal ocorre quando as moléculas do analito interagem com a camada sensório por meio de processos físicos e químicos de acoplamento promovendo mudanças, geralmente nas propriedades elétricas ou óticas, que são detectadas por um transdutor apropriado e convertidas num sinal de saída mensurável normalmente interligado a um software específico.^{8,62,63}

Os sensores eletroquímicos exploram as reações que ocorrem na superfície do eletrodo para obter informações analíticas. Como já citado anteriormente, muitos pesquisadores modificam a superfície de um eletrodo através da deposição química ou

eletroquímica de polímeros condutores. Os sensores eletroquímicos podem ser classificados em potenciométricos, voltamétricos e amperométricos dependendo da natureza do sinal elétrico. O princípio da transdução em sensores potenciométricos é baseado na relação entre o potencial de uma célula galvânica eletroquímica, medido entre dois eletrodos sob um equilíbrio condicionado, e a atividade da espécie química do analito. Já em um sensor voltamétrico, sua resposta é baseada na medida de uma corrente elétrica em função do potencial aplicado sob condições de não equilíbrio.^{64,62}

Em sensores voltamétricos, o potencial do eletrodo de trabalho é controlado por um potenciostato e durante a varredura, a corrente produzida devido às reações de oxirredução dos compostos com a superfície do eletrodo de trabalho é medida. O princípio de transdução de sinal em sensores amperométricos é baseado na medida de uma corrente elétrica que seja diretamente proporcional à concentração da espécie de interesse (analito). Este tipo de sensor trabalha numa região onde o processo redox é completamente limitado pelo transporte de massa e tem consequentemente uma resposta linear em função da concentração do analito. A medida consiste em aplicar um potencial constante entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência, mantido geralmente por uma fonte externa, e medir a corrente fluindo entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar ou contra-eletrodo em função do tempo.⁶⁵⁻⁷⁰

As medidas amperométricas são amplamente empregadas em sensores biológicos e químicos. Dentre as vantagens destas medidas, destaca-se a compatibilidade da amperometria com o uso de ultramicroeletrodos. Estes dispositivos apresentam área superficial extremamente reduzida, o que minimiza a corrente capacitiva e intensifica o transporte de massa do analito devido à contribuição da difusão radial, aumentando a sensibilidade da detecção. Além disso, a geometria do eletrodo bem como sua superfície podem ser modificadas para alcançar finalidades mais específicas.⁷¹⁻⁷⁴

Embora os sensores amperométricos baseados em polímeros condutores sejam usados quase que exclusivamente em sensores e biossensores, outras aplicações como em análises ambientais e de alimentos para a detecção de dióxidos de enxofre, peróxido de hidrogênio, amônia e ácido ascórbico, também são relatadas.⁷⁵⁻⁷⁹

Os sensores condutimétricos são constituídos, geralmente, de um arranjo de sensores que podem ser desenvolvidos através de diferentes polímeros conjugados, ou por um mesmo polímero com diferentes dopantes. Cada polímero é depositado sob microeletrodos interdigitados que atuam como transdutores de sinal. Os principais

métodos usados pra obtenção da resposta dos sensores são baseados em medidas de condutividade, resistividade, impedância ou admitância.^{80,81}



Buscando ampliar as aplicações potenciais dos polímeros condutores em biossensores, surgem as investigações das propriedades de polianilinas substituídas, como é o caso dos aminofenóis que, ao contrário do fenol, anilina e outras anilinas substituídas, apresentam dois grupos funcionais (NH_2 e OH) que podem ser oxidados. Portanto, eles podem apresentar comportamento eletroquímico intermediário ao das anilinas e fenóis.⁸²⁻⁸⁶

A substituição da hidroxila dos aminofenóis por grupos tióis ($-\text{SH}$) gera a classe de monômeros denominados aminotiofenóis. O LAFIP-NANOTEC já estudou, extensivamente, os filmes derivados de aminofenóis e mais recentemente tem se dedicado ao estudo de filmes poliméricos derivados de aminotiofenóis e éteres alquil-arílicos como os monômeros de ácidos hidroxifenilacéticos.⁸⁷⁻⁹⁴

O interesse nestes monômeros está voltado principalmente para a aplicação em sensores biológicos, uma vez que, quando eletropolimerizados, geralmente um dos grupos funcionais é preservado, o que facilita a interação com o material biológico a ser imobilizado sobre os eletrodos modificados com estes filmes poliméricos.⁹⁵⁻

101

1.3 – Biossensores

Os biossensores são dispositivos que utilizam reações biológicas entre enzimas, anticorpos/antígenos, DNA, bactérias, tecidos, etc., para detecção de analitos (alvo). Tais dispositivos combinam um componente biológico, normalmente, imobilizado em transdutores capazes de converter os processos de biorreconhecimento em sinais mensuráveis. As suas principais vantagens são a elevada sensibilidade, seletividade, acessibilidade e uso *in loco*. Todavia, também apresentam desvantagens, como a pouca estabilidade a longo prazo e problemas de transferência de elétrons.⁷⁰ Mesmo assim estes dispositivos tem se tornado importantes ferramentas analíticas nas áreas de alimentos, controle da qualidade da água, saúde, segurança, e monitoramento ambiental.^{102,103}

Os biossensores podem ser de detecção direta, nos quais a interação biológica é medida diretamente, fazendo uso de biomoléculas não-catalíticas, como receptores celulares e anticorpos, ou de detecção indireta, também conhecidos como sensores

marcados, em que há o uso de biomoléculas fluorescentemente marcadas ou elementos catalíticos, como as enzimas. Os sistemas de detecção indireta tem uma maior estabilidade e são mais simples de usar, mas os sistemas de detecção direta tem melhor sensibilidade, menor tempo de análise e custo mais baixo.^{103,104}

Uma outra classificação geral faz a distinção entre os biossensores que podem ser catalíticos ou de afinidade, este último utiliza anticorpos, DNA, oligonucleotídeos ou peptídeos, como moléculas de bioreconhecimento (bioafinidade), enquanto o primeiro faz uso de enzimas (bioanálíticos).^{105,106}

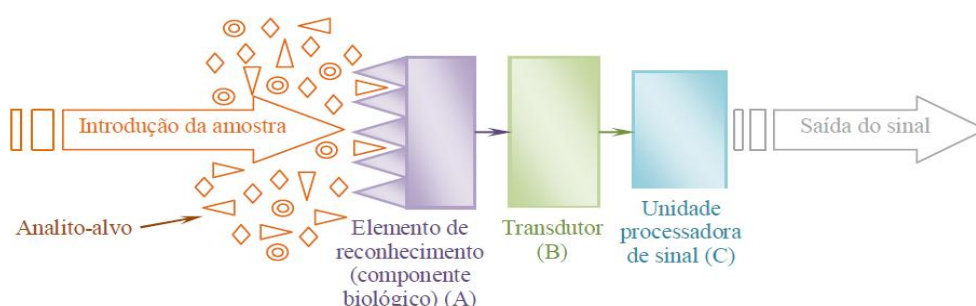


Figura 8: Esquema ilustrativo de um biossensor.¹⁰⁷

A Figura 8 mostra um esquema ilustrativo explicitando a configuração de um biossensor, no que tange a organização dos seus componentes funcionais.

A detecção do alvo é feita seletivamente por um componente biológico que gera um sinal (A), que é convertido por um transdutor (B) em um sinal mensurável através de um processador (C).

1.3.1 – Técnicas de imobilização e transdutores

As técnicas de imobilização determinam a estabilidade das biomoléculas nos transdutores influenciando a sensibilidade e confiabilidade do sinal do biossensor. O principal aspecto a ser observado é a retenção máxima da atividade da biomolécula na superfície do transdutor, sendo uma consequência direta da preservação dos sítios ativos destas biomoléculas. A adsorção física e a ligação covalente são as técnicas de imobilização de biomoléculas mais utilizadas, todavia outras estratégias como as de ligação cruzada (*cross-linking*) e oclusão (*entrapment*) também são frequentemente utilizadas. A adsorção física possui a vantagem de simplicidade, já que não exige

qualquer modificação química, requerendo apenas que uma solução contendo o componente biológico seja colocada em contato com o transdutor, onde a interação entre a biomolécula e o transdutor é baseada na formação de forças atrativas de Van der Waals, ligações de hidrogênio e complexos de transição de elétrons.¹⁰⁸⁻¹¹¹

O transdutor age então como uma interface, medindo a mudança física ou química que ocorre na reação do biorreceptor e alvo e transformando em um sinal mensurável, como massa, carga elétrica, calor ou luz. Os mecanismos de transdução mais usuais na construção de biossensores são apresentados na Tabela 2.^{106,112}

Tabela 2: Principais sistemas de transdução de sinal físico-químico.

Sistema de transdução	Medida
Eletroquímico	Amperometria e Potenciometria
Elétrico	Condutividade
Óptico	Luminescência e Fluorescência
Térmico	Calorimetria
Piezelétrico	Eletrogravimetria

1.3.2 – Classificação dos biossensores

O tipo de biomolécula imobilizada sobre o transdutor diferencia os biossensores no que tange a sua aplicação. Sendo assim os biossensores podem ser classificados em enzimáticos, quando o componente biológico é uma enzima; microbiológicos, quando o componente é representado por fungos, bactérias, organelas vegetais e animais dentre outras; genossensores, quando as biomoléculas são oligonucleotídeos, produtos de PCR ou fragmentos de DNA, imunossensores, quando as biomoléculas são antígenos ou anticorpos.

Nestes dois últimos, temos que os genossensores baseiam-se na imobilização de fragmentos de DNA ou oligonucleotídeos. A simples fita (ssDNA), após interação com alvo complementar regenera a dupla fita (dsDNA), num processo conhecido como hibridização. Este sinal pode ser detectado diretamente ou indiretamente por meio de intercaladores como o brometo de etídio e azul de metileno, bem como pelo uso de compostos a base de cobalto ou rutênio, visando redução dos potenciais de oxidação.¹¹³⁻

Por outro lado, os imunossensores baseiam-se no uso de um anticorpo que reage especificamente com uma substância (antígeno) a ser testada ou detectada. A imobilização do receptor (i.e., antígeno) sobre um substrato é conveniente para aplicações de reconhecimento biomolecular para detecção da molécula alvo (i.e, anticorpo) presente na solução. A especificidade da interação antígeno-anticorpo permite o desenvolvimento de imunossensores para diagnósticos clínicos, monitoramento ambiental, dentre outros.¹⁰⁶

1.4 – Biossensores aplicados ao diagnóstico de doenças infectocontagiosas

Há aproximadamente quarenta anos os estudos de DNA foram facilitados devido à descoberta das enzimas de restrição que tem a capacidade de “picotar” a molécula de DNA sempre em determinados pontos, levando a produção de fragmentos contendo extremidades adesivas, que podem se ligar a outras pontas de moléculas de DNA que tenham sido cortadas com a mesma enzima. Na Engenharia Genética, a obtenção dos fragmentos de DNA serve para criar, *in vitro*, novas moléculas, recortando e colando vários pedaços de informações obtendo assim amplificação de uma sequência específica de DNA numa técnica hoje conhecida como *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Com essa técnica, fazer milhares de cópias de um único DNA tornou-se relativamente simples a partir de um *primer*^b, de uma enzima DNA polimerase e do próprio DNA. A determinação do motivo ou sequência (s) do DNA responsável (is) pelas doenças tem sido a ocupação de vários pesquisadores em todo mundo. Radström e colaboradores¹¹⁸ usando a estratégia de PCR conseguiram detectar o DNA bacteriano em líquido cefalorraquidiano através de um ensaio para a detecção simultânea de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus*, causadores da meningite bacteriana. Eles conseguiram desenhar *primers* específicos equivalentes à fragmentos de DNA destas bactérias. Este grupo de pesquisa realizou ensaios de detecção usando estes *primers* em 125 amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes com meningite bacteriana, obtendo alta sensibilidade e especificidade.

Outra técnica de biologia molecular que pode ser empregada para produzir moléculas sintéticas equivalentes a biomoléculas é o *phage display*. Com esta técnica é

^b Os primers são fitas de DNA, com mais ou menos 20 pares de bases nitrogenadas complementares ao início da sequência de DNA que se quer multiplicar.

possível selecionar e isolar vetores de clonagem gerados a partir de bibliotecas genômicas, juntamente com seu produto gênico, normalmente um peptídeo. Por meio da utilização de fagos filamentosos infecciosos é possível rastrear clones, devido à ligação do peptídeo de interesse, com o vetor de clonagem que o expressou, por exemplo, proteínas de superfície de bactérias como a *Anaplasma marginale*.¹¹⁹



O peptídeo ou proteína expressa na superfície do fago possibilita a seleção de sequência baseada na afinidade de ligação a uma molécula alvo por um processo de seleção *in vitro* denominado *biopanning*, realizado pela incubação da biblioteca de peptídeos expostos em fagos contra o alvo. A complementaridade é comprovada através da imobilização do alvo em um suporte sólido tais como, placas de ELISA em que os fagos não ligantes ao alvo são eliminados por lavagens sucessivas e os fagos específicos permanecem ligados para próxima eluição. O conjunto de fagos específicos é amplificado para os ciclos posteriores de seleção biológica, que envolvem a ligação, eluição e amplificação, com isso ocorre o enriquecimento daqueles peptídeos com sequência específicas que reconhecem o alvo. Após três a cinco ciclos, os clones individuais são caracterizados por sequenciamento de DNA, *western blotting* ou ELISA em que a análise por bioinformática é capaz de evidenciar a sequência em comum entre os peptídeos ligantes revelando o motivo necessário para ligação.¹²⁰⁻¹²²

A Figura 9 ilustra a seleção de proteínas ligantes a partir de uma biblioteca de *phage display*. As bibliotecas de proteínas são apresentadas em partículas de fagos. Em cada ciclo, os fagos reativos ao alvo são selecionados, seguido pela lavagem e remoção dos fagos não ligantes. Os fagos remanescentes são então amplificados pela infecção em bactérias *E. coli* e utilizados em outro ciclo de seleção, para a maturação da afinidade de ligação ao alvo específico. O DNA de cada clone selecionado pode ser sequenciado e revelar a sequência da proteína apresentada.

Uma das grandes vantagens apresentadas pela técnica de *phage display* pode ser resumida na capacidade de mapeamento de epitopos de anticorpos que associada à engenharia dos fagos oferecem novas oportunidades em vários setores na bionanotecnologia, como na química aplicada à fabricação de materiais bioseletivos. Com possíveis aplicações na construção de drogas, biossensores e nanoeletrônicos.¹²³⁻

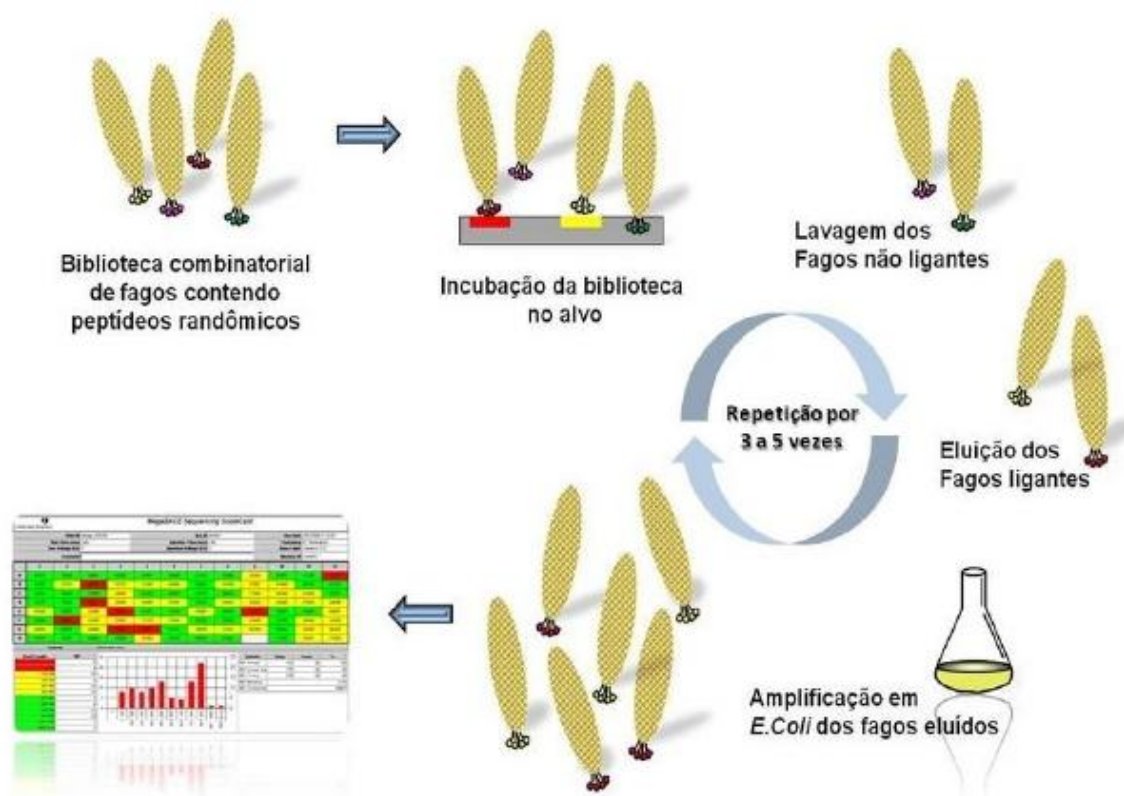


Figura 9: Esquema ilustrativo de seleção de proteínas por *phage display*.¹²⁶

1.5 – Genossensores

Os genossensores, conforme já definidos no item 1.3.2, são comumente conhecidos como biossensores de DNA. Estes dispositivos, altamente seletivos, resultam das propriedades específicas de interação com as bases nitrogenadas, presentes na molécula de DNA.¹²⁷

1.5.1 – Estrutura e propriedades da molécula de DNA

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é encontrado no núcleo celular, sendo um biopolímero que contém as instruções genéticas que coordenam o desenvolvimento e funcionamento de todas as células dos seres vivos e de alguns vírus.

Do ponto de vista químico, o DNA é uma macromolécula, formada por unidades de nucleotídeos que por sua vez é composto de açúcar (desoxirribose) ligado por uma extremidade a um grupo fosfato e pela outra a uma base nitrogenada, ou seja, é uma cadeia polimérica constituída por moléculas de açúcar e fosfato intercalados unidas por

ligações fosfodiéster. Nas moléculas de açúcar sempre encontramos ligado covalentemente uma das quatro bases nitrogenadas conforme demonstrado na Figura 10.^{128, 129}

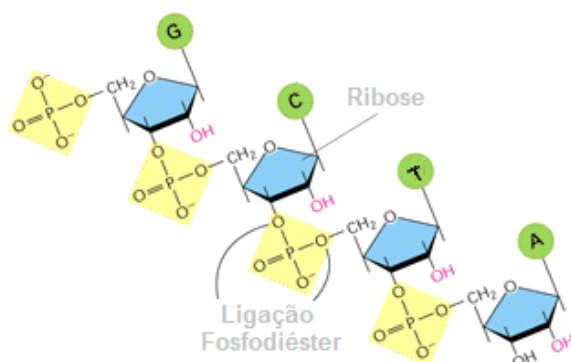


Figura 10: Ligação fosfodiéster entre nucleotídeos.

Na Figura 10, A, C, G e T, são as bases nitrogenadas, Adenina, Guanina, Citosina, e Timina, respectivamente, estas podem ser bases puricas, cujas estruturas contêm dois anéis e as pirimidicas, cujas estruturas contêm um único anel. As quatro bases existentes no DNA são mostradas na Figura 11, sendo que a uracila está presente somente na estrutura do RNA.

O grupo fosfato e a pentose são ligados entre si através de uma ligação fosfoéster, envolvendo a hidroxila ligada ao carbono-5 da pentose. A ligação entre a base nitrogenada e a pentose, ocorre através de uma ligação N-glicosídica na hidroxila ligada ao carbono-1 da pentose. A orientação das ligações entre as três moléculas nos nucleotídeos é essencial para se determinar o sentido da dupla fita de DNA, conforme observado na Figura 12.^{128,129}

O crescimento da cadeia de DNA, através dos nucleotídeos, ocorre entre os grupos hidroxila do carbono-3 da pentose de um nucleotídeo se ligando ao grupo fosfato que por sua vez está ligado à hidroxila do carbono-5 da pentose de outro nucleotídeo, formando assim as ligações fosfodiéster ilustradas na Figura 10.

Nesta formação, a cadeia de DNA fica com uma direção bem definida, ou seja, em uma extremidade temos livre a hidroxila do carbono-5 da primeira pentose e na outra temos livre a hidroxila do carbono-3 da última pentose, determinando o crescimento do DNA na direção de 5' para 3' indicado na Figura 12.¹³⁰

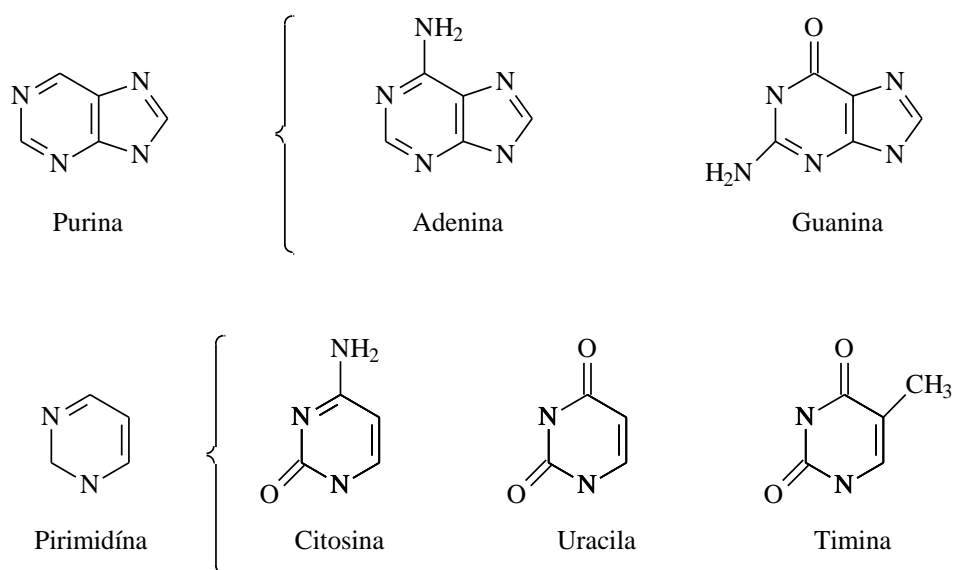


Figura 11: Bases nitrogenadas presentes na estrutura do DNA.

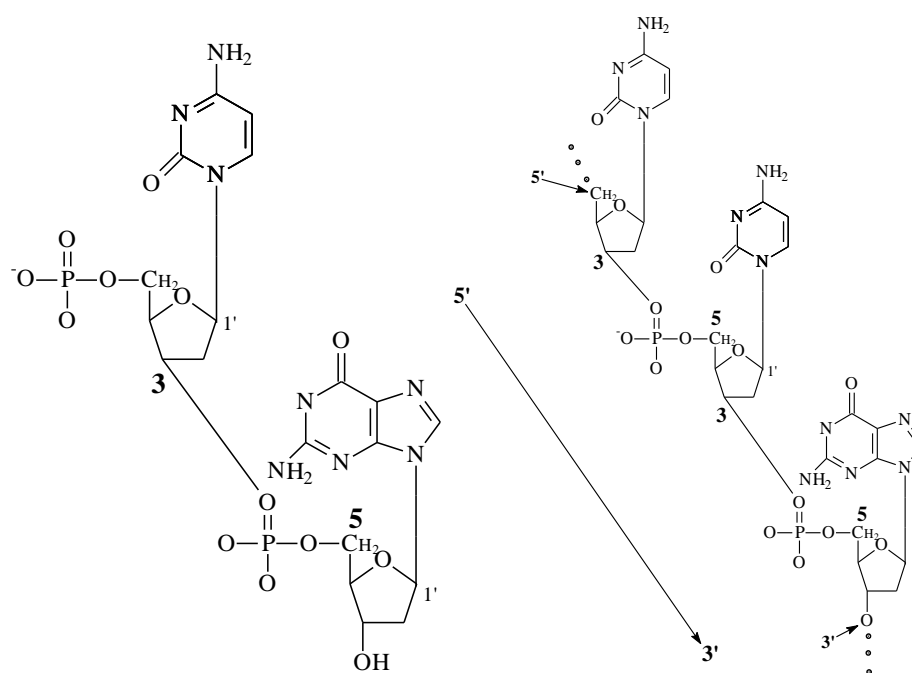


Figura 12: Ligação fosfodiéster entre dois nucleotídeos e o respectivo crescimento da cadeia de DNA.

A Figura 13 ilustra a estrutura 3D de um DNA onde observamos duas cadeias helicoidais de nucleotídeos, enroladas ao longo de um eixo, formando uma dupla hélice de sentido rotacional à direita (Figura 12B), sendo que nesta dupla hélice as duas fitas de DNA estão em direções antiparalelas, ou seja, uma das fitas tem a direção exata da sua síntese (5'---3') enquanto que a outra está invertida (3'----5') (Figura 12 C).¹³⁰

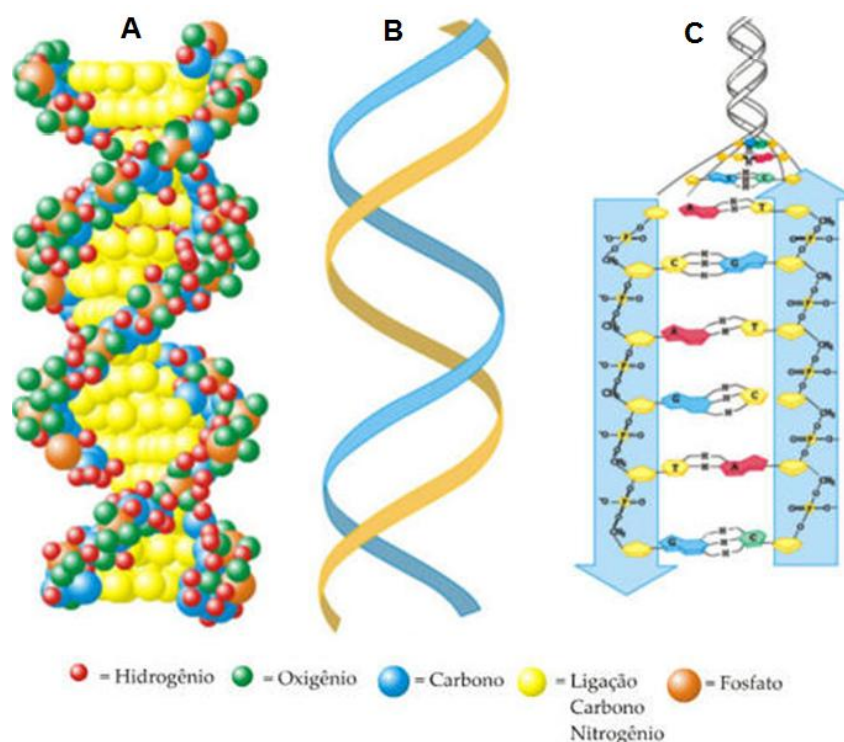


Figura 13: Modelo de estrutura 3D de DNA no plano e retorcida proposto por Watson, Crick e Wilkins^c.

Esta estrutura de dupla hélice do DNA divide-o quanto à hidrofobicidade em duas regiões distintas, sendo uma delas a parte externa hidrofílica, formada pelos grupos fosfatos e açúcar (Figura 13A, regiões vermelha, verde, azul e marrom) e a outra a parte interna e hidrofóbica formada pelas bases nitrogenadas. Dessa forma obtém-se uma relação espacial entre as duas fitas de maneira que se forma um sulco principal e um sulco secundário (Figura 13). O pareamento das bases de cada fita se dá de maneira padronizada, sempre uma purina com uma pirimidina, especificamente a adenina com timina e citosina com guanina, através de ligações de hidrogênio o que promove uma estabilidade da dupla fita juntamente com as interações hidrofóbicas que forçam as bases nitrogenadas a ficarem na região interior do DNA.

A Figura 14 mostra as duas ligações de hidrogênio entre a adenina e a timina e as três ligações de hidrogênio entre a guanina e a citosina.

^c James Watson, Francis Crick e Maurice Wilkins são os autores do "modelo de dupla hélice" para a estrutura da molécula de DNA. O trabalho publicado em 1953 na revista Nature valeu-lhes o Nobel de Fisiologia/Medicina de 1962.

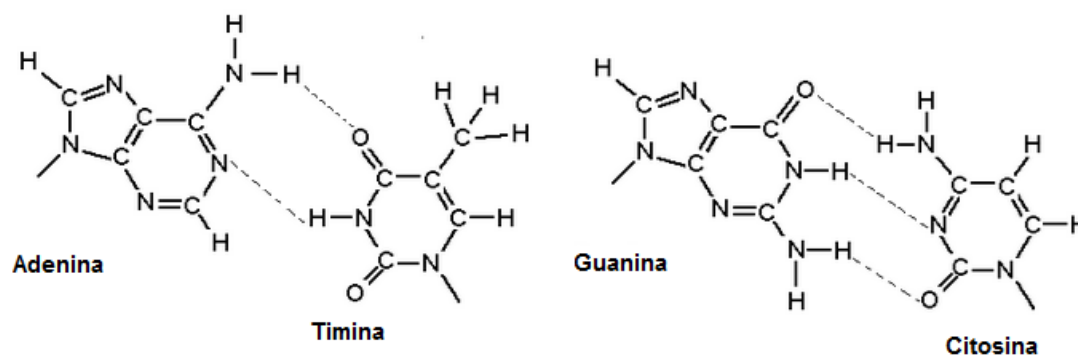


Figura 14: Formação das ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas.

A estrutura 3D do DNA explica as propriedades físicas e químicas peculiares do DNA, como sua elevada viscosidade em pH neutro, de maneira que a pH extremos (≈ 10) ou a elevadas temperaturas ($\approx 100\text{ }^{\circ}\text{C}$) temos a sua desnaturação, que não destrói as ligações covalentes, mas apenas as ligações de hidrogênio, preservando integralmente assim a simples fita. O retorno do pH neutro e o abaixamento de temperatura provocam espontaneamente a hibridização das duplas fitas em duas etapas, sendo a primeira etapa lenta devido ao encontro casual das fitas complementares, formando um curto segmento de dupla hélice e a segunda etapa rápida devido à formação novamente das ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas regenerando a sua conformação tridimensional original.^{128,129}

1.5.2 - Princípio de funcionamento dos genossensores

Nos genossensores são utilizados elementos de reconhecimento (sondas) para sensoriamento do processo de formação DNA-DNA, DNA-RNA e a interação entre proteínas ou moléculas reagentes ao DNA na superfície do sensor. A imobilização destas sondas é uma etapa importante na preparação dos genossensores, que garante o bom desempenho e funcionamento do sensor utilizado. Em sensores de DNA as sequência específicas de oligonucleotídeos^d ou até mesmo fragmentos de DNA podem ser imobilizados por adsorção física, complexos envolvendo biotina-avidina, ligações covalentes e ainda imobilização sobre a superfície de eletrodos compósitos.¹³¹

^d Oligonucleotídeo é um fragmento curto de uma cadeia simples de ácido nucléico (DNA ou RNA), tipicamente com 20 ou menos bases nitrogenadas.

Muitas técnicas de detecção estão sendo aplicadas nos genossensores, cujo sinal normalmente é obtido pela transdução eletroquímica, óptica e piezelétrica.^{131,132}

A detecção eletroquímica apresenta muitas vantagens sobre os demais sistemas devido à ampla diversidade de modificações possíveis para os transdutores com procedimentos químicos ou eletroquímicos, sendo este último considerado melhor para reconhecimento dos alvos no sensoriamento dos eventos de hibridização.^{132,131}

A hibridização normalmente pode ser detectada eletroquimicamente de maneira indireta através dos intercaladores de DNA ou por espécies eletroativas que tem a capacidade de interagir com as bases guanina das sequências de DNA, como por exemplo, o brometo de etídio (BE). Deste modo, a Figura 15 mostra um esquema ilustrativo de detecção de DNA envolvendo este tipo de composto.

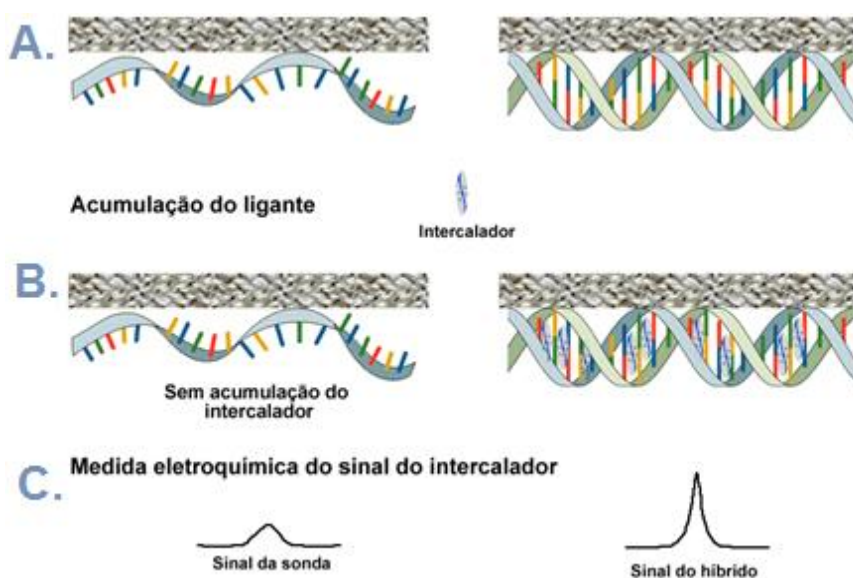


Figura 15: Esquema ilustrativo para as etapas de obtenção de um genossensor eletroquímico, onde: (A) etapa de hibridização, (B) etapa de intercalação do composto eletroativo ao híbrido formado e (C) etapa de detecção eletroquímica.

Quando a sonda entra em contato com o alvo complementar por certo período (tempo de incubação), ocorre à formação do híbrido (Figura 15A). Após etapas de lavagem, para remoção de interações não-específicas, o sensor é colocado em contato com o agente intercalador, que se liga preferencialmente a dupla hélice (Figura 15B), com consequente acúmulo do mesmo na superfície híbrida.^{113,133-}

Devido às propriedades eletroativas destes compostos, os eventos de hibridização podem ser detectados indiretamente (Figura 15C) pelo efeito da intercalação.

A detecção de sequências de bases específicas de humanos, vírus, bactérias e ácidos nucleicos, está se tornando cada vez mais importante no diagnóstico de doenças.¹⁴⁰⁻¹⁴⁴

1.5.3 - Detecção da hibridização com brometo de etídio

O brometo de etídio [(brometo de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridínio)] que sem dúvida é um dos melhores agentes conhecido para intercalar ao DNA, foi primeiramente sintetizado em 1952 por Watkins e Woolfe.¹⁴⁵

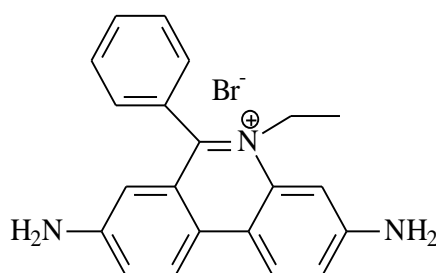


Figura 16: Estrutura molecular do brometo de etídio.

A estrutura do brometo de etídio (BE) é mostrada na Figura 16, onde se observa na sua molécula uma estrutura aromática tricíclica com grupos amino-benzênicos nas extremidades da molécula piridínica, constituindo uma dibenzopiridínica, largamente conhecida com o nome de fenantridina. O BE é um sólido vermelho escuro, cuja estrutura apresenta um sistema π conjugado de elétrons capazes de absorver radiação e emitir na forma de luminosidade, ou seja, o BE tem propriedades fluorescentes.¹⁴⁶

A sugestão mais aceita na literatura explicita que a intercalação do BE ao DNA ocorre através do empilhamento dos grupos aromáticos planares entre os espaços vazios dos pares de bases (Figura 17A).

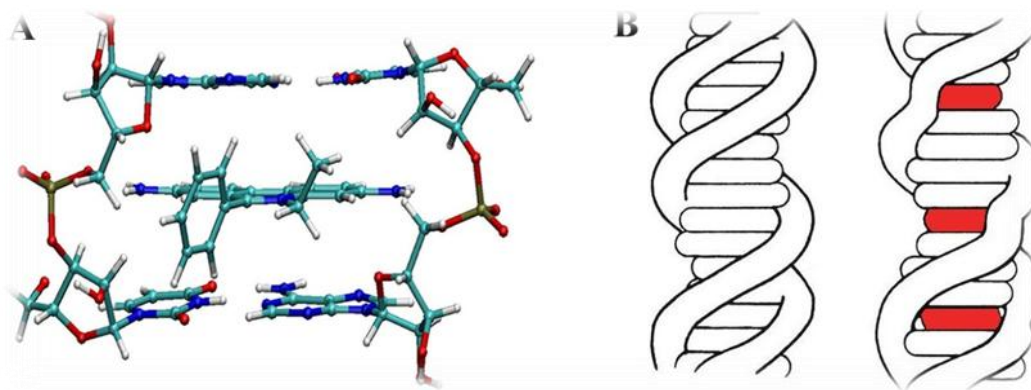


Figura 17: (A) Brometo de etídio intercalado entre dois pares de bases nitrogenadas e (B) Distorções estruturais induzidas pela intercalação. Esquerda: DNA não-intercalado. Direita: DNA intercalado em três regiões (áreas vermelhas).

Para que um intercalador encaixe entre os pares de bases, as bases tem de se separar, distorcendo as cadeias de DNA ou desenrolando a cadeia dupla (Figura 17B). O efeito de intercalação inibe tanto a transcrição como a replicação do DNA, causando toxicidade e mutações, devido a isto que a maioria dos intercaladores de DNA são muitas vezes carcinogênicos.¹¹³

A ligação do BE ao DNA tem sido estudada e explorada na confecção de vários genossensores usando diferentes substratos que vão desde eletrodos de grafite, carbono vítreo, nanotubos, etc.^{113,147-149}

1.5.4 - Voltametria

A voltametria é uma técnica eletroquímica onde as informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química são obtidas a partir do registro de curvas corrente-potencial, feitas durante a eletrólise dessa espécie em uma célula eletroquímica constituída de pelo menos dois eletrodos, sendo um deles o eletrodo de trabalho e o outro um eletrodo de referência. O potencial é aplicado entre os dois eletrodos em forma de varredura, isto é, variando-o a uma velocidade constante em função do tempo. O potencial e a corrente resultante são registrados simultaneamente. A curva corrente vs. potencial obtida é chamada de voltamograma.¹⁵⁰

1.5.4.1 - Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (VC) é uma das técnicas eletroquímicas mais empregadas na caracterização de um processo eletródico, nela registra-se a resposta da corrente de um eletrodo estacionário e pequeno em uma solução sem agitação quando este é excitado por uma onda triangular de potencial. O potencial varia linearmente em um sentido até um dado valor, então, o sentido da varredura é invertido e o potencial volta ao valor inicial aplicado, como mostra a Figura 18A.¹⁵⁰

Os potenciais nos quais ocorre a reversão são chamados potenciais de inversão. O intervalo de varredura escolhido para um dado experimento é aquele no qual ocorre o pico de oxidação ou de redução da espécie química analisada. O sentido da varredura inicial pode ser tanto negativa como positiva, dependendo da composição da amostra.¹⁵⁰

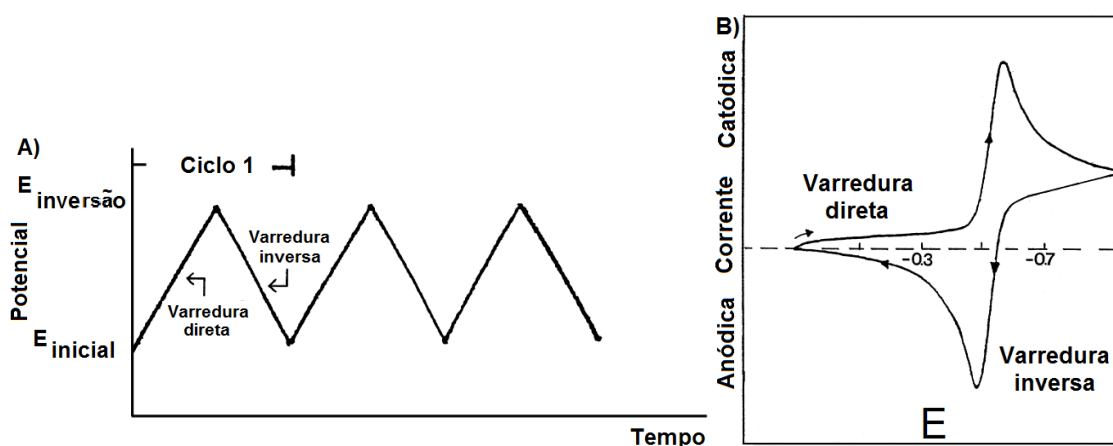


Figura 18: (A) Sinal de excitação para a voltametria cíclica e (B) Voltamograma cíclico para um processo redox reversível.¹⁵⁰

Dependendo da informação requerida, pode ser utilizado um ciclo único, por exemplo, para descobrir o potencial de oxidação de determinada espécie ou múltiplos ciclos, por exemplo, para promover o crescimento dos filmes poliméricos através de eletropolimerização conforme indicado no item 1.1.1. Durante a varredura de potencial, o potenciostato mede a corrente resultante do potencial aplicado. O voltamograma relaciona a corrente e o potencial, como mostra a Figura 18B. Na prática utilizam-se velocidades de varredura que variam desde 10 mVs^{-1} até 10 kVs^{-1} , sendo que a maioria dos trabalhos estão entre 20 e 200 mVs^{-1} .¹⁵⁰

1.5.4.2- Voltametria de pulso diferencial

Uma melhoria instrumental considerável na discriminação entre a corrente faradaica, originada pela oxidação e redução das espécies contidas na solução e a corrente capacitiva, originada na formação da dupla camada elétrica na interface eletrodo/solução, viria a ser conquistada com o desenvolvimento das técnicas de pulso, principalmente a de pulso diferencial. Neste caso a instrumentação foi desenvolvida de tal modo que as medidas de corrente e aplicações de potencial e pulsos de potencial sejam realizadas em intervalos de tempo muito pequenos. Esta modalidade de medição voltamétrica foi introduzida por Barker e Jenkin em 1952.¹⁵¹ O objetivo principal foi diminuir o limite de detecção das medidas voltamétricas pelo substancial aumento da discriminação entre a corrente faradaica e não faradaica, permitindo uma quantificação em níveis abaixo de $10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$. A Figura 19 mostra o esquema que explica porque a voltametria de pulso diferencial (VPD) possibilitou fazer medidas de correntes e aplicações de potencial e pulso de potencial em intervalos de tempo pequenos.¹⁵⁰

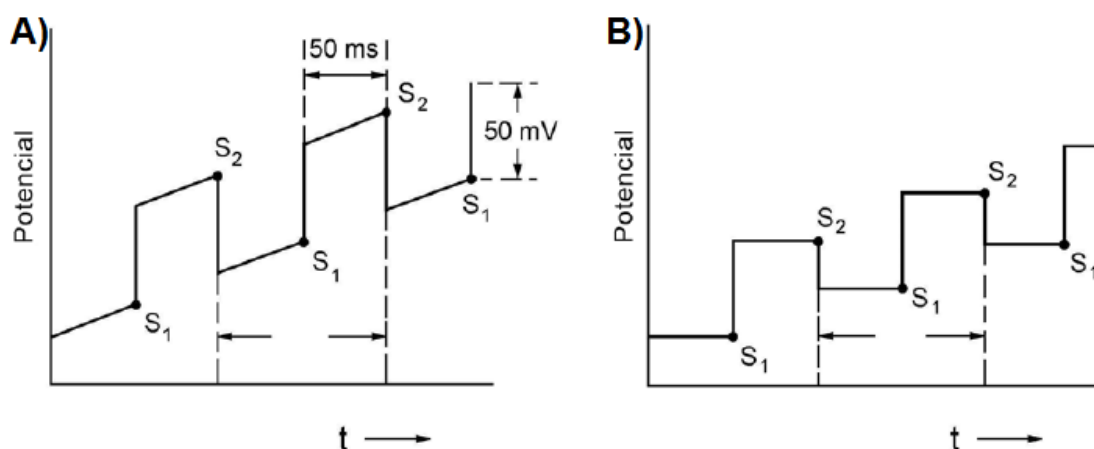


Figura 19: (A) Representação esquemática da aplicação do potencial em função do tempo (t) em VPD em: (A) em instrumentos analógicos, (B) em instrumentos digitais.¹⁵⁰

Na VPD a programação de potencial é feita aplicando-se um pulso de potencial superposto em uma rampa de potencial linearmente crescente e cada etapa de aplicação de pulso é definida pelo incremento de potencial utilizado. O pulso aplicado é de pequena amplitude, normalmente de 10 a 100 mV e é imposto durante 50 a 60 ms. A corrente é amostrada em dois intervalos de tempo de cerca de 15 ms cada um, sendo o primeiro intervalo imediatamente antes da aplicação do pulso (S1) e o segundo próximo

ao final do tempo de vida do pulso (S2). O valor final da corrente é a diferença entre esses dois valores medidos.¹⁵⁰

1.5.4.3- Voltametria de onda quadrada

A voltametria de pulso diferencial é a técnica mais usada presentemente para fins analíticos, devido às vantagens apresentadas em relação à detectabilidade e a resolução frente às técnicas de corrente contínua. Mas, ao lado dela, uma técnica muito conveniente do ponto de vista analítico que tem sido incorporada em diversos instrumentos comerciais é a voltametria de onda quadrada (VOQ). A programação de potencial usada na VOQ pode ser vista na Figura 20. Uma onda quadrada simétrica (Figura 20A(2)) é superposta sobre uma rampa de potencial em forma de degraus (Figura 20A(1)) de tal forma que o pulso direto da onda quadrada coincida com o início do degrau da rampa (Figura 20A(3)). O pulso reverso da onda quadrada por sua vez coincide com a metade da etapa da rampa em degraus. Os parâmetros tempo e potencial aplicado são mostrados na Figura 20B, onde τ é o tempo de um ciclo de onda quadrada e também de um ciclo da rampa em degraus. A frequência da onda quadrada em Hz é $1/\tau$. E_{sw} é a amplitude do pulso de onda quadrada em mV, onde $2E_{sw}$ é a amplitude do pico direto ao pico reverso.¹⁵⁰

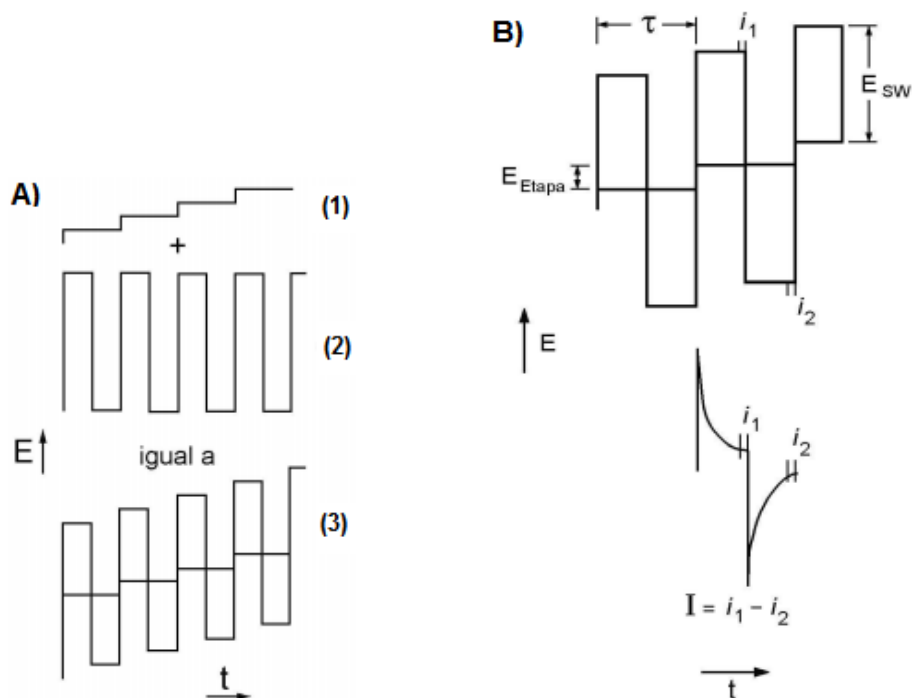


Figura 20: Sequência potencial vs. tempo (E vs. t) usada em VOQ.¹⁵⁰

A sua principal vantagem da VOQ em relação à VPD diz respeito à elevada velocidade de varredura de potencial. Ainda é importante ressaltar que através da VOQ pode-se estudar os mecanismos de oxidação, redução e processos adsorptivos ainda que os mesmos sejam totalmente irreversíveis.¹⁵⁰



1.5.5– Genossensor para meningite

A meningite é uma infecção do fluído cefalorraquidiano que envolve o encéfalo e a medula espinal, órgão superior e inferior, respectivamente, do sistema nervoso central (SNC) que é recoberto por um conjunto de membranas denominadas meninges, que por sua vez atuam como uma barreira física contra os agentes infecciosos (Figura 21A).

Os sintomas mais comuns da meningite são dor de cabeça, rigidez no pescoço, febre, confusão mental, alterações do nível de consciência, vômitos, anorexia, erupção cutânea, fotofobia, fonofobia, irritabilidade, sonolência, etc. Sendo que todas estas alterações podem ser precedidas por sintomas de gripe e dor de garganta.¹⁵²

A meningite geralmente é causada por agentes infecciosos, como vírus, bactérias e fungos e contaminando tanto adultos como crianças.^{153,154}

A meningite viral, conhecida clinicamente como meningite asséptica, pode ser causada por vários tipos de vírus que entram no SNC, através de mecanismos diversos.¹⁵⁵ Seus agentes mais comuns são os HSV (herpes simplex vírus) tipo 1 e 2, vírus Varicella-Zoster e enterovírus, principalmente os da família Picornaviridae. Estes últimos constituem um grupo complexo, com cerca de 70 sorotipos, incluindo os coxsackievírus A e B, echo vírus, poliovírus e enterovírus tipos 68-73.

As infecções por enterovírus respondem por cerca de 80% dos casos de meningite viral. Só nos EUA são 75.000 casos a cada ano, sendo os Echo vírus (31 sorotipos) a espécie mais prevalente. As infecções por enterovírus são mais comuns durante o verão e o outono, sendo que a propagação é predominantemente através da via oral-fecal, cuja contaminação ocorre principalmente em creches infantis. Há algumas evidências que crianças com menos de 1 ano de idade que tiveram meningite viral, apresentaram deficiências a longo prazo no desenvolvimento neurológico.^{156,157}

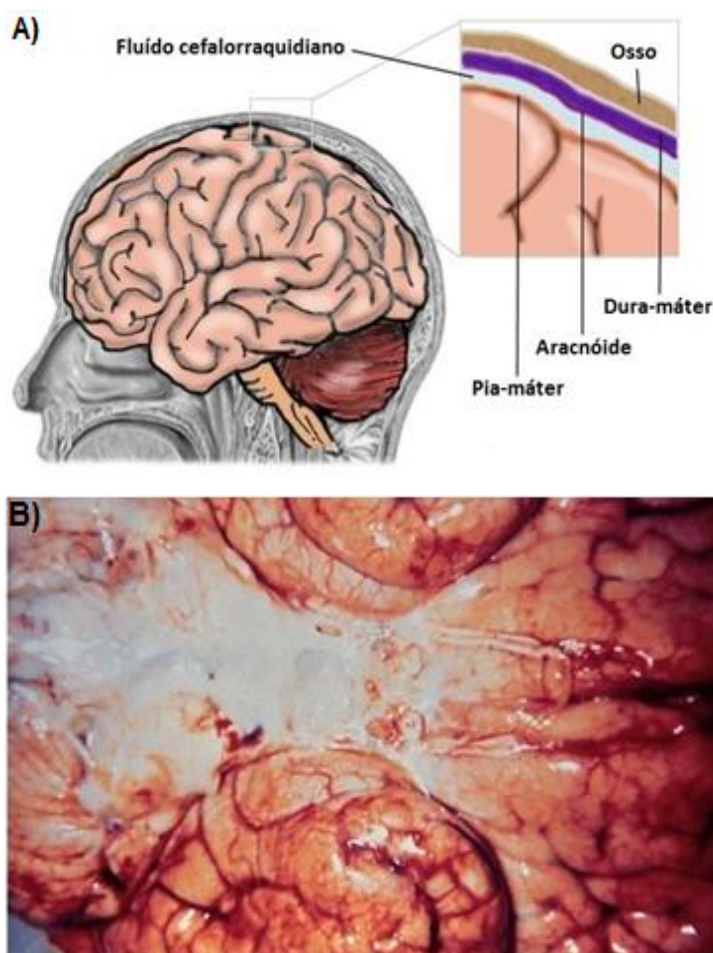


Figura 21: (A) Esquema ilustrativo das meninges e (B) Meninges infectadas com *Haemophilus influenzae*^e. Vista inferior de um cérebro (Imagem do Centro para Controle e Prevenção de Doenças, Atlanta, EUA).

A meningite fúngica é uma forma rara e não contagiosa, causada principalmente pelos fungos *Cryptococcus neoformans* e *Coccidioides immitis*, encontrados tipicamente em pacientes imunossuprimidos, como nos casos de portadores câncer ou de AIDS. O gênero *Cryptococcus* provoca a criptococose, uma infecção que tem mostrado um aumento drástico da epidemia de AIDS, com 80% dos casos ocorrendo em pacientes infectados pelo HIV.¹⁵⁸

Tanto a meningite viral quanto a fúngica são formas menos agressivas desta doença, com baixas taxas de mortalidade e resolução espontânea, sem necessidade de

^e*Haemophilus influenzae* é uma bactéria gram-negativa. Mais de 50 % dos casos do sorotipo b desta bactéria são responsáveis por meningite nos EUA e outros países industrializados, sendo que 3% a 6% dos casos são fatais e pelo menos 20% dos pacientes que sobrevivem, têm perda de audição permanente.

tratamentos específicos, na maioria dos casos. Antivirais e antifúngicos, aciclovir, ganciclovir, vanciclovir, pleconaril e anfotericina B, fluconazol, itraconazol, respectivamente, podem ser administrados eventualmente.

A meningite bacteriana é a infecção mais grave e agressiva desta doença, com altas taxas de mortalidade e morbidade, rápida evolução e tratamento baseado em antibióticos. A inflamação das membranas (Figura 21B) ocasiona o acúmulo de pus que não tem por onde escapar e a formação de abscessos são inevitáveis e geralmente afetam partes nobres do cérebro ou alguns nervos causando lesões neurológicas irreversíveis, como surdez, alterações de percepção e movimento, etc. Mesmo com os avanços das técnicas de tratamento, a taxa de mortalidade nos países em desenvolvimento chega a 30%. De fato é um caso de saúde pública, pois os riscos de sequelas e fatalidade são proporcionais ao tempo necessário para diagnosticar e instituir o tratamento, o que continua sendo um grande desafio para os médicos de emergência.¹⁵⁹

A meningite comumente é causada pelas bactérias *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes* e *Streptococcus* do grupo B.¹⁶⁰

Para reduzir a mortalidade e a morbidade da meningite bacteriana é necessário que o tratamento administrado, através de antibiótico, seja realizado com doses elevadas e infusão contínua de penicilina para *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae*. Todavia um tratamento presuntivo exige o uso de ceftriaxona ou dexametasona, sendo que este último medicamento não é muito indicado, sendo diretamente responsável pelo agravamento na lesão neuronal. Nos casos de meningite causados pela *Listeria monocytogenes* a administração simultânea de aminopenicilina e aminoglicosídeos é indicada. Para pacientes com alergias a penicilina ou outras contra-indicações, medicações baseadas em associações mais ou menos complexas a base de vancomicina, fosfomicina, fluoroquinolona e linezolida são aconselháveis.¹⁶¹⁻¹⁶³

Com a inclusão da vacina contra o *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* no calendário vacinal de vários países, a ocorrência de meningite por essas duas bactérias vem caindo drasticamente, principalmente entre as crianças. Atualmente, a *Neisseria meningitidis*, também conhecida como meningococo, é a principal causa de meningite bacteriana em crianças e adultos. Esta bactéria possui 13 sorogrupos diferentes, sendo que 8 destes sorogrupos são responsáveis por quase todas as epidemias

de meningite meningocócica: A, B, C, X, Y, Z, W 135 e L, sendo B e C os mais comuns. Atualmente, existe vacina individual apenas contra o meningococo C e uma vacina conjugada que atua contra os meningococos A, C, Y e W135. Ainda não há vacina contra o meningococo B, com disponibilidade mundialmente. Esta vacina, atualmente, só encontra-se disponível em larga escala em Cuba, país que a desenvolveu.



O diagnóstico diferencial pode prevenir o uso desnecessário de antibióticos e internação prolongada dos pacientes com formas benignas da doença. Além disso, o uso de antiinflamatórios, preconizados em algumas formas de meningite bacteriana, pode agravar as formas virais. Este diagnóstico é realizado baseando-se em parâmetros sorológicos e bioquímicos, citoquímicos e microbiológicos do líquido cefalorraquidiano (LCR). Os testes microbiológicos do LCR e sangue são usados para a confirmação de meningite, isolando e identificando os patógenos em torno de 24 a 48 horas, sendo ainda considerado pouco sensível e sujeito a interferência por terapia antimicrobiana prévia. Métodos para a detecção em tempo real desta doença são necessários já que, estudos mostraram uma relação direta entre o tempo de chegada do paciente ao hospital e a administração de antibióticos com a mortalidade. Segundo os estudos de Bryan e colaboradores¹⁵⁹ a duração média entre a chegada no departamento de emergência e a administração de antibióticos apropriados foi de 2,1 horas para a pediatria comparado a 4,9 horas para os casos de adultos que culminaram em mortalidades de 5% e 43%, respectivamente, para os 135 casos estudados em um hospital municipal de ensino.

Alguns grupos de pesquisa em todo o mundo estão preocupados em desenvolver novas metodologias de diagnósticos para esta doença que, segundo estimativas, mata em torno de 200 mil pessoas em média por ano.

A diferenciação entre meningite bacteriana e viral pode ser realizada através de um método de análise elementar dos resultados de exame do LCR, por pontuação denominado Meningitest, em que submete milhares de simulações, por método de Monte Carlo, demonstrando alta performance.¹⁶⁴

A meningite necessita de um diagnóstico rápido, sensível e específico que pode ser obtido através de biossensores. Reddy, S. B. e colaboradores¹⁶⁵ desenvolveram um imunossensor para detectar anticorpos, piezoelectricamente, contra a membrana celular do *Neisseria meningitidis* imobilizada em filme de fluoreto de polivinilideno.

Patel, M. K. e colaboradores^{166,167} produziram um genossensor capaz de detectar eletroquimicamente DNA complementar e DNA genômico de *Neisseria meningitidis*, usando mediador azul de metileno em eletrodos de ouro.

1.6 – Imunossensores



Conforme já definidos no item 1.3.2, biossensores baseados na reação imunológica de um antígeno (Ag) com o anticorpo (Ac) são denominados imunossensores, de fato são capazes de monitorar o complexo formado entre antígeno-anticorpo.¹⁶⁸⁻¹⁷⁰

1.6.1 – Estrutura e propriedades dos antígenos e anticorpos

Os antígenos são componentes capazes de iniciar uma resposta imune no organismo, induzindo a produção de células T reativas e imunoglobulinas específicas. Em geral, os antígenos são componentes biológicos (vírus, bactérias, protozoários, etc) que por sua vez são compostos por proteínas, polissacarídeos e lipídeos. Estas macromoléculas podem apresentar regiões mais expostas que são capazes de estimular a produção de imunoglobulinas.¹⁷¹

Através de ligações não-covalentes, como ligações de hidrogênio e ligações iônicas, assim como interações de Van der Waals e hidrofóbicas os anticorpos ou imunoglobulinas produzidos tem elevada complementaridade com os antígenos correspondentes e vice-versa (Figura 22A).

A Figura 21B mostra que os anticorpos são glicoproteínas constituídas de quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas cadeias leves (curtas) e duas cadeias pesadas (longas), unidas entre si por ligações dissulfeto. Funcionalmente o anticorpo ainda pode ser dividido em duas regiões, sendo que a parte Fab (região superior da Figura 22B), apresenta uma composição variável que é responsável pelo estabelecimento de ligações não-covalentes com os antígenos (epitopo). Esta porção da molécula está localizada na região aminoterminal do anticorpo. A parte Fc, que se apresenta mais conservada em sequência de aminoácidos, está localizada na região carboxi-terminal (região inferior da Figura 21B), sendo responsável pelas funções efectoras dos anticorpos, como por exemplo, a de ligação com receptores em células fagocíticas e fixação do complemento.¹⁷²

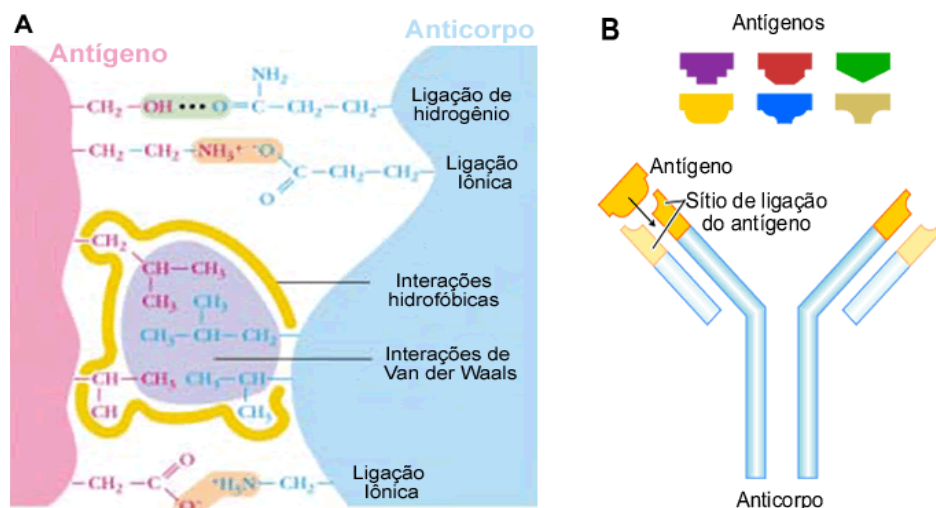
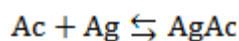


Figura 22: Esquema simplificado para as interações (A) covalentes entre antígeno e anticorpo e (B) sistema de seletividade do anticorpo.

O complexo formado entre antígeno-anticorpo é representado na Equação 1. Essa interação é caracterizada pela constante de afinidade, K_a , definida pelas concentrações do complexo ($AgAc$), do antígeno livre (Ag) e dos sítios livres dos anticorpos (Ac) no equilíbrio, de acordo com a Equação 2.

Equação 1:



Equação 2:

$$K_a = \frac{[AgAc]}{[Ac][Ag]}$$

Os valores das constantes de afinidade entre 10^4 e $10^{12} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ mostram a grande estabilidade energética do complexo formado entre antígeno-anticorpo resultando, numa alta sensibilidade em imunossensores. Duas grandes classes no desenvolvimento destes dispositivos se destacam, em primeiro, os chamados imunossensores amperométricos, nos quais enzimas são empregadas como marcadores, e em segundo, os imunossensores impedimétricos, no qual são realizadas medidas diretas das propriedades elétricas da superfície monitorada. Há uma extensa literatura no campo dos imunossensores impedimétricos.¹⁷³

1.6.2– Imunossensores impedimétricos

A transdução do sinal biológico nos imunossensores impedimétricos pode ser realizada através de medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).

A EIE é uma das técnicas mais poderosas e sensíveis para investigação das propriedades elétricas da superfície de eletrodos modificados.¹⁷⁴⁻¹⁷⁹

A aplicação de um potencial de oscilação em diferentes frequências sobre um potencial d.c., num sistema eletroquímico, fornece informações de corrente e de sua fase, através da EIE. Esta técnica não-destrutiva^f pode ser usada para estudar as propriedades elétricas da interface do dispositivo sensível e investigar as reações que ocorrem nele. As principais vantagens da EIE diz respeito a não necessidade do uso de reagentes especiais, sendo receptiva para operação *label free*, assim como sua natureza não-invasiva, comparado com os métodos voltamétricos. Todavia, a principal desvantagem está em determinar o significado físico da resposta no domínio das frequências escolhidas frente ao sistema investigado.¹⁷⁹⁻¹⁸⁶

Nos imunossensores, resultados de EIE podem confirmar se o anticorpo ou antígeno de reconhecimento foram imobilizados eficientemente na superfície do transdutor. Atualmente, muitos grupos de pesquisa já demonstraram as potencialidades do uso desta técnica para sensoriamento de imunorreações diretas.¹⁸³

1.6.2.1 – Aspectos teóricos da espectroscopia de impedância eletroquímica

Caracterização de coberturas, pilhas, células combustíveis, fenômenos de corrosão, eletrocatalise heterogênea dentre outras estão sendo investigadas pela EIE que de fato tem se tornado uma das principais técnicas aplicadas na área de caracterização de materiais. Ainda temos observado que a EIE tem sido exhaustivamente utilizada no estudo de mecanismos de eletrodeposição, eletrodissolução, passividade, corrosão, difusão de íons através de membranas, estudos de interface de semi-condutores e biossensores.

A EIE fornece informações importantes relacionadas com as características eletroquímicas de um sistema, como capacitância da dupla camada (C_{dl}), resistência de

^f Isto depende do potencial de circuito aberto E_{ocp} .

transferência de carga (R_{ct}), impedância de difusão (Z_w) e resistência da solução (R_s). Ainda consiste num método muito eficiente para avaliar a velocidade de transferência eletrônica no eletrodo quando submerso numa solução contendo espécies redox.

EIE é um método AC que descreve a resposta de uma interface eletroquímica a um sinal de voltagem senoidal de baixa amplitude em função da frequência. A onda senóide de corrente resultante difere no tempo, provocando um deslocamento de fase em relação a onda de perturbação, constituída pela aplicação da voltagem de maneira que a razão $V(t)/I(t)$ é definida então como a impedância (Z), contando para a oposição combinada de todos os componentes dentro da célula eletroquímica (resistores, capacitores, indutores) para o fluxo de elétrons e íons.^{183,187}

A EIE tem como base a aplicação de um potencial ou corrente alternada, sendo uma delas a variável controlada, medindo-se a intensidade e diferença de fase da outra variável. Nos estudos discutidos neste trabalho utilizou-se a impedância eletroquímica em potencial constante, onde a perturbação do sistema é feita mediante a aplicação de um potencial contínuo (potencial central aplicado) sobre a qual é imposta uma variação senoidal de potencial com pequena amplitude (Figura 23). Este método de aplicação de potencial possibilita que o sistema seja perturbado empregando poucos milivolts, de forma a tornar possível a investigação de fenômenos eletroquímicos próximos ao estado de equilíbrio, onde temos $E = E_{ocp}$. Além disto, é possível perturbar o sistema usando diferentes valores de frequência, pois a onda de potencial é senoidal. Na EIE surge uma corrente de natureza senoidal como resultado da aplicação de um potencial senoidal ao sistema. Mediante um monitoramento das relações entre o potencial aplicado e a corrente, são obtidas a impedância do sistema e o ângulo de fase, que expressa a defasagem da corrente em relação ao potencial aplicado.

As medidas são realizadas variando-se os valores de altas frequências para baixas frequências. Desta forma, diferentes processos físicos e químicos podem ser separados em função das suas discrepâncias de constantes de tempo., denominados tempos de relaxação.

A corrente e o potencial são amostrados e analisados para se obter a impedância imaginária e a real. Os resultados de impedância podem ser apresentados em diversas formas.

Neste trabalho são apresentamos os resultados nas formas de diagrama de Nyquist e Bode, respectivamente. O primeiro apresenta graficamente Z'' , que diz respeito ao componente imaginário da impedância, vs Z' que está relacionado ao

componente real da impedância, já o segundo temos φ que é o ângulo de fase e $\log |Z|$ vs $\log \omega$ (ω - frequência), sendo ambos diagramas as duas formas mais comuns, complementares e imprescindíveis para a interpretação de dados.¹⁷⁹

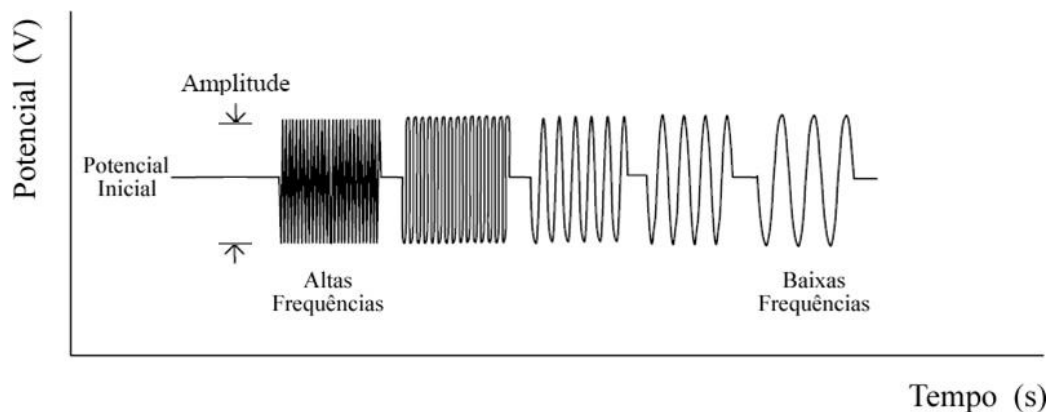


Figura 23: Diagrama do potencial aplicado em função do tempo para realização das medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica a potencial constante.

Um imunossensor de impedância pode ser classificado em faradaico ou impedimétrico faradaico. Neste sistema a resposta mensurada se deve à superfície do eletrodo, a qual está parcialmente ou completamente coberta por uma camada não-isolante, ou parcialmente coberto por uma camada isolante é capaz de catalisar uma sonda redox, a qual existe na solução de medida. O parâmetro de medida comumente utilizado é a resistência à transferência de carga e, para as interações Ac-Ag, é esperado aumento no seu valor, uma vez que a reação faradaica se torna impedida com o tempo. De modo geral, imunossensores impedimétricos faradaicos exibem uma alta sensibilidade a interações entre Ac-Ag, todavia as espécies redox podem ter um efeito na estabilidade e na atividade do eletrodo.¹⁷⁹

Um capacitor é formado entre o eletrodo condutor e o eletrólito. A impedância absoluta é relacionada à frequência pela Equação 3:

Equação 3:

$$|Z''| = \frac{1}{2\pi fC}$$

onde f é a frequência (em Hz) na qual Z'' é medida.

O espectro de impedância apresenta um semicírculo na região de altas frequências, correspondendo ao processo limitante de transferência eletrônica e uma reta linear na região de baixas frequências resultando da etapa limitante de difusão do processo eletroquímico. O diâmetro do semicírculo exibe exatamente a magnitude da resistência a transferência de carga (R_{ct}) da camada a qual mostra seu comportamento isolante para o par redox. Assim, o diâmetro pode ser usado para descrever as propriedades de interface do eletrodo e seu valor crescente caracteriza normalmente as imobilizações sucessivas em cada etapa.¹⁷⁹

A capacitância da dupla camada elétrica (C_{dl}) é outro parâmetro, disponível para análise de sinal em imunossensores impedimétricos, em que normalmente verifica-se um decréscimo neste parâmetro em função do aumento da distância entre as “placas de capacitor” provocado pela ligação do analito ao seu receptor específico. Em um imunossensor, portanto a C_{dl} é determinada pela capacitância do anticorpo imobilizado (C_{Ac}). Quando o antígeno se liga, uma camada hidrofóbica é formada no contato com o anticorpo, com a capacitância C_{Ag} e C_{dl} diminuindo, de acordo com a Equação 4.^{183,187}

Equação 4:

$$\frac{1}{C_{dl}} = \frac{1}{C_{Ac}} + \frac{1}{C_{Ag}}$$

Para ajustar o espectro medido com o espectro de impedância fora dos elementos ideais, os elementos ideais foram trocados por elementos de fase constantes (EFC), conforme Equação 5.

Equação 5:

$$Z_{CPE} = K\omega^{-\alpha}$$

O expoente de frequência é $\alpha = 1$ e $K=1/C$ para uma capacitância ideal; $\alpha = 0$ e $K=R$ para uma resistência ideal e se $\alpha = 1/2$ o resultado é a impedância de Warburg, a qual está associada ao processo de difusão semi-infinita, cujo ângulo de inclinação é 45° . O expoente α pode ser obtido quando a capacitância da membrana ou camada de capacitância for trocada pelo elemento de fase constante. Os desvios do expoente α dos valores ideais são atribuídos à falta de homogeneidades da camada analisada, como por

exemplo defeitos e rugosidade. Conforme já descrito, os resultados de impedância são normalmente ajustados a circuitos equivalentes de resistores e capacitores acoplados em série, paralelo ou misto. O circuito mais simples e comumente utilizado para um sistema redox com transporte difusional conhecido como circuito de Randles é mostrado na Figura 24A.

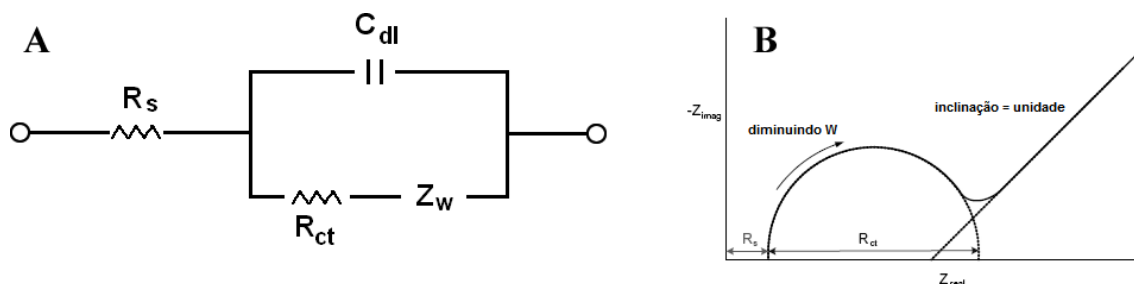


Figura 24: (A) Circuito equivalente de Randles para um sistema eletroquímico simples e (B) gráfico de Nyquist proveniente do circuito de Randles mostrado em A.

Este circuito é normalmente usado para interpretar sistemas eletroquímicos simples. Este circuito equivalente fornece o diagrama do plano complexo também denominado de diagrama de Nyquist mostrado na Figura 24B, no qual fornece percepção visual dentro da dinâmica do sistema.^{183,187}

A Figura 24 mostra nitidamente que R_{ct} é inversamente proporcional à taxa de transferência eletrônica (TTE). Se o analito promove modificações em um ou mais parâmetros do circuito equivalente e esses parâmetros não são afetados por espécies interferentes, então o método de impedância pode ser usado perfeitamente para a detecção do analito. R_s surge primeiramente da resistência do eletrólito e é analiticamente útil, principalmente nos sensores de condutividade. Z_w pode ser usada para medir efetivamente os coeficientes de difusão sendo raramente usada para aplicações analíticas. Os elementos do circuito equivalente disponíveis na Figura 24, que são normalmente usados para detecção de analito são R_{ct} e C_{dl} .^{183,187}

A discriminação de sinal eletroquímico baseada nas mudanças destas duas propriedades elétricas resultantes da interação antígeno/anticorpo sobre a superfície dos eletrodos tem levado ao desenvolvimento de vários imunossensores impedimétricos descritos na literatura para detecção de diversas doenças causadas por antígenos como o vírus influenza aviário, antígeno da raiva, salmonelas, *E. coli*, toxinas como a ocratoxina, etc.¹⁸⁸⁻¹⁹⁰

1.6.3 - Imunossensor para anaplasmoses bovina

Anaplasma marginale é uma bactéria gram-negativa que pertence à ordem Rickettsiales, à família Anaplasmataceae e ao gênero *Anaplasma*.¹⁹¹

Anaplasmoses, diz respeito a uma doença intra-eritrocitária característica dos ruminantes causada por bactérias deste gênero. Sua maior incidência é nos bovinos, mas outros ruminantes como búfalos, antílopes africanos e algumas espécies de veados.

A anaplasmoses bovina é uma doença infecciosa que pode ser transmitida principalmente através das picadas de carrapatos das espécies *Boophilus spp.*, *Dermacentor spp.*, *Ixodes ricinus* e *Rhipicephalus spp* (Figura 25).

Uma vez que o gado de qualquer idade é infectado com *Anaplasma marginale*, ele permanece persistentemente infectado, na condição de portador da doença por toda a vida. A transmissão também pode ocorrer biologicamente e mecanicamente, por insetos hematófagos como moscas e procedimentos cirúrgicos, respectivamente, tais como descorna e castração. Anaplasmoses bovina ocorre em regiões tropicais e subtropicais, incluindo América do Sul e Central, Estados Unidos, sul da Europa, África, Ásia e Austrália e nas regiões onde a incidência de carrapatos é alta. Esta doença pode-se tornar uma endemia, como no México, América do Sul e Central e no Caribe.^{192,193}

Os sinais clínicos de anaplasmoses, uma das responsáveis pela Tristeza Parasitária Bovina, incluem anemia, icterícia, febre, perda de peso, aborto, letargia e morte.^{194,195}

O Brasil é dono do maior rebanho comercial de gado bovino do mundo, com mais de 213 milhões de cabeça, ou seja, mais de um boi por habitante, sendo que os animais infectados por esta bactéria exercem influência direta sobre a economia do nosso país, isto por que ocorrem perdas significativas na pecuária por mortalidade, diminuição na produção de carne e leite, assim como altos custos com medidas profiláticas e de tratamento dos animais. No Estado de Minas Gerais, precisamente na região do Triângulo Mineiro, a anaplasmoses tem sido considerada uma das doenças de maior importância, constituindo-se em fator limitante à criação de bezerros.^{196,197}

Medidas de controle da anaplasmoses bovina variam de acordo com a localização geográfica e incluem principalmente o controle dos vetores e a administração de antibióticos como as oxitetraciclinas e as diamidinas. Vários grupos de pesquisa estão obtendo êxito no desenvolvimento de vacinas cada vez mais eficazes contra a anaplasmoses bovina.¹⁹⁸⁻²⁰⁰



Figura 25: Transmissão de Anaplasmosse bovina pelo vetor carrapato.

O diagnóstico da anaplasmosse bovina nos animais infectados pode ser feito clinicamente, todavia os sinais não são específicos, sendo necessários necropsia e testes laboratoriais mais específicos de *Anaplasma marginale*, através de esfregaços de sangue corados pelo Método Giemsa durante a fase aguda da doença. Estes testes, entretanto, não são confiáveis para a detecção de infecção em animais pré-sintomáticos ou com baixos níveis de parasitemia. Nestes casos, os animais infectados são geralmente, diagnosticados por testes sorológicos, através da identificação de anticorpos anti - *Anaplasma marginale*. Usa-se comumente o teste ELISA que emprega proteínas MSP1, MSP2 e MSP5 da rickettsia, como antígenos, e que pode ser confirmando, posteriormente por métodos de detecção molecular, através da identificação de DNA da Rickettsia por PCR.²⁰¹⁻²⁰³

Muitas alternativas vêm sendo estudadas para efetuar o diagnóstico precoce de *Anaplasma marginale*, como por exemplo, sondas do tipo *primers* construídas através de genes que codificam os antígenos de superfície dessa bactéria capazes de detectar o DNA da rickettsia ou ainda sondas do tipo RNA que, conseguem quantificar baixos níveis de parasitemia, através da detecção de DNA genômico.^{204,205}

Outras técnicas podem ser usadas, como teste de coaglutinação rápida (TCR), imunofluorescência indireta (IFI). Entretanto, os biossensores são dispositivos ideais para solucionar esta problemática, devido as suas características, como, baixo custo, rapidez de teste, possibilidade de miniaturização e portabilidade. Silva, M. e colaboradores,²⁰⁶ desenvolveram um imunossensor óptico através da imobilização covalente de proteína recombinante MSP5 em vidro de poro controlado, capaz de detectar anticorpos anti-MSP5 em amostras de soro sanguíneo de animais infectados.^{207,208}

2.1 – Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho contemplará o desenvolvimento e a caracterização dos polímeros derivados dos três isômeros do ácido hidroxifenilacético eletropolimerizados na superfícies de grafite.

Esses resultados fornecerão subsídios para aprofundar o entendimento estrutural destes polímeros e apoiados por estudos de química teórica, permitirão ter uma maior compreensão dos seus respectivos mecanismos de polimerização.

As plataformas de poli(ácido 2-hidroxifenilacético) (POLI(2-HFA)), poli(ácido 3-hidroxifenilacético) (POLI(3-HFA)) e poli(ácido 4-hidroxifenilacético) (POLI(4-HFA)), serão avaliadas com relação a capacidade de imobilizar bases nitrogenadas purinas e pirimidinas.

O polímero que apresentar maior eficiência de retenção destas bases nitrogenadas, associadas a outras propriedades elucidadas, será selecionado para construção de dois sistemas poliméricos a serem aplicados na detecção de DNA genômico da bactéria *Neisseria meningitidis* e anticorpos contra a bactéria *Anaplasma marginale* por voltametria de pulso diferencial e espectroscopia de impedância eletroquímica, verificando sensibilidade e seletividade.

2.2 – Objetivos específicos

- ✓ Eletropolimerização dos ácidos 2-HFA, 3-HFA e 4-HFA sobre eletrodos de grafite;
- ✓ Caracterização dos eletrodos de grafite modificados com polímeros, por voltametria cíclica, troca iônica, espectroscopia de impedância eletroquímica;
- ✓ Caracterização da morfologia dos eletrodos de grafites modificados por microscopia de força atômica;
- ✓ Avaliação da estabilidade eletroquímica dos polímeros;
- ✓ Aplicação dos diagnósticos de reversibilidade por voltametria cíclica aos eletrodos de grafite modificados com filmes poliméricos;
- ✓ Investigação da eletropolimerização dos ácidos hidroxifenilacéticos a partir de estudos teóricos baseados na teoria do funcional de densidade eletrônica (DFT).

- ✓ Construção de modelos oligoméricos dos possíveis polímeros produzidos a partir dos ácidos hidroxifenilacéticos;
- ✓ Realização da análise conformacional dos modelos idealizados, utilizando-se um Campo de Força devidamente parametrizado e exportando as estruturas de mínima energia para a elucidação da estrutura eletrônica.
- ✓ Elucidação da estrutura molecular e eletrônica dos polímeros a partir da correlação entre dados experimentais de caracterização estrutural e resultados de cálculos quânticos, semi-empíricos e DFT.
- ✓ Investigação da imobilização de bases nitrogenadas nos eletrodos de grafite modificados com ácidos poli-hidroxifenilacéticos;
- ✓ Seleção da matriz polimérica derivada de eletrodos de grafite modificados com poli(ácidos hidroxifenilacéticos) visando aplicação no diagnóstico de meningite bacteriana e anaplasmosse bovina por meio de detecção eletroquímica através de técnicas como a voltametria de pulso diferencial e a espectroscopia de impedância eletroquímica.



3.1 – Materiais e soluções

Todas as soluções foram preparadas imediatamente antes de cada procedimento experimental, e deaeradas com N_2 por aproximadamente 40 minutos.

Todos os reagentes químicos utilizados neste trabalho foram P.A (pró-análise), utilizados conforme recebidos. Para preparo das soluções aquosas, foi utilizada água ultra purificada em sistema Millipore Milli-Q, com resistividade acima de $18\text{ M}\Omega\text{ cm}$ e autoclavada quando utilizada para preparo de soluções tampão.

Todos os experimentos foram realizados a temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), exceções serão mencionadas na descrição do próprio procedimento.

O procedimento de cada preparo de solução utilizada neste trabalho é descrito abaixo:

- ❖ **Solução de Ácido Perclórico ($0,50\text{ mol.L}^{-1}$):** Em um balão volumétrico de 1,0 L adicionaram-se 43,20 mL de HClO_4 concentrado (Merck, 98%) e completou-se o volume total com água deionizada.
- ❖ **Solução de ferro/ferricianeto de potássio ($5,00\text{ mmol.L}^{-1}$; contendo $0,10\text{ mol.L}^{-1}$ de KCl):** Em um balão volumétrico de 100 mL adicionou-se 0,1646 g de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Reagen, 99%) ; 0,2112 g de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Vetec, 99%) e 0,7456 g de KCl (Vetec, 99%) e completou-se o volume total com água deionizada.
- ❖ **Solução de ferro/ferricianeto de potássio ($0,33\text{ mmol.L}^{-1}$; contendo $1,00\text{ mol.L}^{-1}$ de KCl):** Em um balão volumétrico de 100 mL adicionou-se 0,01087 g de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Reagen, 99%) ; 0,01394 g de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Vetec, 99%) e 0,7456 g de KCl (Vetec, 99%) e completou-se o volume total com água deionizada.
- ❖ **Solução de cloreto de hexaaminrutênio (II) ($5,00\text{ mmol.L}^{-1}$; contendo $0,10\text{ mol.L}^{-1}$ de KCl):** Em um balão volumétrico de 25,0 mL adicionou-se 0,0343 g de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$ (Aldrich, 99,9%) e 0,1864 g de KCl (Vetec, 99%) e completou-se o volume total com água deionizada.

- ❖ **Solução de 2-HFA, 3-HFA e 4-HFA ($2,50 \text{ mmol.L}^{-1}$):** Em um balão volumétrico de 100 mL adicionou-se 0,038 g de monômeros (Acros Organics, 99%) e completou-se o volume total com solução aquosa de HClO_4 $0,50 \text{ mol.L}^{-1}$.
- ❖ **Solução de hidróxido de sódio ($0,10 \text{ mol.L}^{-1}$):** Em um balão volumétrico de 100 mL adicionou-se 0,4000 g de NaOH (Vetec, 99%) e completou-se o volume total com água deionizada.
- ❖ **Solução Tampão Acetato ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$; pH 4,0):** Em um balão volumétrico de 500 mL adicionou-se 1,49800 g de CH_3COONa (Dinâmica, 99%) e 1,82 mL de ácido acético glacial (CH_3COOH) (Henrifarma, 99%) e completou-se o volume total com água deionizada ajustando o pH para o valor de 4 com solução de NaOH $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$.
- ❖ **Solução Tampão Fosfato Salino (PBS) ($0,10 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7,40):** Em um balão volumétrico de 500 mL adicionou-se 0,72 g de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) (Synth, 99%), 0,12 g de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), 4 g de NaCl e 0,10 g de KCl e completou-se o volume total com água deionizada ajustando o pH para o valor de 7,40 com solução de NaOH $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$.
- ❖ **Solução Tampão Citrato de sódio salino SSC (30 mmol.L^{-1} de citrato de sódio; pH 7, contendo 300 mmol.L^{-1} de NaCl):** Em um balão volumétrico de 50 mL adicionou-se 0,4415 g de citrato de sódio (Synth, 99%) e 0,08767 g de NaCl (Biotec, 99%) e completou-se o volume total com água deionizada ajustando o pH para o valor de 7 com solução de NaOH $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$.
- ❖ **Solução Tampão Fosfato ($0,10 \text{ mol.L}^{-1}$; pH 7 e pH 7,3):** Em um balão volumétrico de 500 mL adicionou-se 4,3500 g de Na_2HPO_4 (Vetec, 99%) e 2,3200 g de NaH_2PO_4 (Vetec, 99%) e completou-se o volume total com água deionizada ajustando o pH da solução para o valor de 7 ou 7,3 com solução de NaOH $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$.

- ❖ **Solução de bases nitrogenadas (Guanina e Adenina 2 mmol.L^{-1} ; Citosina e Timina 2 mmol.L^{-1}):** Todas as bases nitrogenadas (Ultra pure, 99%), tiveram suas massas e volumes adequados para as concentrações desejadas. Uma solução adicional contendo a mistura das bases nitrogenadas foi preparada, mantendo as concentrações desejadas.
- ❖ **Solução NM1 ($0,063 \text{ mol.L}^{-1}$):** Os oligonucleotídeos sintéticos de NM1 foram sintetizados pela Alpha DNA e fornecidos em pó (produto liofilizado). De acordo com número de mols rotulado no frasco, o volume foi ajustado com tampão SSC até a concentração desejada. Esta solução foi denominada como sonda NM1.
- ❖ **Solução de DNA- genômico:** a amostra contendo DNA genômico de *Neisseria Meningitidis* foi quantificada assim que recebida da Fiocruz-Minas, sendo 1,65 a razão entre as absorbâncias em 260 e 280 nm (amostra impura, possivelmente contendo polissacarídeos ou RNA ou proteínas). A absorbância em 260 nm foi usada para quantificar o DNA genômico e a partir de uma solução estoque de $480 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ obteve-se amostras diluídas de concentrações 11,1, 22,2 e 33,3 $\text{ng.}\mu\text{L}^{-1}$.
- ❖ **Solução de BE ($5,00 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, contendo 20 mmol.L^{-1} de NaCl):** Em um balão volumétrico de 10 mL adicionou-se 0,0020 g de $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$ (Vetec, 97%); 0,0117 g de NaCl (Vetec, 99%) e completou-se o volume total com água deionizada.
- ❖ **Solução de peptídeo AM1:** as amostras de peptídeos foram preparadas a partir de diluições da solução estoque fornecidas pelo INGEB-UFU. Desta forma, da solução estoque efetuou-se a diluição em tampão PBS pH 7,4 para que em 18 μL contivesse 1 μg de peptídeo.
- ❖ **Soluções de IgG^+ e IgG^- :** as amostras de soros sanguíneos de animais contaminados com *Anaplasma marginale* contendo os anticorpos anti MSP1a(IgG+) e soros de animais saudáveis foram diluídas na proporção 1:50 v/v.



3.2 – Procedimento Experimental

3.2.1 – Preparação e construção dos eletrodos de trabalho

Os eletrodos de grafite (EG) foram preparados conforme fluxograma apresentado na Figura 26, a partir de barras de grafite obtidas da Alfa Aesar (99,9999%). Na etapa I as barras foram cortadas em tamanhos menores, gerando discos de grafite com espessura entre 1 a 2 mm.

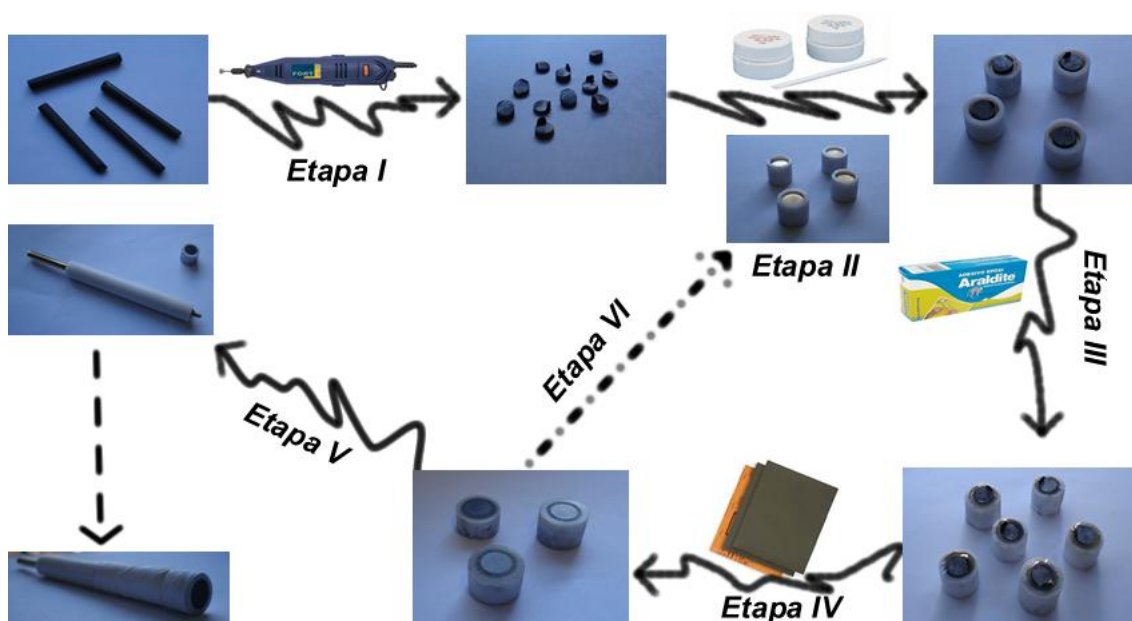


Figura 26: Fluxograma de preparação dos eletrodos de grafite.

A etapa II mostra o grafite sendo unido a uma base latão revestida de Teflon® por cola condutora. Na etapa III, os espaços vazios entre a base e o teflon foram preenchidos com cola Araldite®. Após 24 h, estes eletrodos foram lixados lixa d'água 200, 1200 (Marca 3M) sucessivamente para remoção do excesso de Araldite® e consecutivo polimento da superfície do eletrodo. A etapa IV mostra o polimento final realizado com suspensão aquosa de alumina 0.30 μm (Micropolish A, Buehler) sobre feltro. Após o EG foi limpo em água com ultrassom por 10 min., e enxaguado com água destilada em abundância e seco com N_2 ultra puro. A etapa V mostra os EG sendo conectados ao suporte de base para utilização e a etapa VI mostra a realimentação após a utilização.

3.2.2 – Seleção dos eletrodos de grafite

Antes do procedimento de eletropolimerização, os eletrodos foram condicionados e selecionados através de dois ensaios eletroquímicos. No primeiro procedimento os EG foram ciclados sucessivamente com 4 ciclos de potencial na faixa de +0,00 a +1,20 V em solução de HClO_4 (aq), divididos em 2 etapas de dois ciclos, sendo esta última registrada para posterior análise. No segundo procedimento os eletrodos foram lavados com água deionizada, secos sob fluxo de N_2 e analisados agora em solução de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, cobrindo a faixa de potencial de -0,20 a +0,70 V. Os VC foram registrados para posterior análise e seleção.

Eletrodos de Ag/AgCl, KCl (3,00 mol.L⁻¹) (Figura 27B) e placa de platina (área 2,0 cm²) (Figura 27C) foram utilizados como eletrodos de referência e auxiliar, respectivamente para todas as análises realizadas neste trabalho. Os potenciostatos utilizados foram CH Instruments modelo 760C, e EcoChemie modelo 302N com módulo FRA2.

3.2.3 – Eletropolimerização dos ácidos hidroxifenilacéticos

Para eletropolimerização dos monômeros foi utilizada célula eletroquímica de três compartimentos, com volume total de trabalho em cerca 25 mL (Figura 27). O eletrodo de trabalho utilizado foi um disco de grafite (Figura 27A), com área geométrica de 29,7 mm².

O crescimento dos filmes poliméricos foi realizado através de VC. Foram realizados 100 ciclos de potencial com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹, na faixa de potencial de -0,7 a +1,20 V em soluções de HClO_4 (aq), contendo 2-HFA, 3-HFA e 4-HFA 2,5 mmol.L⁻¹. Após eletropolimerização, os eletrodos contendo os filmes poliméricos foram lavados com água deionizada, em abundância, e secos sob fluxo de N_2 . Posteriormente, estes eletrodos foram mergulhados em solução contendo somente HClO_4 (aq), na ausência do monômero, e 10 ciclos de potencial foram aplicados na mesma faixa de eletropolimerização para remoção do “*monômero residual*”. Após esses ciclos, os eletrodos de grafite modificados foram lavados com água deionizada em abundância, e secos sob fluxo de N_2 .

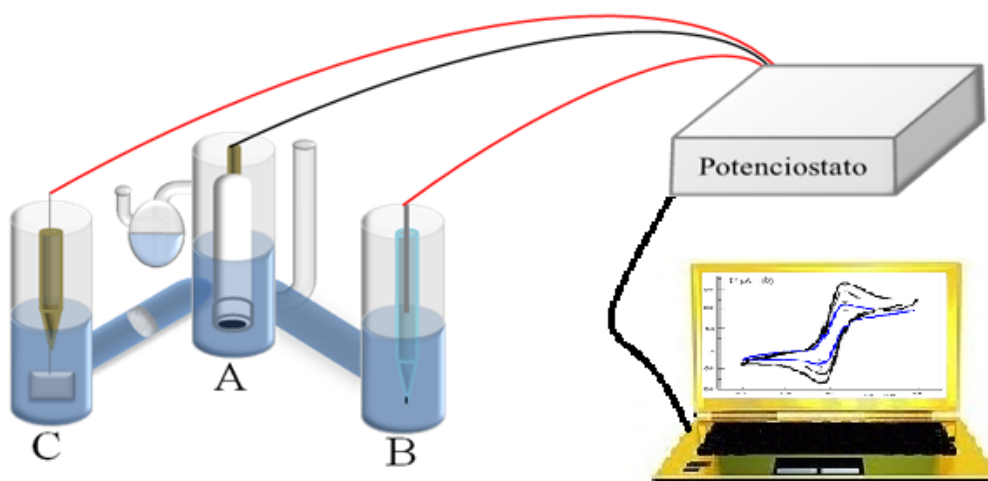


Figura 27: Ilustração do sistema eletroquímico utilizado para eletropolimerização dos ácidos hidroxifenilacéticos em HClO_4 e também para detecção de *Anaplasma marginale* em $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ por voltametria de pulso diferencial.

Análises do comportamento eletroquímico dos eletrodos de grafite modificados com os filmes poliméricos foram conduzidas em solução de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, na faixa de potencial de $-0,20$ a $+0,70$ V e em solução de HClO_4 .

3.2.4 – Transporte iônico nos estudos de reversibilidade

Os eletrodos de grafite modificados com ácido poli(2-hidroxifenilacético) (EG/POLI(2-HFA)), poli(3-hidroxifenilacético) (EG/POLI(3-HFA)) e poli(4-hidroxifenilacético) (EG/POLI(4-HFA)) foram caracterizados por voltametria cíclica em função da velocidade de varredura cobrindo o intervalo de 10 a 110 mV s^{-1} . Neste procedimento os VC foram obtidos em solução aquosa HClO_4 (aq), na ausência de monômero. Os processos eletroquímicos dos polímeros foram caracterizados por 6 diagnósticos, sendo eles: 1) Velocidade de varredura (ν) em função da variação de potencial de pico anódico e catódico (ΔE_p); 2) ν em função da variação de potencial de pico e meia onda ($E_p - E_p/2$); 3) ν em função da relação entre corrente de pico anódica e catódica (I_{pa}/I_{pc}); 4) I_p em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($\nu^{1/2}$); 5) E_p em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($\nu^{1/2}$) e 6) I_p em função da raiz quadrada do tempo ($t^{1/2}$).

3.2.5 – Determinação da massa dos polímeros



Três eletrodos de grafite após os procedimentos descritos nos itens 3.2.1 e 3.2.2 foram lavados em água deionizada e secos em dessecador sob vácuo, até obter uma massa constante (m_1).

Após os três eletrodos de grafite foram submetidos ao procedimento de eletropolimerização, onde através de voltametria cíclica foram realizados 100 ciclos de potencial com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , na faixa de potencial de $-0,7$ a $+1,20 \text{ V}$, em soluções de HClO_4 (aq), contendo 2-HFA, 3-HFA e 4-HFA $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$. Posteriormente, estes eletrodos foram mergulhados em solução contendo somente HClO_4 (aq), na ausência do monômero, e 10 ciclos de potencial foram aplicados na mesma faixa de eletropolimerização para remoção do “*monômero residual*”.

Após esse procedimento, os eletrodos de grafite foram novamente lavados em água deionizada em abundância e secos em um dessecador, sob vácuo, até massa constante (m_2).

A massa dos polímeros foi determinada pela diferença entre as massas (massa polímero = $m_1 - m_2$).

Todas as massas foram medidas em balança analítica Shimadzu série AUW220D, precisão $0,00001 \text{ g}$, $d=0,1 \text{ mg}$ / $0,01 \text{ mg}$.

3.2.6 – Propriedades de troca iônica

As propriedades de troca de iônica para o eletrodo de grafite e os eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA), POLI(3-HFA) e POLI(4-HFA) foram investigadas pelo estudo da reação de transferência eletrônica nas superfícies modificadas utilizando dois diferentes pares redox: ferrocianeto/ferricianeto de potássio (sonda redox negativa) e cloreto de hexaaminrutênio (III) (sonda redox positiva).

3.2.7 – Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada

Os espectros de impedância eletroquímica dos eletrodos de grafite e dos eletrodos de grafite modificados com poli-hidroxifenilacéticos, assim como nas detecções da *Neisseria meningitidis* e *Anaplasma marginale* foram obtidos em solução

aquosa de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5 mmol.L^{-1} ou $0,33 \text{ mmol.L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, em potenciostato Autolab (PGSTAT302N e módulo FRA, Eco Chemie, Utrecht). A solução de análise foi deaerada com N_2 ultra puro por cerca de 40 minutos, os eletrodos modificados contendo ou não biomoléculas imobilizadas, permaneceram em contato com a solução por cerca de 30 minutos. O intervalo de frequência investigado foi de 10^6 a 10^{-2} Hz . A amplitude de excitação senoidal foi de 10 mV, sendo potencial aplicado de +0,24 V. O ajuste dos resultados experimentais, a um circuito equivalente apropriado foi realizado com software provido pelo equipamento. Os voltamogramas de voltametria de pulso diferencial e de voltametria de onda quadrada foram obtidos num potenciostato Autolab Electrochemical System (PGSTAT302N e módulo GPES, Eco Chemie, Utrecht), utilizando célula eletroquímica de um ou três compartimentos. Os parâmetros e o eletrólito suporte usados nestas técnicas, estão explicitados nas legendas respectivas de cada espectro ou voltamograma discutido no item 4.

3.2.8 – Medidas de estabilidade eletroquímica

As análises de estabilidade eletroquímica do eletrodo de grafite e dos eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA), POLI(3-HFA) e POLI(4-HFA) foram realizadas em solução aquosa de ácido perclórico por meio de sucessivos ciclos de potencial na região de atividade eletroquímica dos filmes obtidos, ou seja, +0,20 a +0,80 V. Foram realizados 100 ciclos numa velocidade de varredura de 30 mV s^{-1} .

3.2.9 – Microscopia de força atômica

A Morfologia para o eletrodo de grafite e os eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA), POLI(3-HFA) e POLI(4-HFA), assim como o SPNM foram investigados utilizando-se microscopia de força atômica (AFM), em instrumento da Park Systems, modelo XE-70, versão 1.8.3. Os parâmetros topográficos foram estimados pelo software “XE-70”. A topografia do SPAM, utilizado para detecção da anaplasmosse bovina, foi investigado num microscópio Shimadzu, model SPM-9600.

3.2.10– Estudos teóricos da eletropolimerização dos ácidos hidroxifenilacéticos



Inicialmente os ácidos 2-HFA, 3-HFA e 4-HFA foram submetidos a uma análise conformacional sistemática, utilizando-se o método semi-empírico RM1(AMPAC, versão 9.2) para a obtenção da superfície de energia potencial relacionada com os seus dois principais ângulos diedros livres. As estruturas obtidas de mínimo global foram otimizadas e suas frequências de vibração foram calculadas empregando a teoria funcional de densidade eletrônica (DFT), utilizando o funcional híbrido B3LYP, conjunto de bases 6-31G(d), 6-31G(d, p), 6-311G(2 d,p), 6-31+G(2d,p), 6-311+G(2d,p) e 6-311++G(2d,p).²⁰⁹ Todos os cálculos DFT foram realizados utilizando o Gaussian 09.²¹⁰

As possíveis estruturas dos decâmeros para os isômeros em estudos foram modeladas e submetidas a cálculos dos principais ângulos diedros com os campos de força OPLS AA-2005 e AMBER. Com isso, a qualidade dos parâmetros para simular a estrutura dos filmes formados a partir do 2-HFA, 3-HFA e 4-HFA nestes campos de força podem ser avaliados, observando-se as barreiras de energia de torção em comparação com cálculos equivalentes obtidos a partir do DFT. A partir dessas análises, o campo de força OPLS foi selecionado para a análise conformacional dos oligômeros estudados. Isso, só foi possível com outros parâmetros de torção disponíveis no programa Macromodel.²¹¹

Os confôrmeros foram analisados e agrupados de acordo com a energia e estrutura. Depois de cada busca, os confôrmeros redundantes foram eliminados, facilitando os resultados da amostragem.

Os métodos semi-empíricos e DFT também foram utilizados para o cálculo dos pKas dos cátions radicais dos isômeros dos ácido hidróxifenilacéticos que estão disponíveis nos pacotes computacionais AMPAC versão 8.16.5, MOPAC 2011 e Gaussian 03 W versão D.01. Foram utilizados os métodos semi-empíricos AM1, PM3 e PM6 na otimização da estrutura molecular.

Posteriormente, para assegurar que a conformação obtida era realmente a de menor energia, a estrutura foi reotimizada empregando para o cálculo de frequência a teoria do funcional de densidade, funcional híbrido B3LYP com a função de base 6-31G(d,p), em fase gasosa e solvatado em meio ácido (pH 0,5), usando o pacote computacional Gaussian.

Após esses procedimentos, iniciou-se o cálculo da energia mínima e de

frequências e propriedades termodinâmicas das moléculas neutras e na forma oxidada (cátion-radical).



A partir do cálculo das frequências e propriedades termodinâmicas pode se chegar aos valores da Energia Livre de Gibbs e, por fim, estimar os valores de pKa.

A equação 6 mostra as relações estabelecidas por Lewis²¹² considerando as condições padrões e que os sistemas solvatados estão no estado de equilíbrio termodinâmico descritas na equação 7.

Equação 6:

$$pK_a = \frac{\Delta G_{(sol)}}{R.T.\ln 10} - \log [H_2O]$$

Equação 7:

$$\Delta G_{(sol.)} = \Delta G_{(g)} + \Delta G_{(solv.)}$$

onde pK_a é a constante de dissociação ácida em escala logarítmica, R é a constante dos gases ideais, T é a temperatura e ΔG é energia livre de Gibbs para a solução e o solvente.

3.2.11 – Estudos de imobilização de bases nitrogenadas

Sobre os eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA), POLI(3-HFA) e POLI(4-HFA), foram gotejadas 18 μL de solução aquosa de bases nitrogenadas purinas (2 mmol.L^{-1}) e pirimidinas (20 mmol.L^{-1}), deixando os eletrodos modificados secar a temperatura ambiente (25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, num dessecador durante 2 h.

Após a lavagem dos eletrodos modificados a imobilização das bases nitrogenadas foi observada através dos sinais de VPD realizadas em célula de compartimento único em tampão acetato (0,1 mol.L^{-1} , pH 4) ou fosfato (0,1 mol.L^{-1} , pH 7) como solução eletrolítica conforme ilustrado na Figura 28.

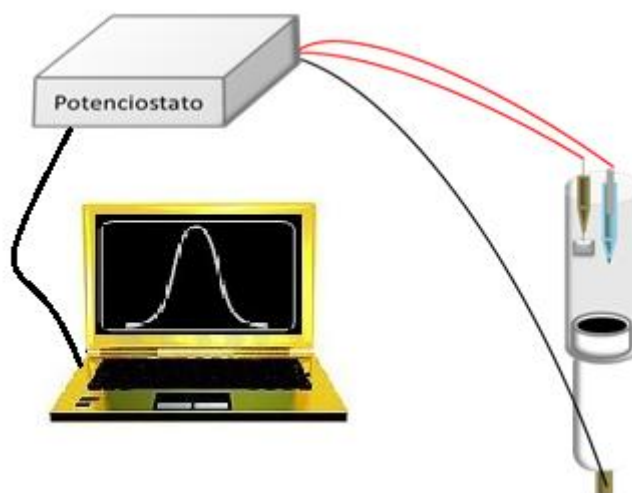


Figura 28: Ilustração do sistema eletroquímico utilizado na detecção das bases nitrogenadas e do brometo de etídio sinalizando a hibridização de DNA no sistema polimérico para detecção de meningite bacteriana.

3.2.12 – Procedimento de construção dos sistemas poliméricos para diagnóstico de *Neisseria meningitidis*

Os eletrodos de grafite modificados com POLI(3-HFA) (EG/ foram colocados em contato com a solução tampão fosfato (pH 7,3) por cerca de 30 min, visando garantir uma maior estabilização da linha base que quando atingida foi registrada entre 0,5 e 1,4 V usando VPD. Após este procedimento, eles foram retirados da solução tampão e secos imediatamente com fluxo de N₂ ultra puro.

A Figura 29A mostra a imobilização da sonda, composta de oligonucleotídeos sintéticos, sendo realizada por adsorção física através da adição de 18 µL da solução de NM1[§], em que este volume é suficiente para cobrir a área do eletrodo de trabalho. Os eletrodos de grafite modificados com POLI(3-HFA) contendo o NM1 configuram um sistema polimérico para detecção de *Neisseria meningitidis* (SPNM) foram mantidos em dessecador por 15 minutos. A seguir, foram lavados em tampão SSC para remoção de adsorções não específica, e secos em N₂ ultra puro. Posteriormente, foram adicionados 18 µL da solução de brometo de etídeo sobre os SPNM onde em dessecador aguardou-

[§] A sonda NM1 consiste numa cadeia simples (oligonucleotídeo), que é complementar da região hipervariável V8 do gene de rRNA 16S de *Neisseria meningitidis*. É nomeado NM1 e a sua sequência é 5'-TGTTGGGCAACCTGATTG-3'.

se 5 minutos, após foi efetuada nova lavagem em tampão SSC e secagem em N₂ ultra puro. Medidas de detecção indireta através da oxidação do BE usando tampão fosfato pH 7,3 como eletrólito suporte foram realizadas em célula de um compartimento (Figura 28).

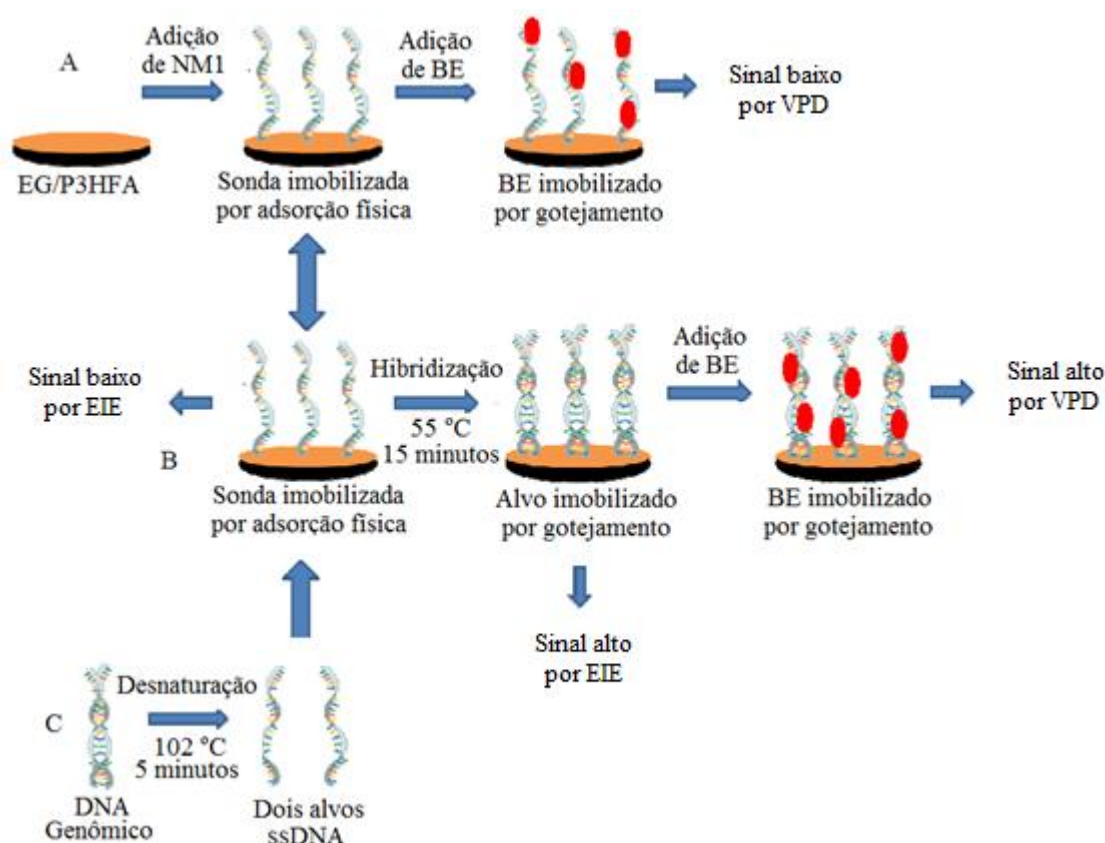


Figura 29: (A) Construção do SPNM para detecção indireta através da oxidação do brometo de etídio por voltametria de pulso diferencial e direta através de espectroscopia de impedância eletroquímica, (B) contendo SPNM e o alvo e em (C) a desnaturação térmica do alvo DNA genômico.

A Figura 29B mostra o procedimento de hibridização que envolve todas as etapas anteriores, todavia antes de adicionar o BE imobilizou-se o alvo de DNA genômico^h de *Neisseria meningitidis* em 18 µL das soluções contendo 200, 400 e 600 ng aquecidas durante 5 minutos a 102 °C (Figura 29C), respectivamente em três eletrodos distintos contendo a sonda pré-aquecidos também a 102 °C por 3 minutos. O

^h O alvo consiste em DNA genômico de uma cultura pura de *Neisseria meningitidis* isolado na Fiocruz-Minas utilizando os seus protocolos de rotina.

evento de hibridização ocorreu em estufa numa temperatura de 55 °C por 15 minutos. Novamente realizou-se lavagem em tampão SSC e posterior secagem com N₂.

Medidas de detecção indireta por VPD através da oxidação do BE foram realizadas usando tampão fosfato pH 7,3 como eletrólito suporte em célula de um compartimento conforme Figura 28.

Medidas de detecção direta foram realizadas por EIE usando KCl 0,1 mol.L⁻¹ como eletrólito suporte, contendo K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆ em célula de três compartimentos, conforme Figura 27 em ensaios paralelos, todavia antes da adição de BE conforme esquema ilustrado na Figura 29.

Imagens de microscopia de força atômica (AFM) foram obtidas para estes sistemas em um microscópio Park Systems.

3.2.13 – Procedimento de construção dos sistemas poliméricos para diagnóstico de *Anaplasma marginale*

Os eletrodos de grafite modificados com POLI(3-HFA) foram pré-condicionados através de cronoamperometria (-0,2 V por 120 s). Após esta etapa foi imobilizado 1 µg do peptídeo AM1ⁱ diluído em tampão acetato pH = 4,3 conforme Figura 30A. Os eletrodos de grafite modificados com POLI(3-HFA) contendo os peptídeos, configuram um sistema polimérico para detecção de *Anaplasma marginale* (SPAM) que permaneceu isolado de luz e sob vácuo por cerca de 1 hora. Após esta etapa, o SPAM foram lavados em tampão PBS e secos com fluxo de N₂ ultra puro.

A Figura 30B mostra o procedimento de reconhecimento em que o SPAM é colocado em contato com 1 µL de soro sanguíneo de animais contaminados com anaplasmoose bovina IgG(+)^j diluído em 17 µL de tampão PBS pH 7,4 e deixado no dessecador na ausência de luz e sob vácuo por cerca de 1 hora. Paralelamente outro SPAM é colocado em contato com 1 µL de soro sanguíneo de animais saudáveis IgG(-)^j diluído em 17 µL de tampão PBS pH 7,4 e deixado no dessecador na ausência

ⁱ AM1 sequência STSSQLGGGSSTSSQLGGGSSTSSQL foi desenhado e sintetizado quimicamente por GenScript EUA Inc acoplado a albumina de soro bovino (BSA) para aumentar a imunogenicidade. AM1 foi construído com 26 resíduos de aminoácidos (aa) contendo repetições da sequência motivo MSP1a (sublinhado) separados por um espaçador de 4 aa, GGGS.

^j Soros sanguíneos de animais saudáveis e contaminados com *A. marginale* foram cedidos pelo Centro de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Eldorado do Sul, RS.

de luz e sob vácuo por cerca de 1 hora. Os sistemas foram lavados em PBS pH 7,4 e secos em N₂ ultra puro.



Os sistemas foram avaliados por medidas de EIE usando solução de KCl 0,1 mol.L⁻¹ contendo K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆ em uma célula eletroquímica de três compartimentos conforme Figura 27.

Medidas de detecção por VPD foram realizadas também usando solução de KCl contendo K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆ como eletrólito suporte em célula de três compartimentos conforme (Figura 27).

Imagens de microscopia de força atômica (AFM) foram obtidas para estes sistemas em um microscópio Shimadzu SPM-9600.

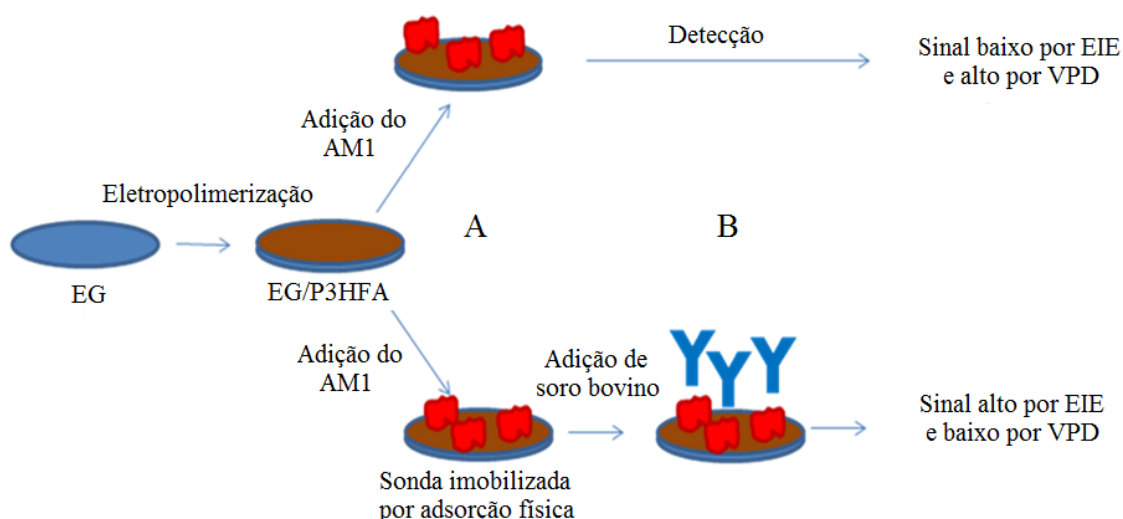
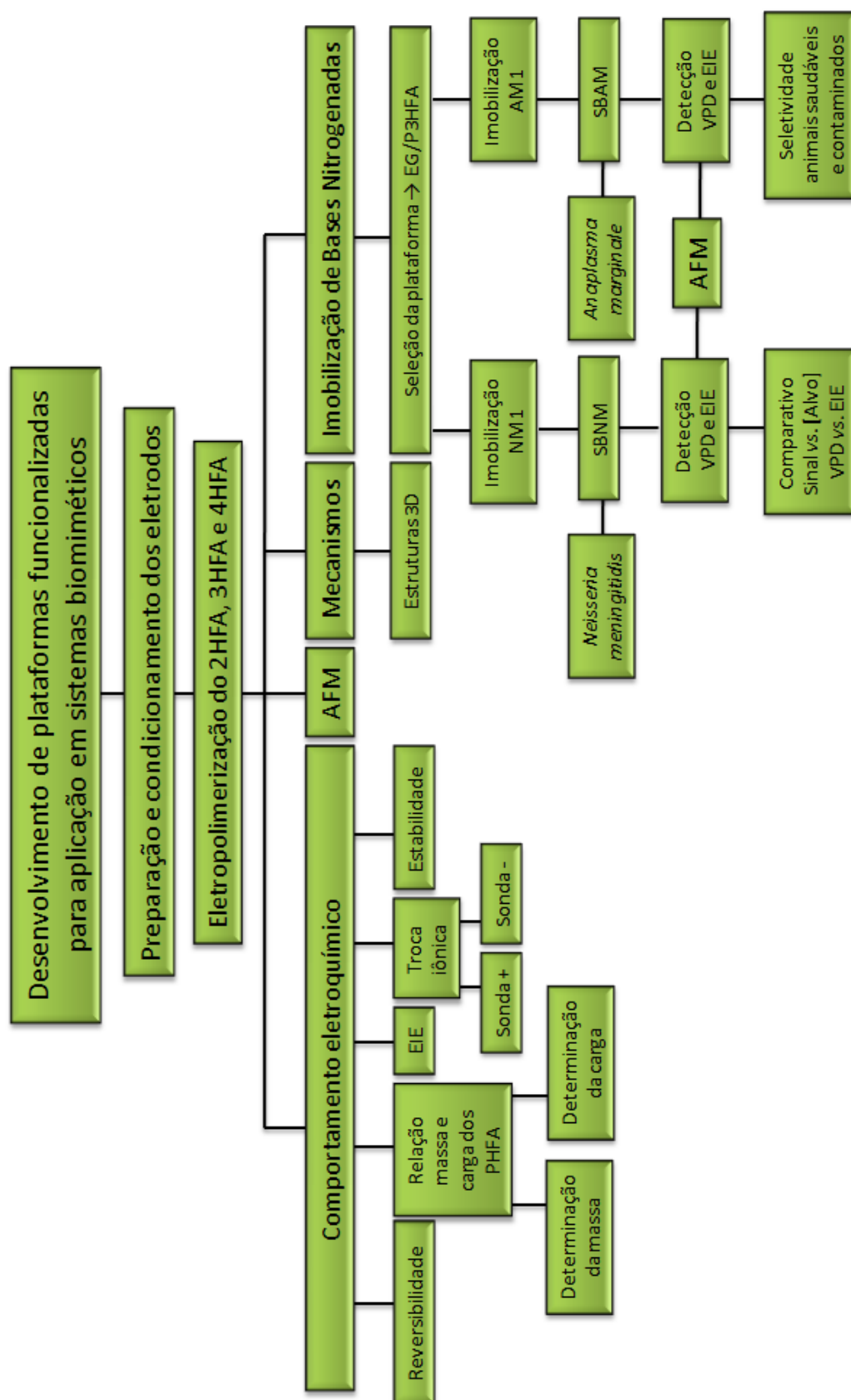


Figura 30: (A) Construção do SPAM e (B) SPAM contendo o alvo sendo detectado por espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria de pulso diferencial.

3.3 – Fluxograma do procedimento experimental



Estudos sobre a eletropolimerização e caracterização comparativa dos isômeros dos ácidos hidroxifenilacéticos foram realizados objetivando aquisição de um maior entendimento do comportamento destes materiais com intuito de aplicá-los como plataformas funcionalizadas para incorporação de moléculas sintéticas na construção de biossensores. A modificação química ou eletroquímica de eletrodos com filmes poliméricos tem sido muito explorada na produção de biossensores. Assim, estudos como, estabilidade eletroquímica, eficiência no transporte de íons, quantidade e eletroatividade do material eletrogerado, capacidade de retenção de bases nitrogenadas, dentre outros parâmetros foram investigados. É importante ressaltar que este é o primeiro trabalho do grupo de pesquisa que faz um comparativo nos polímeros derivados de ácidos hidroxifenilacéticos e aplicá-los no sensoriamento de doenças de humanos e animais usando amostras de elevada complexidade, como DNA genômico de culturas puras de bactérias e soros sanguíneos de animais infectados com bactérias.

4.1 – Eletropolimerizações, atividades e estabilidades eletroquímicas dos filmes poliméricos derivados dos ácidos hidroxifenilacéticos

4.1.1 – Seleção dos eletrodos de grafite

Um estudo inicial foi realizado para selecionar os EG que apresentem áreas eletroativas semelhantes, promovendo assim uma padronização destes substratos antes de usá-los nas respectivas eletropolimerizações. Nosso grupo de pesquisa realiza VC nestes EG em duas soluções eletrolíticas, a primeira sendo uma solução aquosa do par redox $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5,0 mmol.L⁻¹ contendo KCl 0,10 mol.L⁻¹ (padrão eletroquímico de reversibilidade) e a segunda, uma solução aquosa de HClO₄ 0,50 mol.L⁻¹ (eletrólito suporte usado nas eletropolimerizações). Na primeira situação, os perfis dos voltamogramas cíclicos (Figura 31A) são avaliados em dois parâmetros, sendo eles: a relação das correntes de pico (I_{pa}/I_{pc}) que deve ser aproximadamente 1 e a separação dos potenciais de pico ($E_{pa} - E_{pc}$) que deve ser inferior a 100 mV. Eletrodos com variações superiores a 10 % nestes quesitos são rejeitados. Em relação à segunda situação os EG são condicionados através de sucessivos ciclos de varredura de potencial

(cerca de 4 ciclos) na região de +0,00 a +1,20 V promovendo uma limpeza eletroquímica de suas superfícies, deixando os aptos para a eletropolimerização. Caso esses eletrodos possuam valores de corrente inferiores a 25 μA , na faixa de +0,00 a +1,00 V, e valores máximos de corrente em 200 μA , para potenciais acima de 1,00 V, eles estarão aptos para eletrossíntese (Figura 31B).

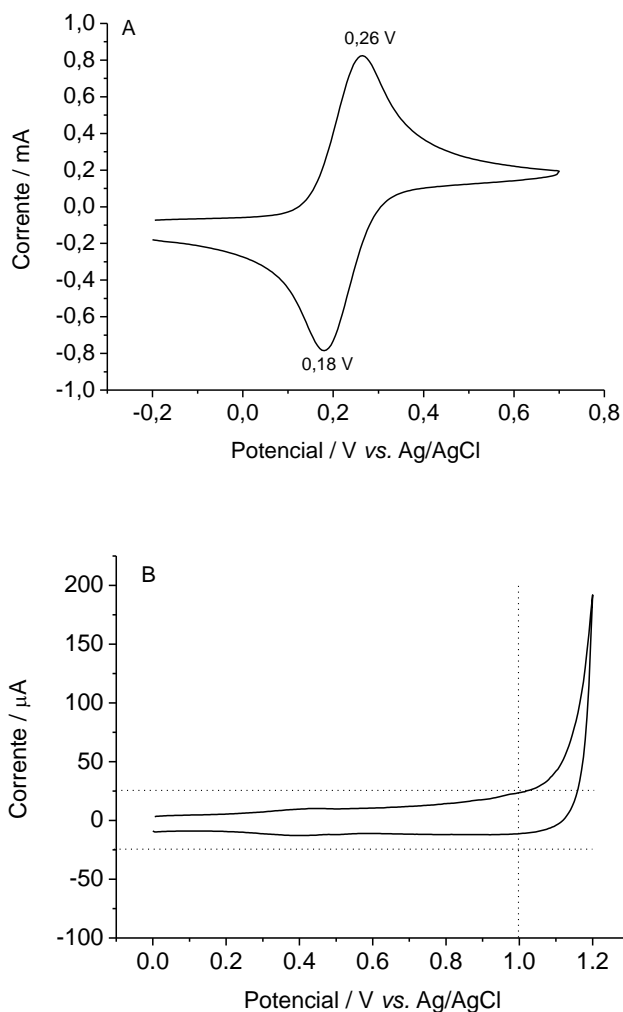


Figura 31: Primeiro ciclo de voltametria do eletrodo de grafite em: (A) solução 5,00 mmol.L⁻¹ K₄Fe(CN)₆/ K₃Fe(CN)₆ contendo 0,10 mol.L⁻¹ KCl e (B) solução HClO₄ 0,50 mol.L⁻¹.
 $v_A = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e $v_B = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

A Figura 31A, mostra o comportamento eletroquímico típico do par redox ferrocianeto/ferricianeto de potássio sobre os eletrodos de grafite. Observa-se um ΔE de 80 mV e uma relação de $I_{p,a}/I_{p,c}$ de 1,04, satisfazendo as condições básicas de um processo reversível.

A Figura 32 mostra o VC referente à primeira varredura de potencial para os três isômeros do ácido hidroxifenilacético (HFA).

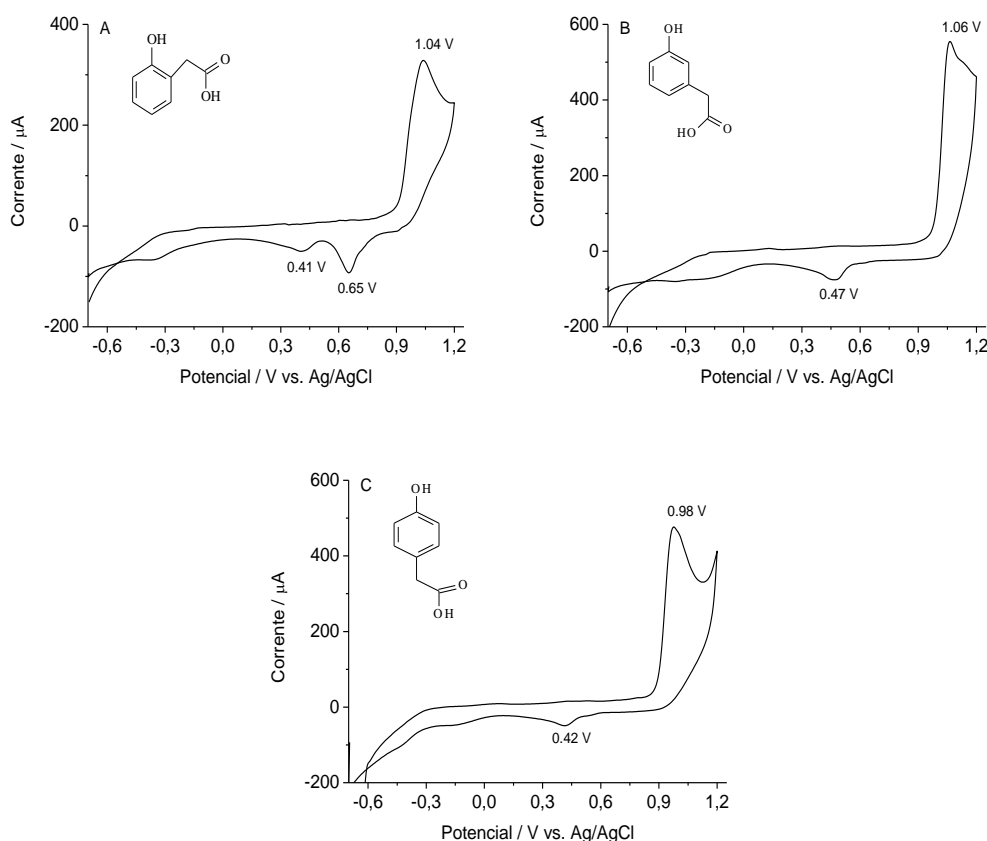


Figura 32: Primeira voltametria cíclica de eletrodos de grafite modificados com 2-HFA (A), 3-HFA (B) e 4-HFA (C), $2,50 \text{ mmol.L}^{-1}$, em HClO_4 $0,50 \text{ mol.L}^{-1}$ a 50 mV s^{-1} .

Observa-se em aproximadamente +1,04 V, +1,06 V e +0,98 V para o ácido 2-hidroxifenilacético, ácido 3-hidroxifenilacético e ácido 4-hidroxifenilacético, respectivamente, picos de oxidação eletroquímica monomérica irreversível. A oxidação do 4-HFA ocorre em um potencial menos positivo em relação aos outros dois isômeros. Este fato pode ser atribuído a um efeito mais acentuado de ressonância no anel aromático para-substituído, em relação ao orto e meta-substituído. O 2-HFA apresenta grupos funcionais com proximidade suficiente para ligações de hidrogênio intramolecular tornando-o relativamente planar. O 2-HFA e o 3-HFA apresentam um maior impedimento estérico, em relação ao 4-HFA, cujo cátion-radical apresenta uma

maior estabilidade, justificando assim sua maior facilidade oxidativa do 4-HFA. O 2-HFA e o 3-HFA possuem densidade eletrônica centralizada nas proximidades dos grupos funcionais substituintes, enquanto que no 4-HFA há duas regiões distintas de densidade eletrônica promovendo uma menor atração da nuvem eletrônica do anel aromático pelos grupos funcionais substituintes, facilitando assim o processo oxidativo discutido mais profundamente no item 4.1.10. O que está em concordância com os coeficientes de transferência eletrônica (α) calculados que são discutidos no item 4.1.11. Dois processos catódicos são observados na varredura reversa para o 2-HFA, um em +0,65 V e outro em +0,41 V, os quais podem ser atribuídos à redução eletroquímica do material adsorvido na superfície do eletrodo. Já no material adsorvido pela eletropolimerização do 3-HFA e 4-HFA, observa-se na varredura reversa um pico, nos potenciais de 0,47 V e 0,42 V, respectivamente.

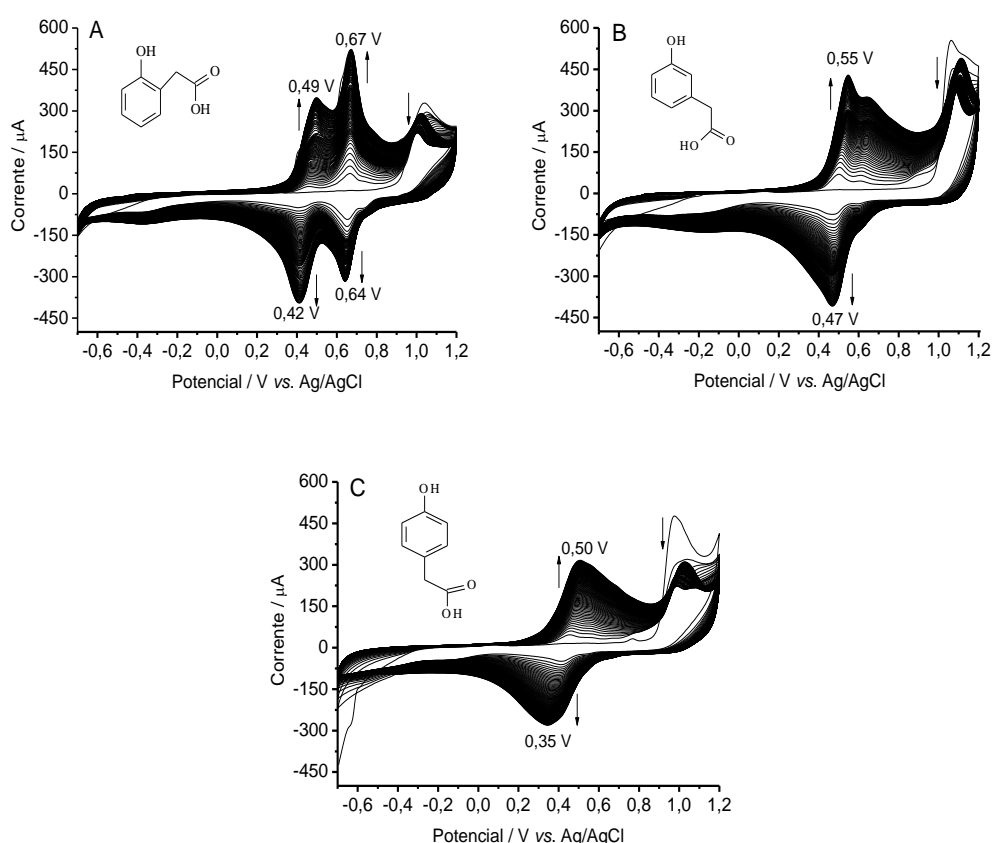


Figura 33: Voltametrias cíclicas consecutivas dos eletrodos de grafite modificados com (POLI(2-HFA) (A), (POLI(3-HFA) (B) e (POLI(4-HFA) (C), 2,50 mmol.L⁻¹, em HClO₄ 0,50 mol.L⁻¹, após 100 ciclos voltamétricos a 50 mV s⁻¹.

A obtenção dos filmes poliméricos poli(ácido 2-hidroxifenilacético) [(POLI(2-HFA))], poli(ácido 3-hidroxifenilacético) [(POLI(3-HFA))] e poli(ácido 4-hidroxifenilacético) [(POLI(4-HFA))] é viabilizada através de VC consecutivas em sucessivos ciclos de potencial entre -0,7 e 1,2 V cujos voltamogramas são apresentados na Figura 33.

Observa-se na Figura 33A que no decorrer das sucessivas ciclagens surgem dois picos de oxidação nos potenciais de 0,49 V e 0,67 V complementares aos picos de redução do POLI(2-HFA) mostrados na Figura 31A. Pode-se afirmar isto, pois estudos para identificação da complementaridade foram realizados, após a eletropolimerização do POLI(2-HFA) nos potenciais de 0 a 0,5 V e 1,2 a 0,5 V. Ou seja, exatamente entre os dois picos referentes à região eletroativa do POLI(2-HFA) e percebe-se que o aparecimento dos picos de redução estão condicionados, concomitantemente, à oxidação e vice-versa nos dois respectivos picos, configurando-os assim como pares redox (Figura 34).

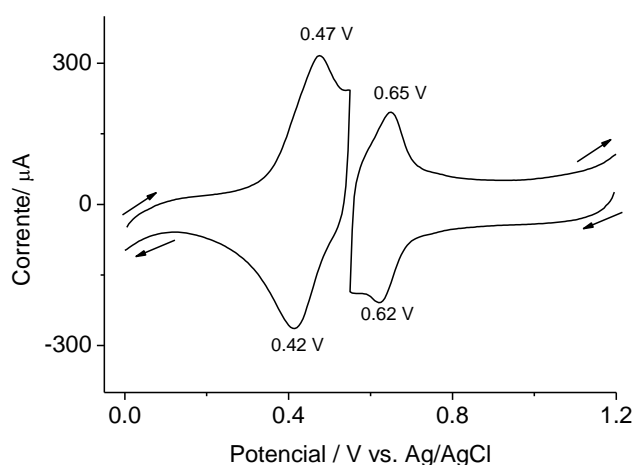


Figura 34: Voltametria cíclica do EG/POLI(2-HFA) em solução aquosa de HClO_4 0,50 mol.L⁻¹ a 50 mV s⁻¹.

Já nas Figuras 33B e 33C, notamos que para o POLI(3-HFA) e POLI(4-HFA) surge aparentemente um único pico de oxidação complementar nos potenciais de 0,55 V e 0,51 V, respectivamente complementares aos picos de redução do POLI(3-HFA) e POLI(4-HFA) mostrados nas Figuras 32B e 32C. De maneira geral, após as sucessivas ciclagens de potencial ocorre um incremento das correntes de oxidação e redução na região de potencial característica dos polímeros formados e adsorvidos no eletrodo de grafite, demonstrando que os três filmes poliméricos são eletroativos e que a quantidade

de elétrons transferidos aumenta sucessivamente após cada ciclo, em função do aumento do número de camadas poliméricas. Em contrapartida, um decaimento de corrente ($I_{p,a}$) é observado na região de potencial característica da oxidação monomérica para a formação dos cátions-radicais, o que pode ser atribuído ao consumo destes monômeros próximos à superfície do eletrodo no decorrer da eletrossíntese para formação dos mesmos.



A Figura 35 mostra um perfil diferente dos perfis obtidos na Figura 33. De fato, na ausência do monômero, ou seja, efetuando sucessivas ciclagens do eletrodo de grafite apenas no eletrólito suporte obtemos uma reduzida atividade eletroquímica visualizando apenas um pequeno aumento nas correntes capacitivas residuais e ou oxidação de grupos na superfície do grafite, da ordem de 20 μA , enquanto que nas eletrossínteses usando os reagentes monoméricos temos correntes da ordem de 400 a 600 μA , associadas aos produtos formados. Na Figura 35, os picos discretos de oxidação e redução entre 0,4 e 0,6 V podem estar associados a grupos fenólicos e carboxílicos e entre 0,8 e 0,9 V a quinonas e hidroquinonas, presentes na superfície do grafite.

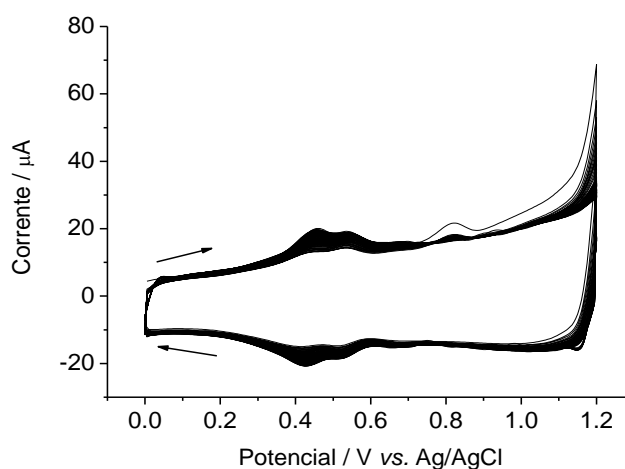


Figura 35: Voltametrias cíclicas do eletrodo de grafite em HClO_4 0,50 mol.L⁻¹, após 100 ciclos voltamétricos a 50 mV s⁻¹.

4.1.3 – Comportamento eletroquímico dos ácidos poli-hidroxifenilacéticos

Os monômeros residuais eventualmente disponíveis na malha polimérica são removidos e/ou eletropolimerizados através de duas varreduras de potencial entre 0 e 1,2 V. A observação se valida em função de encontrarmos logo na primeira varredura uma elevada corrente em torno do potencial de oxidação do monômero que diminui

significativamente na segunda varredura. As correntes relacionadas aos filmes eletroativos ficam estabilizadas após a terceira varredura de potencial. Estas varreduras para o EG e os EG modificados são mostrados na Figura 36, confirmando a modificação nos eletrodos através da comparação entre o perfil eletroquímico na ausência de monômeros (Figura 36, curva a) e os perfis eletroquímicos após a eletrossíntese, especificamente na região de potencial em que os filmes apresentam suas atividades eletroquímicas (Figura 36 curva b, curva c e curva d).

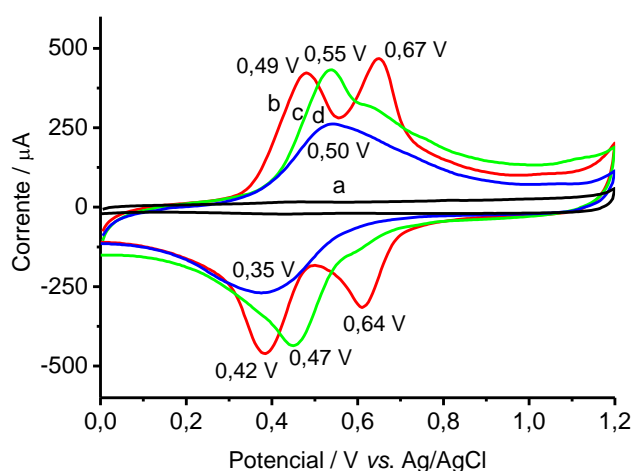


Figura 36: Voltametria cíclica do eletrodo de grafite (a) e dos eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA) (b), POLI(3-HFA) (c) e POLI(4-HFA) (d) em solução aquosa de HClO_4 0,50 mol.L^{-1} a 50 mV s^{-1} .

A modificação na superfície do eletrodo de grafite após o procedimento de eletropolimerização é nítida, sendo possível observar picos de oxidação e redução, após a formação dos filmes poliméricos nos EG, cujos intervalos de potenciais estão em concordância com a literatura^{90,92,100} e são apresentados na Tabela 3.

Estes valores de potenciais e de correntes são semelhantes aos observados durante a eletropolimerização de cada um dos isômeros (Figura 33) indicando que os filmes poliméricos formados adsorvem eficazmente na superfície do EG após serem eletrossintetizados.

Pode ser observado também que a eletropolimerização dos três isômeros apresenta dois pares redox, todavia os picos estão mais bem definidos no 2-HFA. Já no 3-HFA e 4-HFA os picos estão sobrepostos, conforme evidenciado no tratamento de

deconvolução matemática^k realizado nos voltamogramas da Figura 36, (curvas b, c e d), mostrados na Figura 37.

Tabela 3: Intervalos de potenciais de oxidação e redução do POLI(2-HFA), POLI(3-HFA) e POLI(4-HFA) eletrodepositados sobre eletrodos de grafite.

Polímeros	Oxidação	Redução
POLI(2-HFA)	+0,30 V a +0,55 V e 0,55 V a +0,75 V	+0,50 V a +0,25 V e +0,75 V a +0,50 V
POLI(3-HFA)	+0,30 V a +0,75 V	+0,60 V a +0,25 V
POLI(4-HFA)	+0,25 V a +0,95 V	+0,75 V a +0,10 V

De fato, após a deconvolução, nota-se que os valores de potenciais e correntes de pico apresentam uma maior semelhança nos perfis voltamétricos das eletropolimerizações do 2-HFA e 3-HFA em relação ao 4-HFA. Possivelmente por que os filmes derivados dos dois primeiros isômeros têm estruturas mais parecidas entre si, sendo ambas discrepantes do filme derivado deste último isômero. A Tabela 4 mostra os valores de potencial de pico para os eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA), POLI(3-HFA) e POLI(4-HFA) após a deconvolução.

Tabela 4: Potenciais de pico dos eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA), POLI(3-HFA) e POLI(4-HFA) após a deconvolução.

	Potencial / mV vs. Ag/AgCl								
	POLI(2-HFA)			POLI(3-HFA)			POLI(4-HFA)		
	Oxidação	Redução	Δ	Oxidação	Redução	Δ	Oxidação	Redução	Δ
PICO 1	480	380	100	520	450	70	550	370	180
PICO 2	650	600	50	630	620	10	750	560	190

A comparação dos valores de potencial para o primeiro pico de oxidação três polímeros indica que as estruturas deles podem estar relacionadas com a facilidade de oxidação em ordem decrescente POLI(2-HFA) > POLI(3-HFA) > POLI(4-HFA). As variações dos valores dos potenciais de pico de oxidação e redução mostram que o POLI(4-HFA) deve apresentar uma cinética de transferência eletrônica mais lenta em

^k Em matemática, deconvolução é um algoritmo capaz de reverter os efeitos da convolução de dados registrados por um software.

relação ao POLI(2-HFA) e POLI(3-HFA). Retomaremos a discussão sobre reversibilidade com mais profundidade no item 4.1.5.



A Figura 37 mostra os potenciais dos dois pares redox característicos para os três filmes poliméricos. Estes dois pares redox, provavelmente associados à formação de polarons e bipolarons no esqueleto polimérico, semelhantes aos que ocorrem nas eletropolimerizações da polianilina e do poli-2-aminobenzóico.^{213, 214}

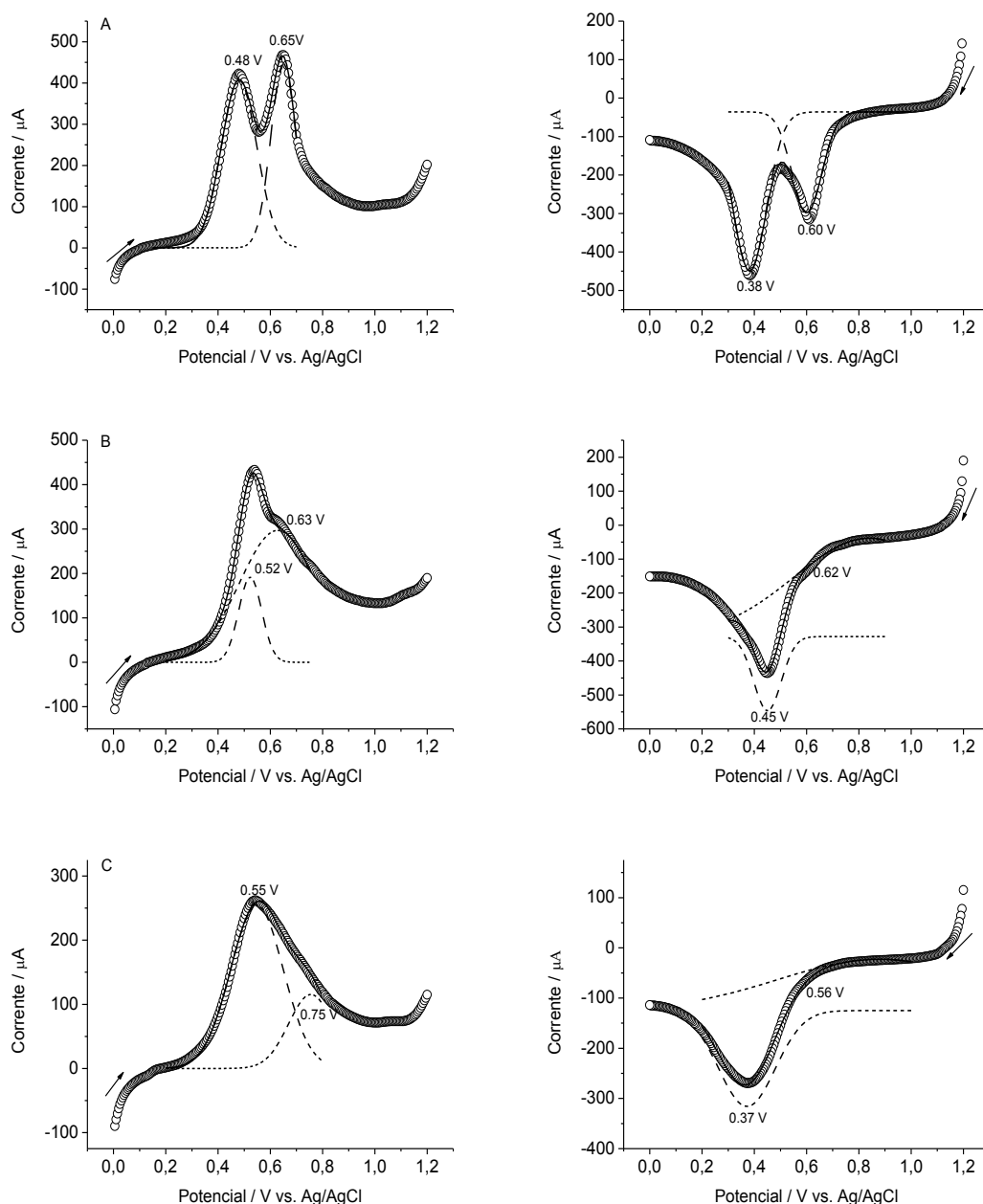


Figura 37: Deconvolução das VC dos processos de oxidação e redução para o EG/POLI(2-HFA) (A), EG/POLI(3-HFA) (B) e EG/POLI(4-HFA) (C). Resultados experimentais (o), deconvolução (---) e fitagem (—).

A Tabela 5 mostra os erros estatísticos obtidos na separação matemática das respostas eletroativas dos três filmes poliméricos por deconvolução.



Tabela 5: Coeficiente de determinação (R^2) e chi-quadrado (χ^2) da deconvolução dos voltamogramas cíclicos para eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA), POLI(3-HFA) e POLI(4-HFA).

Polímeros	R^2 - Oxidação	R^2 - Redução	χ^2 - Oxidação	χ^2 - Redução
POLI(2-HFA)	0,99613	0,99333	$1,1 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-4}$
POLI(3-HFA)	0,99829	0,99734	$4,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-5}$
POLI(4-HFA)	0,99753	0,99963	$2,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-5}$

Os valores de chi-quadrado (χ^2) mostram a dispersão existente entre os valores experimentais e a fitagem matemática da Figura 36, sendo que os menores valores χ^2 mostram uma melhor simulação. Outro parâmetro estatístico que foi avaliado na deconvolução diz respeito ao coeficiente de determinação (R^2) medindo o ajuste da simulação matemática ao resultado experimental, podendo variar, percentualmente, de 0 a 1 e ao contrário do χ^2 , quanto maior o parâmetro R^2 , mais ajustada está à simulação matemática dos resultados experimentais.

Podemos observar que as simulações mostraram parâmetro R^2 superiores a 0,99 e parâmetro χ^2 inferiores a 10^{-4} , mostrando um excelente ajuste entre as simulações matemáticas e os resultados experimentais, cujo significado físico foi observado com êxito em quatro das seis simulações. Todavia os valores de 0,62 V e 0,56 V para o segundo pico de redução do EG/POLI(3-HFA) e EG/POLI(4-HFA), respectivamente, foram retirados dos voltamogramas dispostos nas Figuras 33B e 33C, pois apesar de um erro estatístico baixo o significado físico não está conclusivo devido a uma intensa sobreposição de seus picos de redução, ou seja, a deconvolução mostra que os dois picos existem, todavia não é eficaz para separá-los devido à intensa convolução dos sinais.

4.1.4 – Testes diagnósticos por VC nos processos redox dos ácidos polihidroxifenilacéticos

Processos eletroquímicos podem ser considerados reversíveis, quase-reversíveis ou irreversíveis dependendo da relação entre as taxas de transferência de elétrons (TTE) e as taxas de transporte de massa (TTM). Sistemas reversíveis apresentam TTE muito maiores que TTM mantendo o equilíbrio Nerstiano¹ na superfície do eletrodo. Já nos sistemas irreversíveis a TTM aumenta e equipara-se a TTE que não consegue mais manter o equilíbrio da superfície promovendo normalmente uma maior separação entre os picos anódicos e catódicos dos pares redox. Um sistema reversível pode comportar-se como irreversível aumentando a velocidade de varredura, todavia o estágio intermediário denominado quase-reversível é verificado entre ambos os processos.²¹⁵ Um estudo de reversibilidade deve ser realizado variando a velocidade de varredura, caso contrário, conclusões errôneas podem ser obtidas.

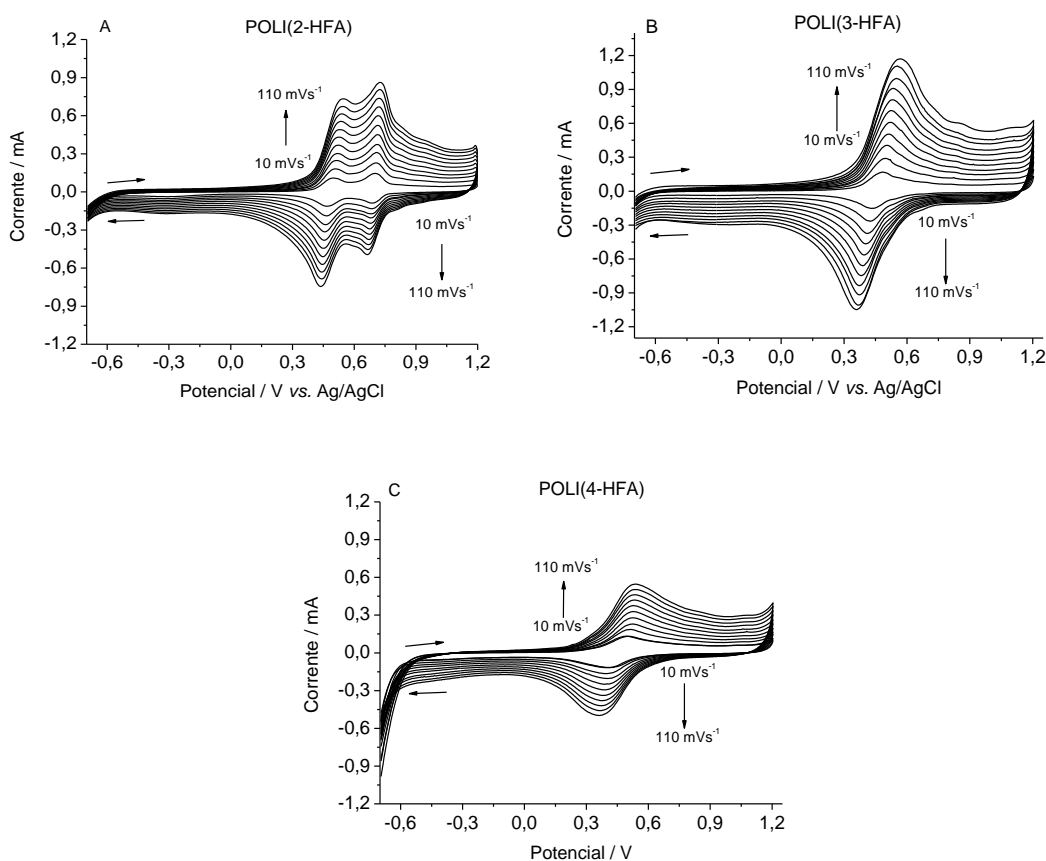


Figura 38: Voltametrias cíclicas consecutivas para o EG/POLI(2-HFA) (A), EG/POLI(3-HFA) (B) e EG/POLI(4-HFA) (C) em solução de HClO_4 0,50 mol.L⁻¹; $v = 10 \text{ mVs}^{-1}$ a 110 mVs^{-1} .

¹ Sistemas com comportamento nerstiano seguem a Equação de Nernst ($E = E^0 - 0,0592/n \log[\text{oxi}]/[\text{red}]$; sendo n = numero elétrons envolvidos), para reações reversíveis concentrações das espécies oxidadas (oxi) e reduzida (red) são função do potencial.

A Figura 38 mostra os voltamogramas para os eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA), POLI(3-HFA) e POLI(4-HFA), em ácido perclórico, com velocidades de varredura variando entre 10 mVs⁻¹ e 110 mVs⁻¹, em intervalos constantes de 10 mVs⁻¹.

Os sinais de corrente e potencial de pico destes materiais eletroativos adsorvidos nos EG explícitos na Figura 38 foram obtidos automaticamente do tratamento estatístico realizado pelo software GPES e posteriormente usados nos testes, com o intuito de aprofundar os estudos destes materiais. Foram adotados para o EG/POLI(2-HFA) e EG/POLI(3-HFA) um único pico de oxidação e redução, sabendo que o mesmo é a somatória, ou seja, a convolução de dois picos, conforme discutido no item 4.1.3.

Apesar dos filmes poliméricos estarem adsorvidos na superfície do eletrodo e estarem protonados neste pH de 0,3, sabe-se que a perda de elétrons para o eletrodo durante o ciclo de oxidação (TTE) promove uma difusão das espécies ClO₄⁻ do seio da solução para a superfície do eletrodo (TTM), fazendo com que os mesmos permeiem a malha polimérica neutralizando-a. Durante o ciclo de redução obtivemos, exatamente o contrário, os filmes poliméricos ao receberem os elétrons “expulsam” os íons perclorato novamente para o seio da solução (TTM). A cinética das TTE e TTM estão relacionadas diretamente com a estrutura polimérica discutida nos itens 4.1.10 e 4.1.11.

Os diagnósticos 1 e 2 mostram a diferença entre os potenciais de picos anódicos e catódicos e os potenciais de meia onda, respectivamente, conforme as equações 8 e 9:

Equação 8:

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$$

Equação 9:

$$|E_p - E_{p/2}|$$

onde E_{pa} é o potencial de pico anódico, E_{pc} é o potencial de pico catódico, E_p é o potencial de pico e $E_{p/2}$ é o potencial de meia onda, todos em milivolts (mV).

De acordo com a equação de Nernst para processos reversíveis em ambos os diagnósticos obtêm 59 mV / n, onde n é o número de elétrons envolvidos, sendo que para altas TTE pode-se encontrar 29,5 mV / n. As Figuras 39 e 40 mostram os valores obtidos nas equações 5 e 6 para poli(ácidos hidroxifenilacéticos) em função da velocidade de varredura (v).

Fazendo uma média aritmética dos valores obtidos de $E_{pa} - E_{pc}$ para as velocidades de varredura de 10 a 110 mV s^{-1} , obtemos 74 mV e 36 mV para os picos 1 e 2, respectivamente do EG/POLI(2-HFA). Ou seja, a possível formação do polaron tem uma TTE menor em relação à formação do seu respectivo bipolaron que apresenta alta TTE, em concordância ao reportado na literatura.¹² Obtemos a média de 129 mV para o EG/POLI(3-HFA) e EG/POLI(4-HFA), todavia comparando as inclinações das retas, percebemos que os valores de ΔE_p aumentam mais para o EG/POLI(3-HFA) em relação ao EG/POLI(4-HFA), quando aumentamos a velocidade de varredura. O aumento de ΔE_p ocasionado pelo aumento da velocidade de varredura é característico de sistema quase-reversível.

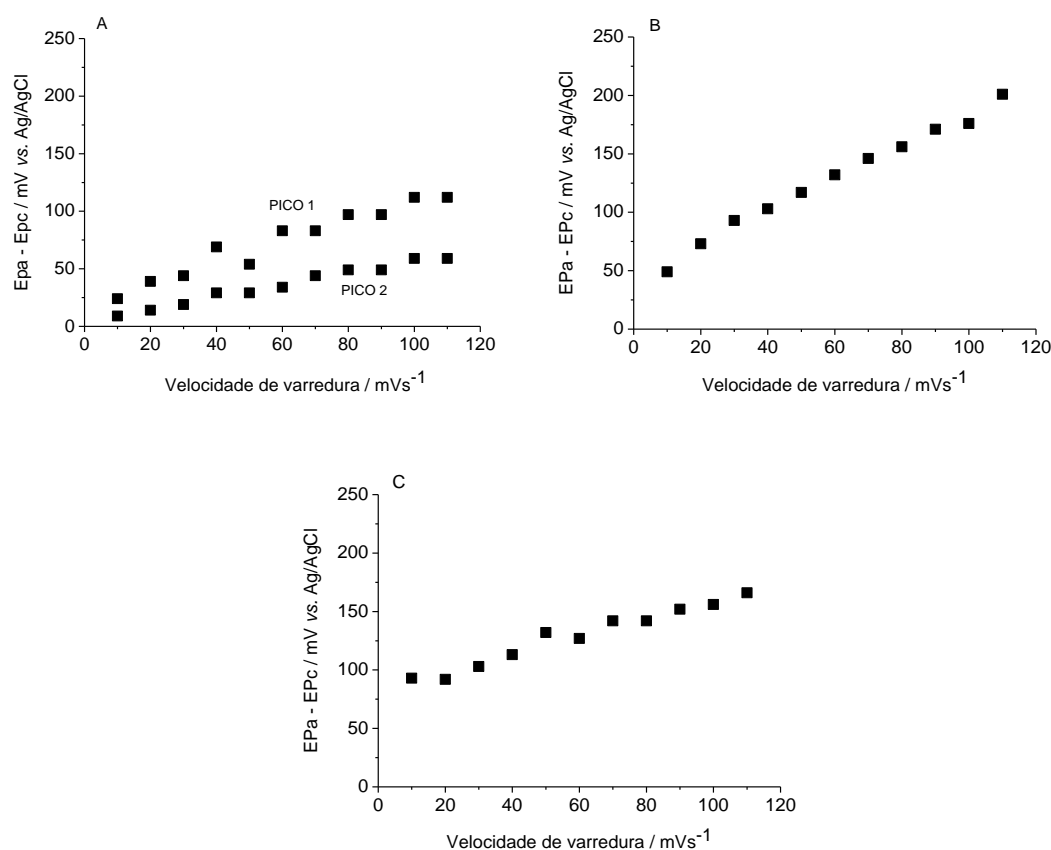


Figura 39: ΔE_p vs. velocidade de varredura em solução de HClO_4 0,50 mol.L^{-1} para eletrodos de grafite modificados com (A) POLI(2-HFA), (B) POLI(3-HFA) e (C) POLI(4-HFA).

Na Figura 39 a amostragem de potenciais é no instante em que a oxidação é máxima. Ou seja, temos o potencial de pico, todavia o instante mais adequado em termos do equilíbrio químico seria no potencial de meia onda.

A Figura 40 mostra a variação de potencial neste instante, onde observamos que em ordem crescente de reversibilidade temos EG/POLI(4-HFA) < EG/POLI(3-HFA) < EG/POLI(2-HFA). Novamente verificamos uma sensibilidade maior de incremento de potencial em função do aumento da velocidade de varredura para o EG/POLI(3-HFA), em relação ao EG/POLI(2-HFA) e EG/POLI(4-HFA), que apresentam patamares constantes de potencial em função do aumento da velocidade de varredura.

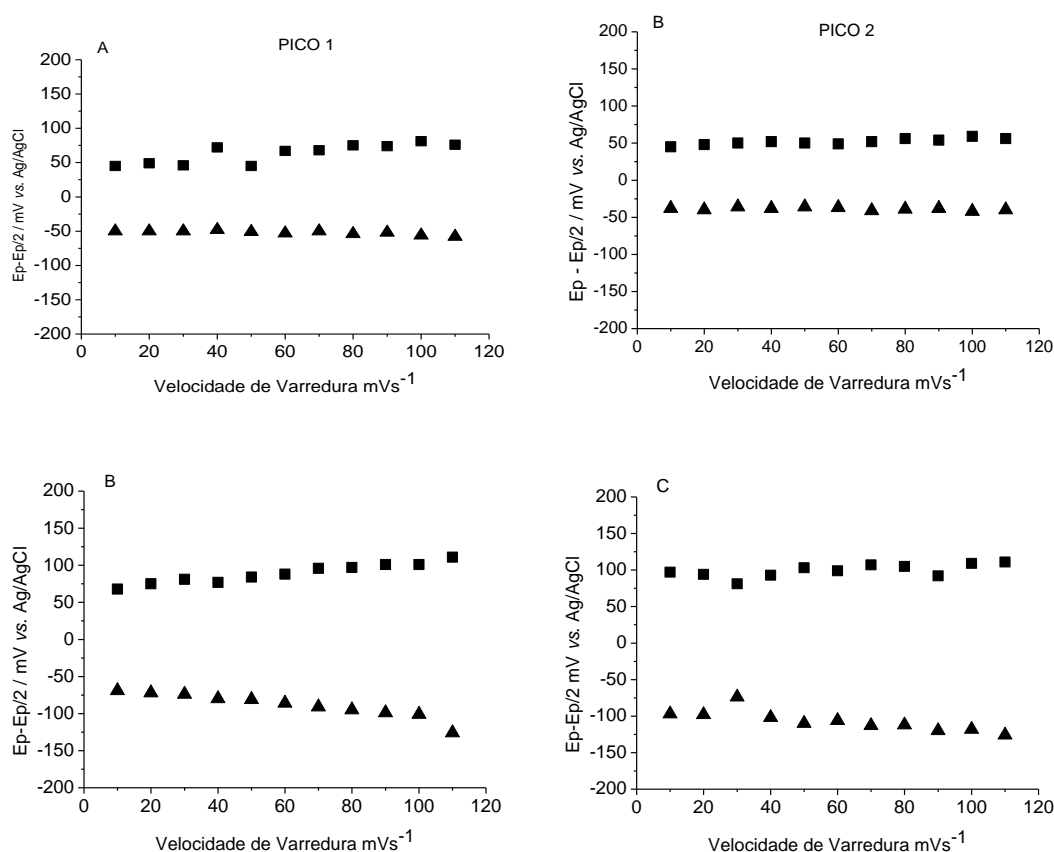


Figura 40: $E_p - E_{p/2}$ vs. velocidade de varredura do (■) pico anódico e (▲) pico catódico em solução de HClO_4 0,50 mol.L⁻¹ para eletrodos de grafite modificados com (A) POLI(2-HFA), (B) POLI(3-HFA) e (C) POLI(4-HFA).

A Figura 41 mostra o diagnóstico 3 que evidencia a relação entre as correntes de pico anódico (I_{pa}) e catódico (I_{pc}), onde valores iguais a 1 são inerentes aos processos reversíveis.

Fazendo uma média aritmética dos valores obtidos de I_{pa}/I_{pc} para as velocidades de varredura de 10 a 110 mVs⁻¹ obtemos 0,72 e 1,41 para os picos 1 e 2, respectivamente do EG/POLI(2-HFA). Efetuando novamente uma média aritmética dos

valores obtidos para o pico 1 e 2 obtemos 1,07, confirmando que a TTE são diferentes para formação de polarons e bipolarons, todavia quando fazemos uma somatória da varredura anódica e catódica, ou seja, fazendo uma convolução dos picos anódicos e catódicos obtemos uma relação entre I_{pa} e I_{pc} próxima a 1 para o EG/POLI(2-HFA). Isto também foi verificado para o EG/POLI(3-HFA) e EG/POLI(4-HFA), em que a relação entre I_{pa} e I_{pc} foi de 1,06 e 1,03, respectivamente.

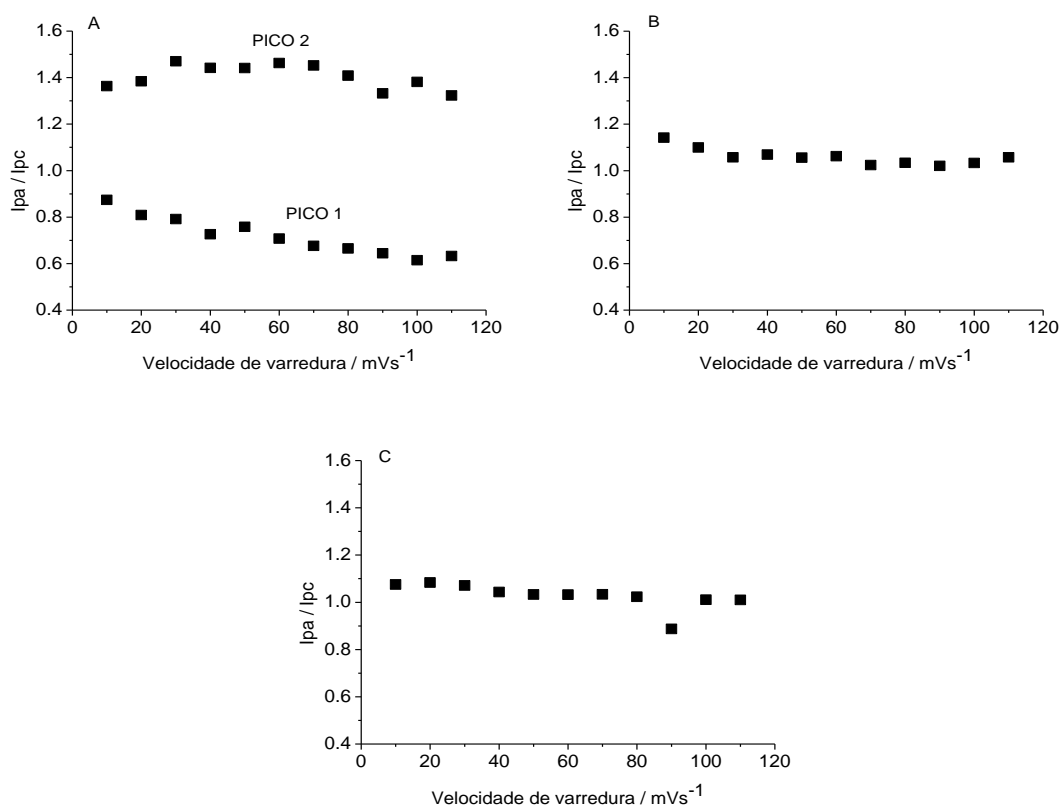


Figura 41: I_{pa}/I_{pc} vs. velocidade de varredura em solução de HClO_4 0,50 mol.L^{-1} para eletrodos de grafite modificados com (A) POLI(2-HFA), (B) POLI(3-HFA) e (C) POLI(4-HFA).

A equação 10, mostra as relações de Randles-Sevcic a 25 °C para uma condição ideal de VC, descrevendo o efeito da velocidade de varredura na corrente de pico. A corrente de pico não depende apenas da concentração e das propriedades de difusão das espécies eletroativas, mas também da velocidade de varredura.

Equação 10:

$$I_p = -(2,69 \times 10^{-5}) n^{3/2} C D^{1/2} v^{1/2}$$

onde I_p é a corrente de pico máxima em $A\ cm^{-2}$, n é o número de elétrons transferidos, C é a concentração em $mol\ L^{-1}$, D é coeficiente de difusão em $cm^2\ s^{-1}$ e v é a velocidade de varredura em $V\ s^{-1}$.

Baseado nesta equação o diagnóstico 4 nada mais é do que uma relação linear que deve passar pela origem entre I_p e $v^{1/2}$ (ou alternativamente $I_p / v^{1/2}$ é uma constante) para sistemas reversíveis. A Figura 42 mostra o diagnóstico 4 para o EG/POLI(2-HFA), EG/POLI(3-HFA) e EG/POLI(4-HFA).

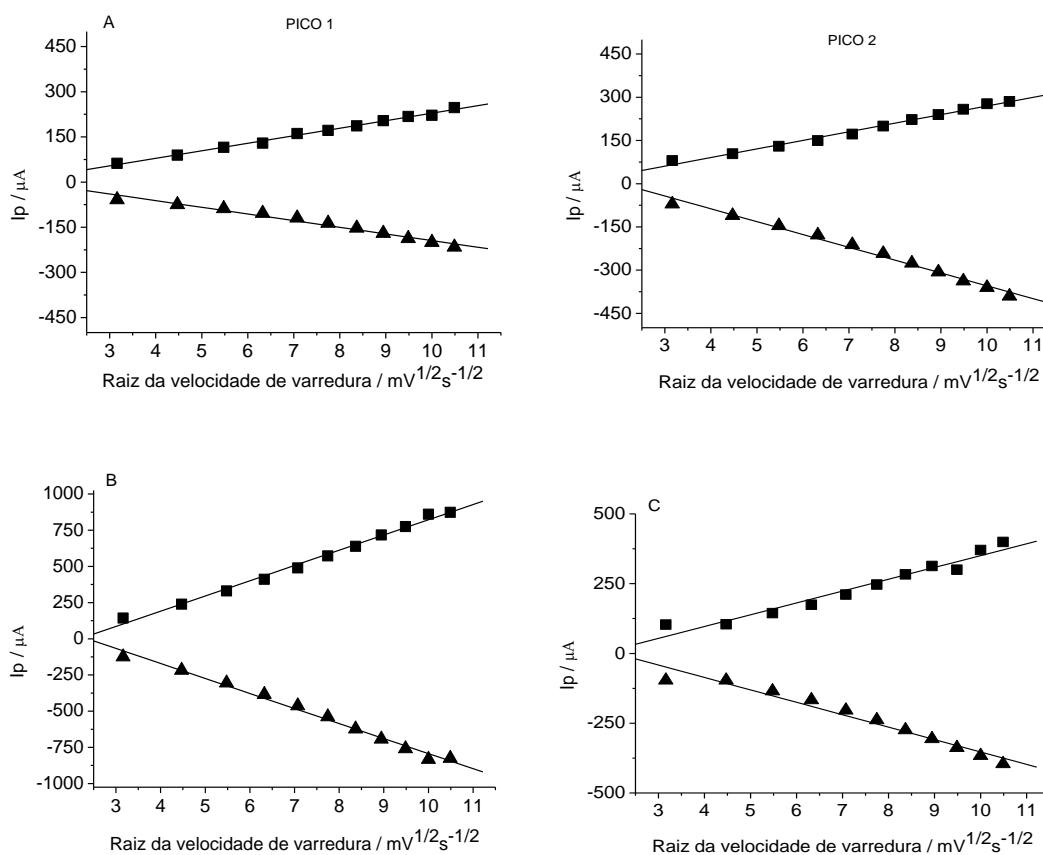


Figura 42: I_p vs. $v^{1/2}$ do (■) pico anódico e (▲) pico catódico em solução de $HClO_4$ 0,50 $mol.L^{-1}$ para eletrodos de grafite modificados com (A) POLI(2-HFA), (B) POLI(3-HFA) e (C) POLI(4-HFA).

Todos os sistemas apresentam uma boa correlação de linearidade com $R > 0,99$, exceto para EG/POLI(4-HFA) onde obtemos R de 0,97575 e 0,98044 para os processos de oxidação e redução, respectivamente. Possivelmente, essa ausência de linearidade pode estar associada a sua estrutura que promove uma menor difusão das espécies ClO_4^- (aq) e provavelmente deve proporcionar uma menor TTM e TTE.

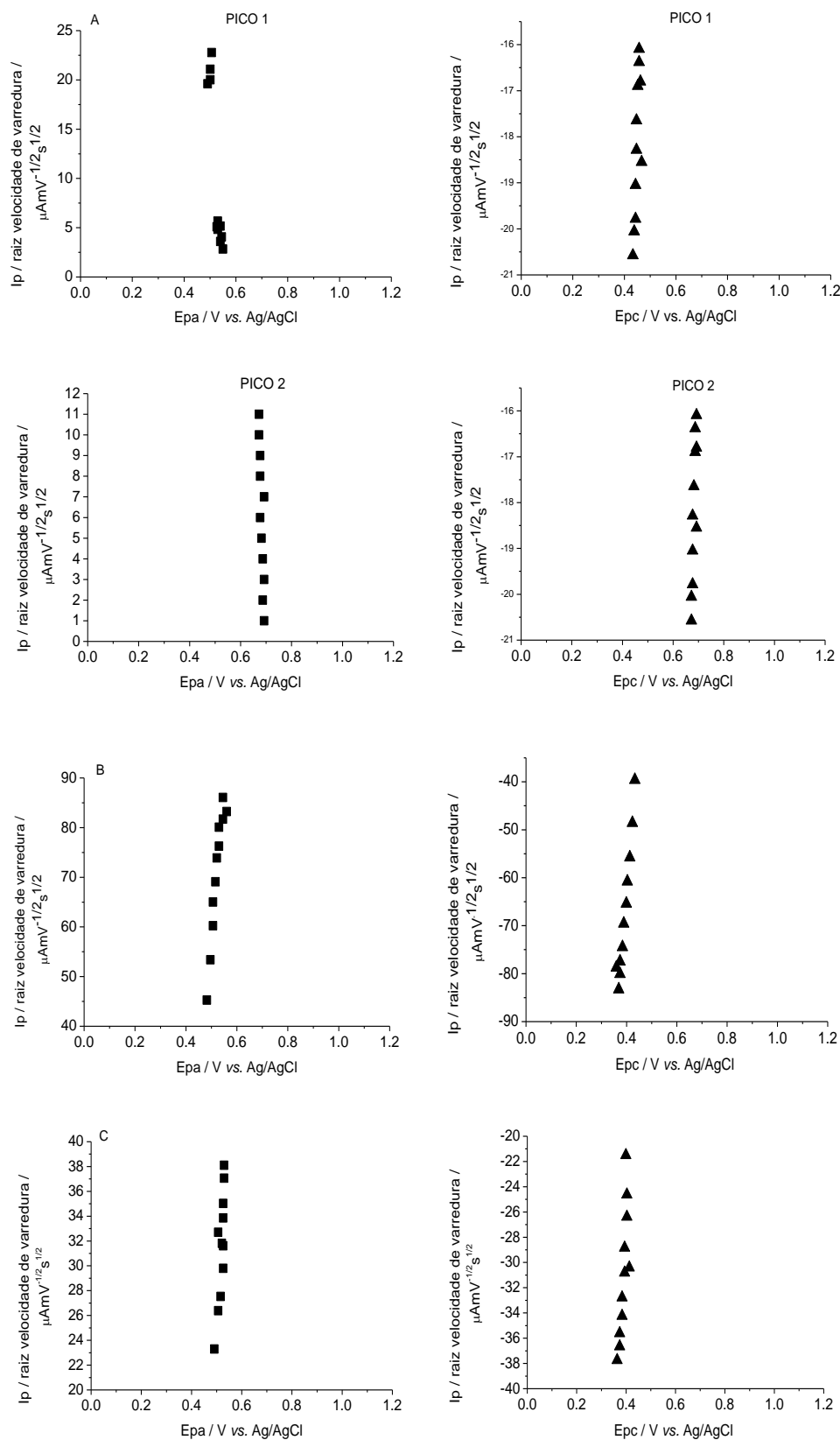


Figura 43: $I_p / v^{1/2}$ vs. E_p (■) pico anódico e (▲) pico catódico em solução de HClO₄ 0,50 mol.L⁻¹ para EG modificados com (A) POLI(2-HFA), (B) POLI(3-HFA) e (C) POLI(4-HFA).

A menor difusão das espécies ClO_4^- (aq) no EG/POLI(4-HFA) e EG/POLI(2-HFA) em relação ao EG/POLI(3-HFA) também pode ser comparada pela inclinação das retas explícitas na Figura 42.

A análise da Figura 42 mostra que o EG/POLI(3-HFA) apresentou maiores coeficientes angulares nos processos de oxidação e redução, $2,44 \times 10^{-4}$ e $-2,30 \times 10^{-4}$, respectivamente. Com relação aos EG/POLI(2-HFA), $2,49 \times 10^{-5}$ e $-2,21 \times 10^{-5}$, $2,86 \times 10^{-5}$ e $-4,45 \times 10^{-5}$, para os picos 1 e 2, respectivamente, sendo esses valores muito próximos aos coeficientes angulares encontrados para o EG/POLI(4-HFA), $9,18 \times 10^{-5}$ e $-4,24 \times 10^{-5}$, respectivamente.

A inclinação aproximadamente dez vezes maior para a matriz EG/POLI(3-HFA), em relação, às matrizes EG/POLI(2-HFA) e EG/POLI(4-HFA), estão em consonância com o estudo cinético discutido mais detalhadamente no final desse item. Estas diferenças estão associadas à estrutura tridimensional de cada polímero (ver item 4.1.10), onde o POLI(3-HFA) apresenta uma estrutura helicoidal que facilita a cinética de difusão dos íons ClO_4^- (aq). Observando ainda as retas da Figura 42 também verificamos que na extrapolação todas passam próximas a origem, e que seus coeficientes lineares são da ordem de 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-5} , para o EG/POLI(2-HFA), EG/POLI(3-HFA) e EG/POLI(4-HFA), ou seja, I_p é proporcional a $v^{1/2}$, mas não diretamente proporcional como característico de sistemas reversíveis.²¹⁵ Esses resultados também indicam que os três sistemas são quase-reversível, pois I_p aumenta com a raiz quadrada da velocidade de varredura, mas não é proporcional a ela. Ainda temos que as retas não passam pela origem como característico de sistemas reversíveis.

Para sistemas irreversíveis o E_p depende da velocidade de varredura, já para os sistemas reversíveis ocorre o contrário, de fato, o diagnóstico 5 visa relacionar o E_p com a velocidade de varredura conforme Figura 43. A análise dos gráficos comprova que o potencial de pico para os sistemas acima tem um pequeno deslocamento negativo para o E_{pc} em função da velocidade de varredura.

O diagnóstico 6 é uma aplicação direta das relações estabelecidas por Frederick Cottrell que descrevem a mudança na corrente de pico em função do tempo do experimento. A equação de Cottrell descreve o comportamento da corrente de espécies que difundem do seio da solução até um eletrodo planar e pode ser resumida na Equação 11:

Equação 11:

$$I_p = K t^{-1/2}$$

onde, I_p é a corrente de pico e t é o tempo em s. $K = n F A C D^{1/2} \pi^{1/2}$. K é um conjunto de constantes para um determinado sistema, derivada do número de elétrons envolvido no processo redox (n), da constante de Faraday (F), da área do eletrodo (A em cm^2), da concentração das espécies eletroativas (C) e seu respectivo coeficiente de difusão (D).

A Figura 44 mostra o diagnóstico 6 em que se analise a variação I_p vs. $t^{1/2}$, para os três sistemas.

O tempo (t) de cada varredura foi obtido dividindo os potenciais pela velocidade de varredura. As relações matemáticas de função potência são características de processos controlados por difusão conforme verificado para os três sistemas. Sabendo que a quantidade de elétrons envolvidos na formação dos polarons e bipolarons é a mesma para os três polímeros (ver item 4.1.5) e que a concentração das espécies eletroativas são aproximadamente semelhantes (espécies eletroativas de difusão “íons perclorato $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ e espécies eletroativas adsorvidas “filmes poliméricos”) de maneira que a área eletroativa dos três sistemas também seja semelhante, e que ainda nos três sistemas temos ácido perclórico com eletrólito suporte, cujas espécies $\text{H}^+_{(\text{aq})}$ e $\text{ClO}_4^-_{(\text{aq})}$ apresentam obviamente o mesmo coeficiente de difusão nos três sistemas, então o valor da constante (K) é uma medida indireta da cinética de cada matriz polimérica. A estrutura de cada polímero pode ser comparada através desta constante, já que a mobilidade dos íons perclorato passa a depender exclusivamente da capacidade de permear a estrutura tridimensional de cada polímero durante as etapas de oxidação e redução destes polímeros.

A Figura 45 mostra a variação I_p vs. $t^{-1/2}$ para os três sistemas e com intuito de viabilizar um comparativo direto entre os três polímeros foi realizada uma convolução dos dois picos bem distintos do POLI(2-HFA). Podemos observar que a cinética de transporte de massa dos íons perclorato na malha polimérica do POLI(2-HFA) e POLI(4-HFA) apresentam semelhantes, todavia a entrada e saída dos íons perclorato no POLI(3-HFA) durante sua oxidação e redução, respectivamente é muito mais facilitada, em concordância com o diagnóstico 4 que mostrou inclinação para a reta I_p vs. $v^{1/2}$ semelhantes para o EG/POLI(2-HFA) e EG/POLI(4-HFA) e dez vezes menores em relação ao EG/POLI(3-HFA) discutido anteriormente.

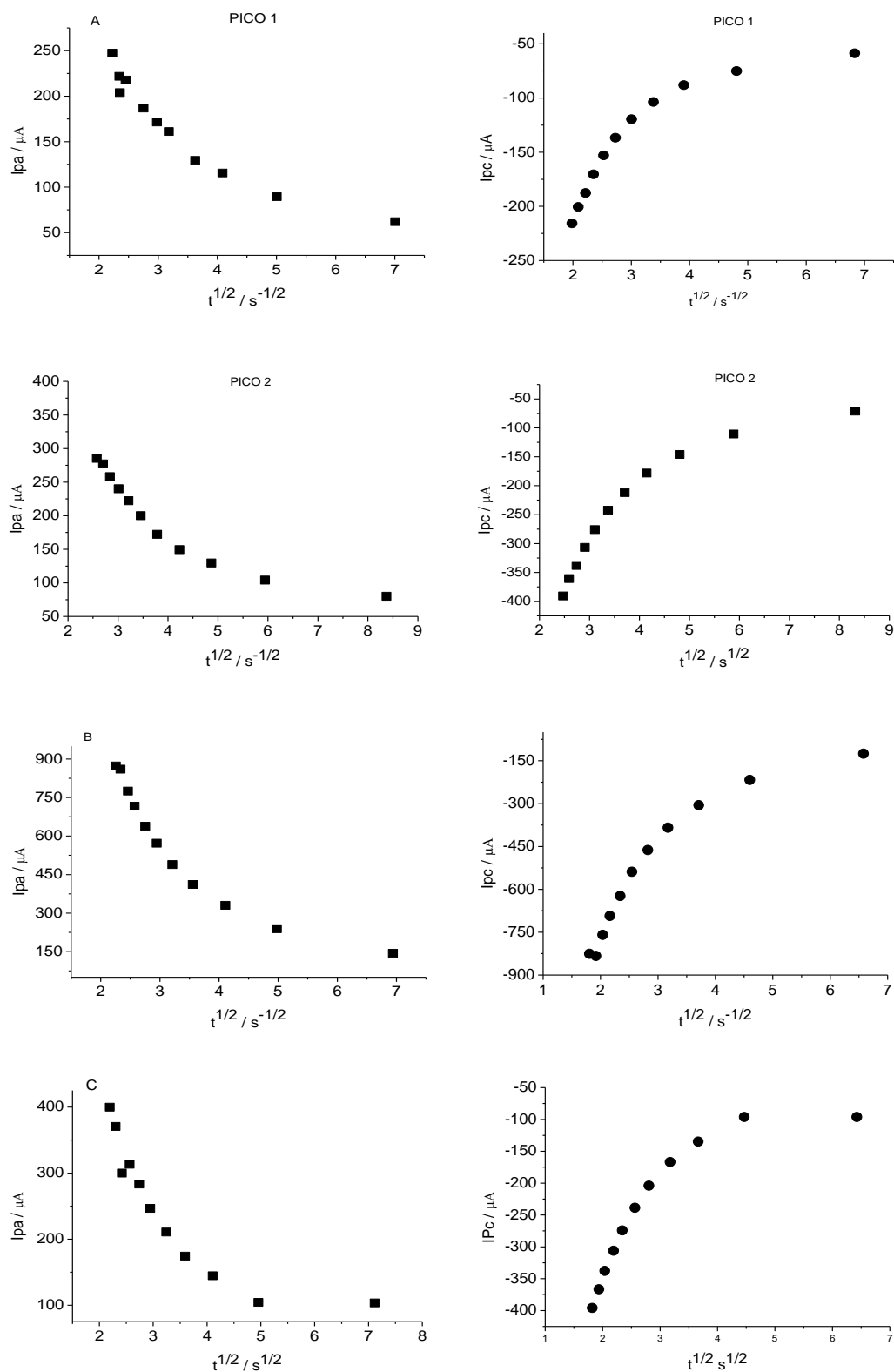


Figura 44: I_p vs. $t^{1/2}$ em solução de $HClO_4$ 0,50 mol.L⁻¹ para eletrodos de grafite modificados com (A) POLI(2-HFA), (B) POLI(3-HFA) e (C) POLI(4-HFA).

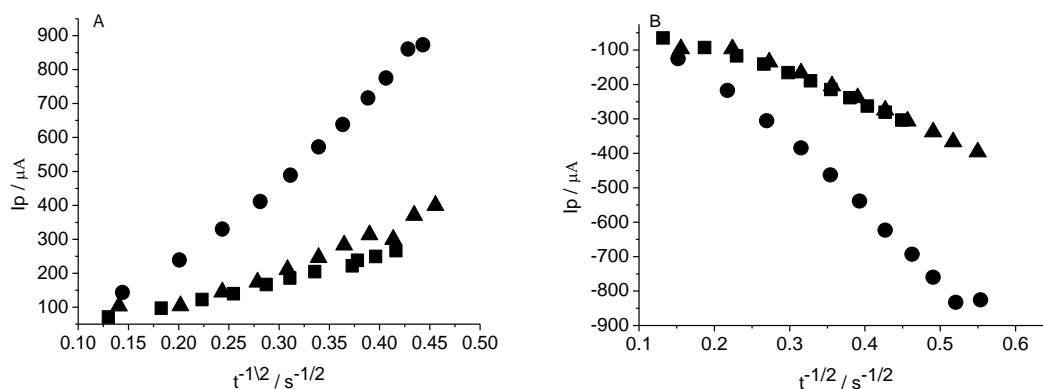


Figura 45: I_p vs. $t^{-1/2}$ em solução de HClO_4 $0,50 \text{ mol.L}^{-1}$ para eletrodos de grafite modificados com (■) POLI(2-HFA), (●) POLI(3-HFA) e (▲) POLI(4-HFA). (A) Oxidação dos polímeros e (B) redução dos polímeros.

4.1.5 – Relação massa e carga dos ácidos poli-hidroxifenilacéticos

A carga consumida para oxidar e reduzir os respectivos filmes poliméricos pode ser calculada pela Equação 12:

Equação 12:

$$Q = i t$$

onde Q é a carga elétrica em Coulombs (C), i é a corrente elétrica em Amperes (A) e t é o tempo em segundos (s).

O tempo para cada ciclagem é obtido dividindo a janela de potencial pela velocidade de varredura, ou seja, para varrer uma janela de potencial de 0,0 a 1,2 V retornando a 0 V a 50 mVs^{-1} são necessários 48 s, em que 24 s são para oxidação e 24 s para redução do material. A Tabela 6 mostra as massas dos polímeros adsorvidos nos eletrodos de grafite com a respectiva incerteza de medida e também as cargas elétricas totais utilizadas para oxidar e reduzir estes materiais, calculadas a partir da integração dos voltamogramas disponíveis na Figura 35 [corrente ($\mu\text{A} \times 10^{-6}$) versus potencial (V) /

velocidade de varredura (Vs^{-1})). Calculando o coeficiente de variação^m para os valores resultantes da relação entre massa de polímero formado e adsorvido pela quantidade de carga necessária para oxidar e reduzir os ácidos poli-hidroxifenilacéticos, obtemos 0,0003%, indicando que estatisticamente a mesma quantidade de elétrons está envolvida nos processos redox destes três polímeros.



Tabela 6: Massa e carga do POLI(2-HFA), POLI(3-HFA) e POLI(4-HFA) eletrodepositados sobre eletrodos de grafite.

	Massa (mg)	Carga (mC)	Massa / Carga (mg / mC)
POLI(2-HFA)	0,24 ± 0,01	7,0	0,034
POLI(3-HFA)	0,21 ± 0,01	6,8	0,031
POLI(4-HFA)	0,15 ± 0,01	4,6	0,033

Isto pode ser afirmado, por que estes resultados estão coerentes com a Lei de Faraday em que, a massa da substância eletrodepositada deve ser diretamente proporcional à quantidade de carga que atravessa a matriz polimérica imersa em um meio eletrolítico, conforme a Equação 13.

Equação 13:

$$m = K Q$$

Onde m é a massa eletrodepositada em gramas (g), K é a constante de proporcionalidade e Q é a carga elétrica em Coulombs (C).

A carga Q também pode ser calculada pela Equação 14.

Equação 14:

$$Q = n e^- N_A$$

^m É uma medida de dispersão muito empregada para estimar a precisão de experimentos. É obtido dividindo o desvio padrão pela média e pode ser expresso em percentual. Comumente citado como relative standard deviation (RSD) em inglês.

onde n é o número de elétrons transferidos, e^- é a carga elementar do elétron equivalente a $-1,6 \times 10^{-19}$ C e N_A é a constante de Avogadro equivalente a aproximadamente $6,02214129 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$.



A Equação 13 aplicada aos três sistemas mostrou uma K constante (Tabela 6), assegurando por eletroquímica fundamental, conforme equação Equação 14 que o mesmo número de elétrons está envolvido nos processos redox das três plataformas, como era esperado, já que por serem isômeros, estes polímeros devem ter estruturas semelhantes. Portanto, é provável que também tenham mecanismos de oxidação e redução também semelhantes, ambos discutidos posteriormente nos itens 4.1.10 e 4.1.11.

4.1.6 – Influência dos pares redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ e $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+}$ no comportamento eletroquímico dos filmes derivados de ácidos polihidroxifenilacéticos

A modificação dos EG com filmes eletroativos derivados dos ácidos hidroxifenilacéticos promovem uma alteração nas respostas eletroquímicas dos respectivos eletrodos. De fato, vários grupos de pesquisas vêm funcionalizando eletrodos com polímeros condutores e não condutores, buscando novas aplicações principalmente nas áreas de catálise e sensoriamento, usualmente, adicionando nanopartículas. Informações importantes das propriedades elétricas e estruturais destes sistemas podem ser obtidas através das avaliações de transferência eletrônica das reações redox de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ no complexo ferrocianeto/ferricianeto de potássio ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ / $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) ou $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+}$ no complexo de cloreto de hexaaminrutênio ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$), ambos como sondas negativa ou positiva, respectivamente.^{213,216-226}

As propriedades cinéticas de transporte ou troca iônica dos filmes poliméricos, derivados dos ácidos hidroxifenilacéticos, foram investigadas por voltametria cíclica que é capaz de avaliar a difusão das espécies redox contidas nas soluções aquosas de ferrocianeto/ferricianeto de potássio (sonda aniônica) ou cloreto de hexaaminrutênio (II) (sonda catiônica).

A Figura 46A, mostra os voltamogramas cíclicos dos eletrodos de grafite e grafite modificados com os poli(ácidos hidroxifenilacéticos), em solução aquosa de ferrocianeto/ferricianeto de potássio.

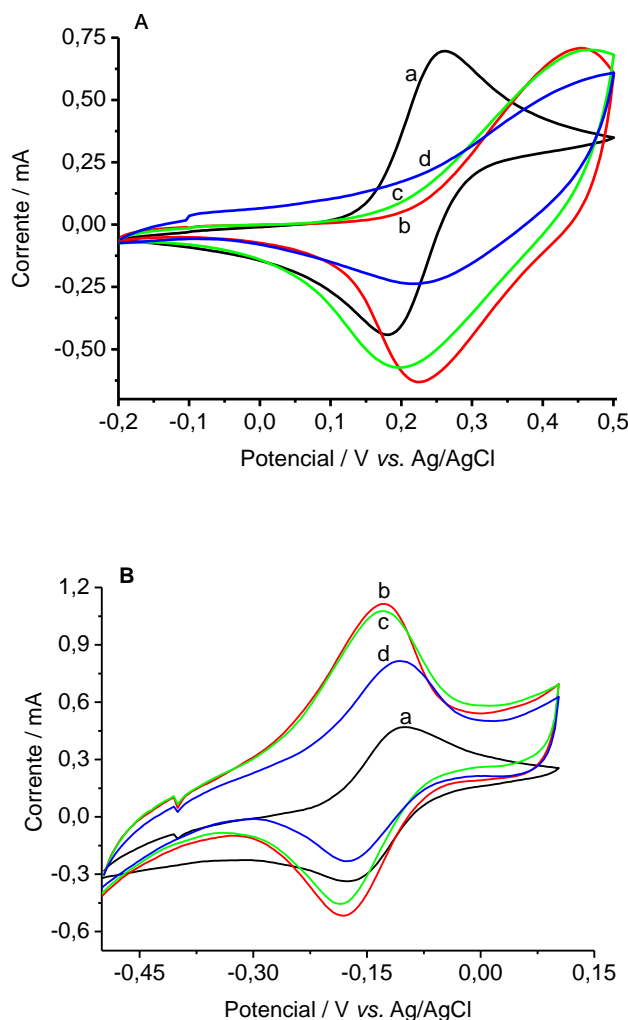


Figura 46: Voltamogramas cíclicos obtidos para medidas das propriedades de troca aniônica do eletrodo de grafite (a) e eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA)(b), POLI(3-HFA)(c) e POLI(4-HFA) (d) em solução aquosa de (A) 5,0 mmol.L⁻¹ de K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆ contendo KCl 0,10 mol.L⁻¹ e (B) 5,0 mol.L⁻¹ de Ru(NH₃)₆Cl₂ contendo KCl 0,10 mol.L⁻¹ a 100 mV s⁻¹.

A Figura 46A, curva a ($\Delta E = 78$ mV) tem um comportamento semelhante ao perfil de controle requerido mostrado na Figura 31A, indicando que o processo de transferência eletrônica do par redox é controlado por difusão. As diferenças de potencial de oxidação e redução para os EG/POLI(2-HFA) ($\Delta E = 230$ mV), EG/POLI(3-HFA) ($\Delta E = 269$ mV) e EG/POLI(4-HFA) ($\Delta E > 391$ mV), mostraram que

a modificação compromete a cinética de transferência eletrônica das espécies $\text{Fe(CN)}_6^{4-}/\text{Fe(CN)}_6^{3-}$.



Em concordância com estes resultados, podemos avaliar também apenas os potenciais de oxidação, em que se observa nitidamente na Figura 46A, curvas b, c e d um aumento destes em relação à Figura 45A, curva a, o que também indica que os eletrodos após terem suas superfícies revestidas com POLI(2-HFA), POLI(3-HFA) e POLI(4-HFA) dificultam o transporte iônico da sonda aniônica em concordância com estudo realizado por Oliveira e colaboradores.¹⁰⁰ Este fato não é exclusivamente associado à diminuição da área superficial do grafite em função da deposição do material polimérico, mas também a uma característica intrínseca desta classe de polímeros, conforme podemos observar na sequência o comportamento dos mesmos frente à sonda redox positiva.

A Figura 46B, curvas b, c e d que mostram uma diminuição do potencial de oxidação e aumento das correntes de oxidação em relação à Figura 46B, curva a. Isso indica que as alterações ocorridas na superfície dos eletrodos, após a eletropolimerização do 2-HFA, 3-HFA e 4-HFA, facilitam o transporte iônico da sonda catiônica. De fato, os pares redox da Figura 45B referem-se à oxidação do par $\text{Ru(NH}_3)_6^{2+/3+}$ com consequente redução do par $\text{Ru(NH}_3)_6^{3+/2+}$.

O EG ($\Delta E = 73$ mV) e os EG/POLI(2-HFA) ($\Delta E = 54$ mV), EG/POLI(3-HFA) ($\Delta E = 59$ mV) e EG/POLI(4-HFA) ($\Delta E = 68$ mV), mostram que a modificação potencializa a cinética de transferência eletrônica catiônica, pois as espécies $\text{Ru(NH}_3)_6^{3+/2+}$ podem estar adsorvidas. O que pode ser evidenciado também no decréscimo dos valores de ΔE da ordem de 19, 14 e 5 mV após as modificações em relação ao EG com POLI(2-HFA), POLI(3-HFA) e POLI(4-HFA), respectivamente. Isso sugere uma condutividade crescente da matriz polimérica na ordem POLI(4-HFA) < POLI(3-HFA) < POLI(2-HFA) em concordância com os resultados de troca iônica na sonda negativa.

A natureza das interações eletrostáticas entre os poli(ácidos hidroxifenilacéticos) e as sondas redox, pode fornecer informações importantes sobre a própria estrutura do material polimérico. Estes estudos de troca iônica em pH neutro evidenciam que os filmes derivados das eletropolimerizações dos ácidos hidroxifenilacéticos apresentam características aniônicas, repelindo eletrostaticamente os íons de mesma carga e atraindo eletrostaticamente os íons de carga contrária, ou seja, os íons catiônicos. Observa-se concordância entre as investigações aniônicas e catiônicas (Figuras 46A e

46B) em relação aos valores de potenciais e correntes de pico e seus respectivos perfis voltamétricos, em que POLI(2-HFA) e POLI(3-HFA) apresentam similaridades e ambos discrepantes do POLI(4-HFA) que tem perfil voltamétrico mais próximo do EG não modificado. Podemos inferir que estruturalmente, o esqueleto dos filmes de POLI(2-HFA) e POLI(3-HFA) são mais parecidos entre si em relação ao esqueleto do POLI(4-HFA), sendo a conformação tridimensional dos oligômeros que originam esses polímeros, investigadas por modelagem molecular, discutidas no item 4.1.10. Potenciais mais catódicos e maiores valores de corrente nos indicam os materiais que mais facilitam a troca iônica das sondas negativa e positiva, em ordem decrescente seria POLI(4-HFA) < POLI(3-HFA) < POLI(2-HFA) em concordância com os espectros de impedância discutidos no item 4.1.7.

Avaliando quantitativamente notamos que os perfis voltamétricos da sonda catiônica na Figura 46B mostram que a resposta eletroquímica do EG não modificado (curva a) mais próxima da curva d, em comparação com as curvas c e b, cerca de duas e três ordens de grandeza, respectivamente, sendo que este fato, além do aspecto estrutural mencionado anteriormente, pode estar, também, associado a uma menor quantidade de massa depositada de POLI(4-HFA) que necessita apenas de 65% da carga elétrica necessária para oxidar e reduzir o POLI(2-HFA) e POLI(3-HFA), conforme discutido no item 4.1.5.

4.1.7 – Estudos de propriedades elétricas dos filmes poliméricos por espectroscopia de impedância eletroquímica

O comportamento das propriedades elétricas diferenciadas do POLI(4-HFA) em relação ao POLI(2-HFA) e POLI(3-HFA) foram melhor explorados por estudos de EIE, cujos resultados em forma de Diagrama de Nyquist para o EG e EG/POLI(2-HFA), EG/POLI(3-HFA) e EG/4-HFA são mostrados na Figura 46. No plano complexo os gráficos mostram que para o EG, Figura 47A, um circuito de Randles $R_s(Q_{dl}[R_{ct}W_1])$ pode ser utilizado para simular os dados experimentais. No entanto, para os eletrodos modificados, foi necessário uma mudança do circuito para melhorar o ajuste da fitagem aos resultados experimentais, isto fica evidente avaliando os gráficos de Bode disponíveis na Figura 48 em que para o EG verifica-se uma única constante de tempo, ao contrário dos eletrodos modificados em que surgem duas constantes de tempo.

Os espectros de impedância para os três isômeros eletrodepositados sobre o EG foram simulados pelo circuito equivalente representado por $R_s(Q_{dl1}[R_{ct1}W_1])(R_{ct2}Q_{dl2})$. Os parâmetros representados entre parênteses são aplicados aos elementos associados em paralelo e entre colchetes aos elementos associados em série conforme Figura 49.

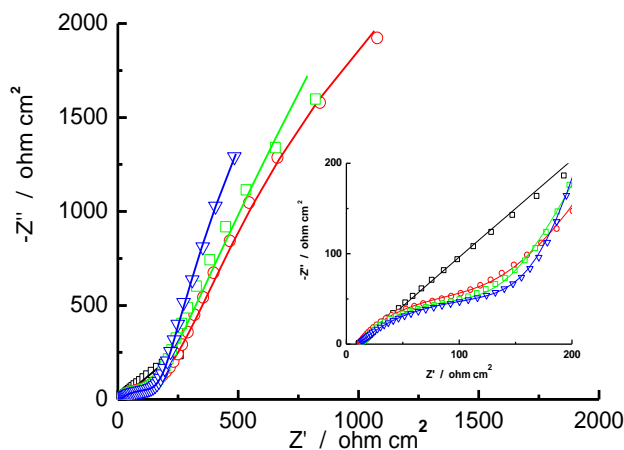


Figura 47: Diagramas Nyquist (Z'' vs. Z') em KCl 0,1 mol.L⁻¹ contendo K₃[Fe(CN)]₆ / K₄[Fe(CN)]₆ 5 mmol.L⁻¹ do eletrodo de grafite (-□-) e dos eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA) (-○-), POLI(3-HFA) (-□-) e POLI(4-HFA) (-△-). $E_{pa} = 0,24$ V; Amplitude 10 mV; Intervalo de Frequência: 10⁶ a 10⁻² Hz. As linhas sólidas representam o ajuste dos dados experimentais a um circuito equivalente.

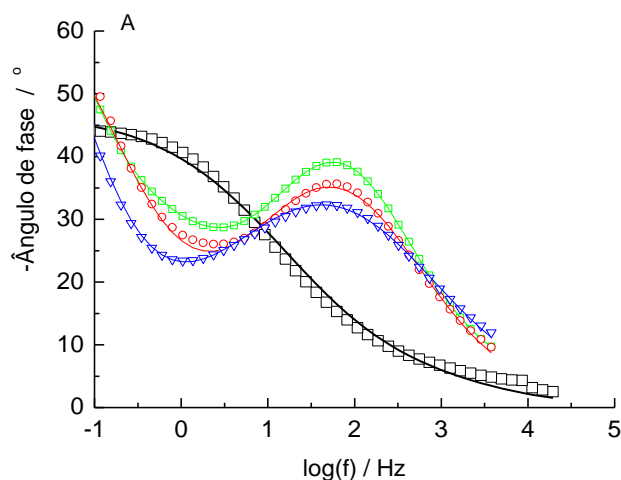


Figura 48: Diagramas de Bode (log f vs. ângulo de fase) dos espectros de impedância eletroquímica do eletrodo de grafite (-□-) e dos eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA) (-○-), POLI(3-HFA) (-□-) e POLI(4-HFA) (-△-). $E_{pa} = 0,24$ V; Amplitude 10 mV; Intervalo de Frequência: 10⁶ a 10⁻² Hz. As linhas sólidas representam o ajuste dos dados experimentais a um circuito equivalente.

O uso de dois circuitos para os EG modificados sugerem que o primeiro conjunto $[(R_{ct,1}W)Q_{dl,1}]$ descreve a área superficial externa do filme enquanto que o segundo $(R_{ct,2}Q_{dl,2})$ descreva a resposta da área superficial próxima ao grafite, ou seja, mais interna. Neste estudo enfocaremos apenas a área externa dos polímeros, ou seja, a interface destes polímeros com o eletrólito.

Os resultados da simulação dos dados experimentais são apresentados na Tabela 7. Os circuitos apresentaram razoáveis valores de chi-quadrado (χ^2), na ordem de 10^{-2} e 10^{-3} , apoiando um baixo erro estatístico na simulação dos dados experimentais. A análise dos parâmetros mostram que os valores de capacitância da dupla camada ($Q_{dl}/mF.cm^{-2}$) estão relativamente próximos entre EG e EG/POLI(4-HFA) e também entre EG/POLI(2-HFA) e EG/POLI(3-HFA), indicando que o grafite é recoberto por menos camadas de POLI(4-HFA), todavia possivelmente por mais camadas de POLI(2-HFA) e POLI(3-HFA).

Os valores de resistência à transferência de carga ($R_{ct}/\Omega.cm^2$) mostraram-se aproximadamente 25 e 22 % mais altos para o POLI(4-HFA) em relação ao POLI(2-HFA) e POLI(3-HFA), respectivamente.

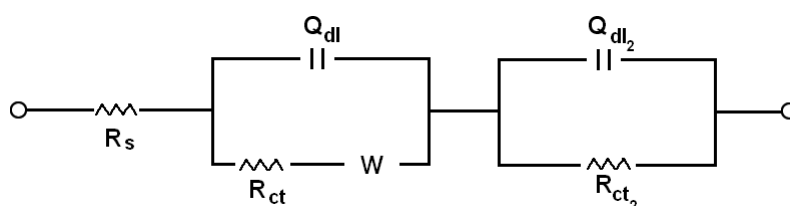


Figura 49: Circuito equivalente proposto para simulação dos dados experimentais dos eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA), POLI(3-HFA) e POLI(4-HFA).

Tabela 7: Parâmetros obtidos, a partir dos resultados de simulação de espectroscopia de impedância eletroquímica para os eletrodos de grafite e eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA), POLI(3-HFA) e POLI(4-HFA).

	GRAFITE	POLI(2-HFA)	POLI(3-HFA)	POLI(4-HFA)
$R_s / \Omega cm^2$	10,73	11,08	12,67	11,04
$Q_{dl}/ mF cm^{-2}$	1,82	0,42	0,54	0,98
$R_{ct}/ \Omega cm^2$	3,73	124,2	128,2	163,3
n	0,62	0,70	0,66	0,56
$\chi^2 / (x 10^{-3})$	29,1	8,5	25,4	2,8

Isto pode ser observado visualmente nos diagramas de Nyquist, precisamente nas regiões de alta frequência o semicírculo aumentou o diâmetro no POLI(4-HFA) em relação ao POLI(2-HFA) e POLI(3-HFA). Os valores mais elevados de Q_{dl} e R_{ct} para o POLI(4-HFA) podem ser associados a quantidade de material e sua respectiva resistividade, ou seja, podemos assumir que as modificações proporcionadas nas eletropolimerizações do 2-HFA e 3-HFA são mais expressivas proporcionando maiores quantidades dos polímeros POLI(2-HFA) e POLI(3-HFA) intrinsecamente mais condutivos, já discutidas no item 4.1.5, todavia as eletropolimerizações do 4-HFA geram uma menor quantidade de polímero POLI(4-HFA) intrinsecamente menos condutivo, em uma escala de condutividade em ordem decrescente teríamos POLI(4-HFA) < POLI(3-HFA) ~ POLI(2-HFA), estando de acordo com os resultados já discutidos no item 4.1.6 e que serão discutidos no item 4.1.9. Os valores de capacitância da dupla camada maiores e de impedância total menores do POLI(4-HFA) em relação ao POLI(2-HFA) e POLI(3-HFA) podem estar associados a contribuição do EG mais exposto após a eletropolimerização do POLI(4-HFA).



4.1.8 – Estudo eletroquímico da estabilidade dos filmes derivados dos ácidos hidroxifenilacéticos

A estabilidade eletroquímica dos filmes derivados de ácidos hidroxifenilacéticos tem um importante papel para aplicação em biossensores e também para investigar outras futuras aplicações destes materiais. A atividade eletroquímica foi verificada por 100 ciclos consecutivos de varredura de potencial entre +0,20 a +0,80 V em velocidade de varredura de 30 mV s^{-1} , com o mesmo eletrólito utilizado na eletropolimerização. Pela integral dos voltamogramas obtidos, verificamos a carga necessária para oxidar e reduzir os filmes poliméricos na superfície do EG, ou seja, as cargas armazenadas nos filmes foram determinadas para cada ciclo.

A Figura 50 mostra a diminuição da carga relativa (Q_r) em função do aumento do número de ciclos de potencial realizados. Esta perda relativa foi determinada a partir da carga obtida pela integração dos voltamogramas, dada pela relação apresentada na Equação 15:

Equação 15:



$$Q_r = 100 - \left(\frac{Q_1 - Q_n}{Q_1} \times 100 \right)$$

onde: Q_r é a carga voltamétrica relativa obtida do filme eletrogerado em %, Q_1 é a carga obtida após a eletropolimerização e Q_n é a carga obtida após n ciclos de potencial.

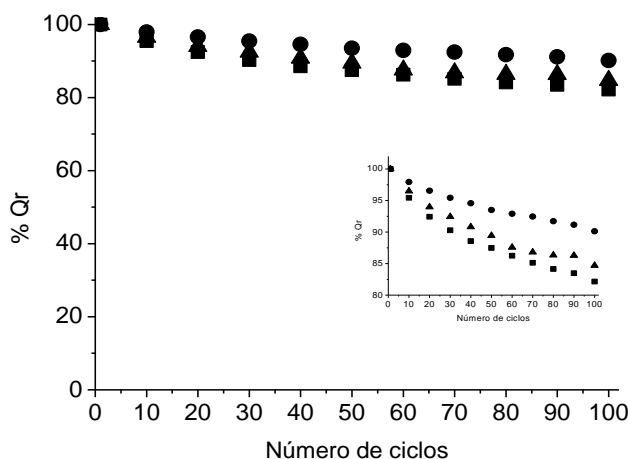


Figura 50: Porcentagem de carga relativa dos eletrodos de grafite modificados com (■) POLI(2-HFA), (●) POLI(3-HFA) e (▲) POLI(4-HFA) em HClO_4 0,50 mol.L⁻¹ a 30 mV s⁻¹.

É observada uma perda de carga elétrica para os três polímeros em função da diminuição da corrente com aumento de ciclagens. Esta diminuição da resposta eletroquímica pode estar relacionada com a diminuição da extensão de conjugação da nuvem π de elétrons do polímero, bem como com o transporte de íons e solvente no interior da malha polimérica, uma vez que os potenciais de pico permaneceram inalterados ao longo das ciclagens e a baixas velocidades a troca iônica é mais uniforme.

Uma comparação direta nos mostra uma ordem crescente de perda de carga: POLI(3-HFA) < POLI(4-HFA) < POLI(2-HFA), ou seja, o material mais estável após as sucessivas ciclagens é o POLI(3-HFA) conforme mostrado na Figura 50 em que esse material atinge um patamar entre os ciclos de número 40 a 80. Ainda, após cem ciclagens notamos perdas de carga de aproximadamente 18, 10 e 16% para o POLI(2-HFA), POLI(3-HFA) e POLI(4-HFA), respectivamente. Estudos de estabilidade mostraram que a matriz EG/POLI(3-HFA) foi a mais estável entre as estudadas, retendo

mais de 90% de sua capacidade de troca de carga em experimentos de stress eletroquímico de sucessivas ciclagens de potencial, sendo a estabilidade uma das propriedades indispensáveis de matrizes para aplicações sensoriais.⁵⁴



4.1.9 – Estudos morfológicos dos polímeros derivados dos ácidos hidroxifenilacéticos

A Figura 51 mostra as imagens de AFM para o EG e EG modificado com ácidos poli-hidroxifenilacéticos. Visualmente podemos notar que a superfície do EG (Figura 51A) apresenta um maior número de vales e picos em relação às superfícies modificadas após a eletropolimerização, todavia a superfície do EG/POLI(4-HFA) (Figura 51D) parece estar menos alterada após a deposição dos filmes poliméricos, ao contrário do EG/POLI(2-HFA) e EG/POLI(3-HFA) (Figuras 51B e 51C). O POLI(2-HFA) parece se acomodar melhor nos vales do EG tornando a superfície mais regular, ao contrário do POLI(3-HFA) e POLI(4-HFA), sendo que este aspecto pode ter relação direta com suas respectivas estruturas tridimensionais discutida no item 4.1.10.

A análise dos parâmetros topográficos Sa^n , Sq^o e Sdq^p disponíveis na Tabela 8 estão de acordo com os aspectos visuais observados na Figura 51.

O EG tem uma superfície irregular e porosa, mas a sua rugosidade é reduzida após a eletrodeposição dos filmes poliméricos derivados dos ácidos hidroxifenilacéticos, em ordem crescente EG/POLI(4-HFA) << EG/POLI(3-HFA) < EG/POLI(2-HFA), inversamente a quantidade de material formado, em ordem decrescente POLI(2-HFA) > POLI(3-HFA) >> POLI(4-HFA), conforme mostrado no item 4.1.5.

Os dados estatísticos de AFM indicam que as eletropolimerizações do 2-HFA e 3-HFA modificam mais acentuadamente a superfície do EG que tem a sua rugosidade diminuída em aproximadamente 78% e 67%. Já a eletropolimerização do 4-HFA modifica menos a superfície do EG em relação aos seus isômeros, pois a rugosidade do EG é diminuída em apenas 30%, sendo esses resultados concordantes com as massas

ⁿSa - média aritmética das alturas da superfície a partir de um plano médio.

^oSq - desvio médio quadrático da rugosidade superficial.

^p Sdq - parâmetro topográfico híbrido capaz de informar o valor do desvio quadrático médio para a inclinação da superfície.

eletrodepositadas e com as cargas elétricas calculadas pela integração das áreas voltamétricas da Figura 36 necessárias para oxidar e reduzir os respectivos polímeros discutidos no item 4.1.5.

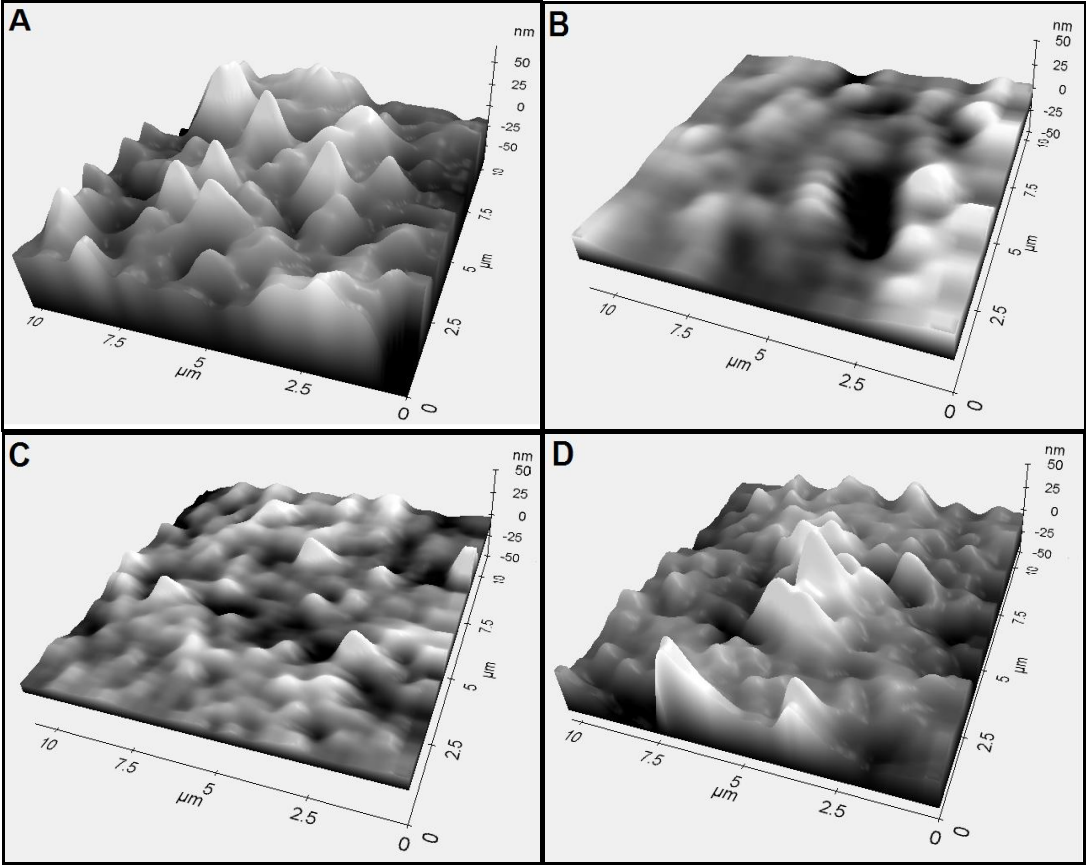


Figura 51: Imagens de microscopia de força atômica do eletrodo de grafite (A) e eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA) (B), POLI(3-HFA) (C) e POLI(4-HFA) (D).

Tabela 8: Parâmetros topográficos estatísticos do eletrodo de grafite e dos eletrodos de grafite modificados com ácidos poli-hidroxifenilacéticos.

	Sa (nm)	Sq (nm)	Sdq (um)
EG	19,11 ± 0,20	24,31 ± 0,51	0,089 ± 0,011
POLI(2-HFA)	4,33 ± 0,12	5,78 ± 0,21	0,024 ± 0,012
POLI(3-HFA)	6,33 ± 0,13	7,92 ± 0,08	0,037 ± 0,012
POLI(4-HFA)	13,13 ± 0,11	17,20 ± 0,30	0,072 ± 0,010

A Figura 52 mostra os espectros de FTIR para os monômeros e seus respectivos polímeros. Uma banda em 1170-1050 cm^{-1} não encontrada nos espectros dos monômeros, surge nos espectros dos polímeros relativa à deformação axial assimétrica de C-O-C característica de éteres difenílicos.

Deformações axiais de C=C de anéis aromáticos em 1399 cm^{-1} estão evidentes em todos espectros indicando que a aromaticidade nos polímeros é preservada. Nos espectros dos monômeros a banda em aproximadamente 1700 cm^{-1} caracteriza o grupo carbonila de ácido carboxílico. Essa banda aparece com intensidade fraca nos espectros dos polímeros, indicando que o grupo acetil está disponível nos filmes adsorvidos nos EG. Uma banda larga e intensa correspondente a deformação axial da ligação O-H entre 2600 e 3700 cm^{-1} está disponível nos espectros de todos os polímeros. Estas observações estão concordantes com os espectros já reportados na literatura^{227,99} e indicam que independentemente do isômero de partida, nessa classe de polímeros eletrossintetizados é comum à presença de ligações $-\text{[R-O-R]}_n-$, indicando que a ampliação das cadeias poliméricas ocorre preferencialmente por grupos éteres.

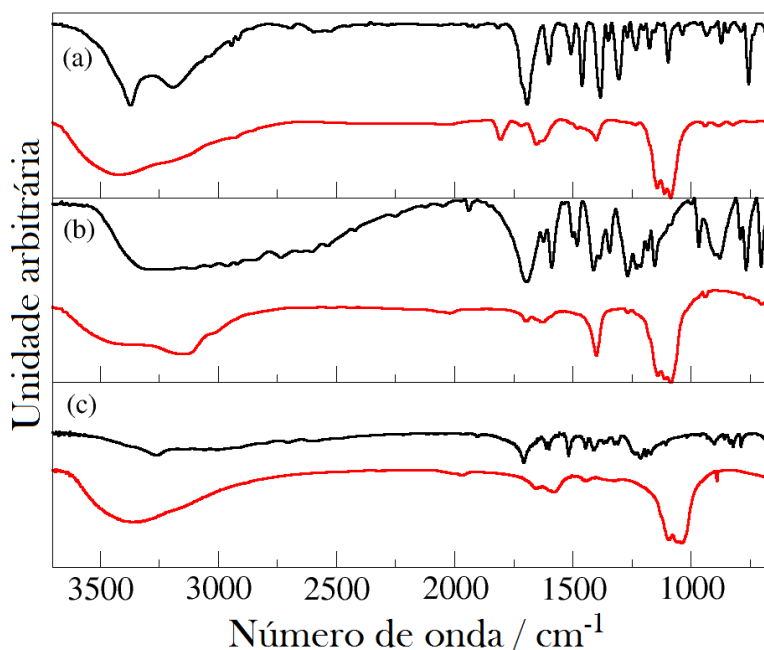


Figura 52: Espectros de FTIR obtidos em pastilhas de KBr para os isômeros do ácido hidroxifenilacético (—) e seus respectivos polímeros (—), com vinte ciclos consecutivos e resolução de 4 cm^{-1} , sendo (a) 2HFA e POLI(2-HFA) e (b) 3HFA e POLI(3-HFA) e (c) 4HFA e POLI(4-HFA).

Estudos teóricos baseados nos dados espectroscópicos descritos acima foram realizados com intuito de ampliar a investigação estrutural dessa classe de polímeros.



As discussões a seguir referem-se a O7 como o oxigênio fenólico sendo que os demais carbonos seguem a numeração IUPAC conforme Figura 53. A Tabela 9 mostra as densidades de spins atômicos calculados pelo método de Mulliken para os cátions radicais (CR) e radicais livres (R) do 2-HFA, 3-HFA e 4-HFA. Apenas densidades com valores superiores a 0,10 são apresentadas.

Os valores de densidade de spin próximos de 0 e 0,5 indicam probabilidades de elétrons emparelhados e desemparelhados, respectivamente. A Tabela 9 mostra que as probabilidades indicadas de encontrarmos elétrons desemparelhados não são apenas sobre os oxigênios fenólicos, mas também sobre determinados átomos de carbonos aromáticos, são bons indicativos dos sítios reativos para os emparelhamentos radiculares envolvidos em cada eletropolimerização.

Os cátions radicais (CR) ou radicais livres (R) possíveis de serem formados na superfície dos eletrodos de grafite durante a eletrossíntese devem-se emparelhar de uma forma geral onde podemos considerar o oxigênio fenólico (O7) como a “cabeça” dos monômeros radiculares. Estes se ligam aos carbonos aromáticos dos respectivos cátions radicais ou radicais, em que a posição preferencial de ataque do (O7), nestes carbonos, é imprescindível para determinar a estrutura tridimensional destas macromoléculas. Para proposta mecanística destas eletropolimerizações torna-se necessário saber quais carbonos aromáticos estão envolvidos no crescimento da cadeia polimérica. Nesta discussão procurar correlações entre a química orgânica e a físico-química ajuda-nos significativamente. Ou seja, quais os carbonos do anel aromático têm elétrons disponíveis para emparelhamento através das possíveis estruturas de ressonância dos cátions radicais (Figura 53) e seus respectivos spins disponíveis na Tabela 9.

Os valores de densidade de spin observados sobre C1 são devido à sua ligação com o grupo acético em que deve ocorrer a reconstituição da aromaticidade dos anéis, durante a formação de cada filme polimérico. Todavia a possibilidade da posição C1 estar relacionada com o crescimento da cadeia é descartada, uma vez que o mesmo não pode ser sítio reativo devido ao impedimento estérico provocado pelo volumoso grupo acetato. As estruturas de ressonância do 2-HFA-CR (Figura 53), mostram possibilidades para o elétron desemparelhado estar sobre os carbonos aromáticos das posições 2, 3 e 5, concordantes com os valores de densidade de spin, todavia o emparelhamento de elétrons no C2 é pouco provável uma vez que o mesmo está impedido espacialmente

por estar ligado na hidroxila, resultando então nas posições C3 e C5 às maiores possibilidades de emparelhamento de elétrons cujos valores de densidade de spin são 0,19 e 0,43, respectivamente.

Tabela 9: Densidades de spin atômicas Mulliken para os ácidos hidroxifenilacéticos usados como monômeros de partida nas eletropolimerizações.

Espécies Intermediárias	Densidades de Spin						
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	O7
2-HFA-CR	0,21	0,15	0,19	-	0,43	-	0,25
2-HFA-R	0,30	-	0,26	-	0,39	-	0,36
3-HFA-CR	-	-	0,23	0,18	-	0,46	0,18
3-HFA-R	0,13	0,22	-	0,22	-	0,27	0,62
4-HFA-CR	0,38	-	0,34	-	0,34	-	0,15
4-HFA-R	0,43	-	0,34	-	0,34	-	0,41

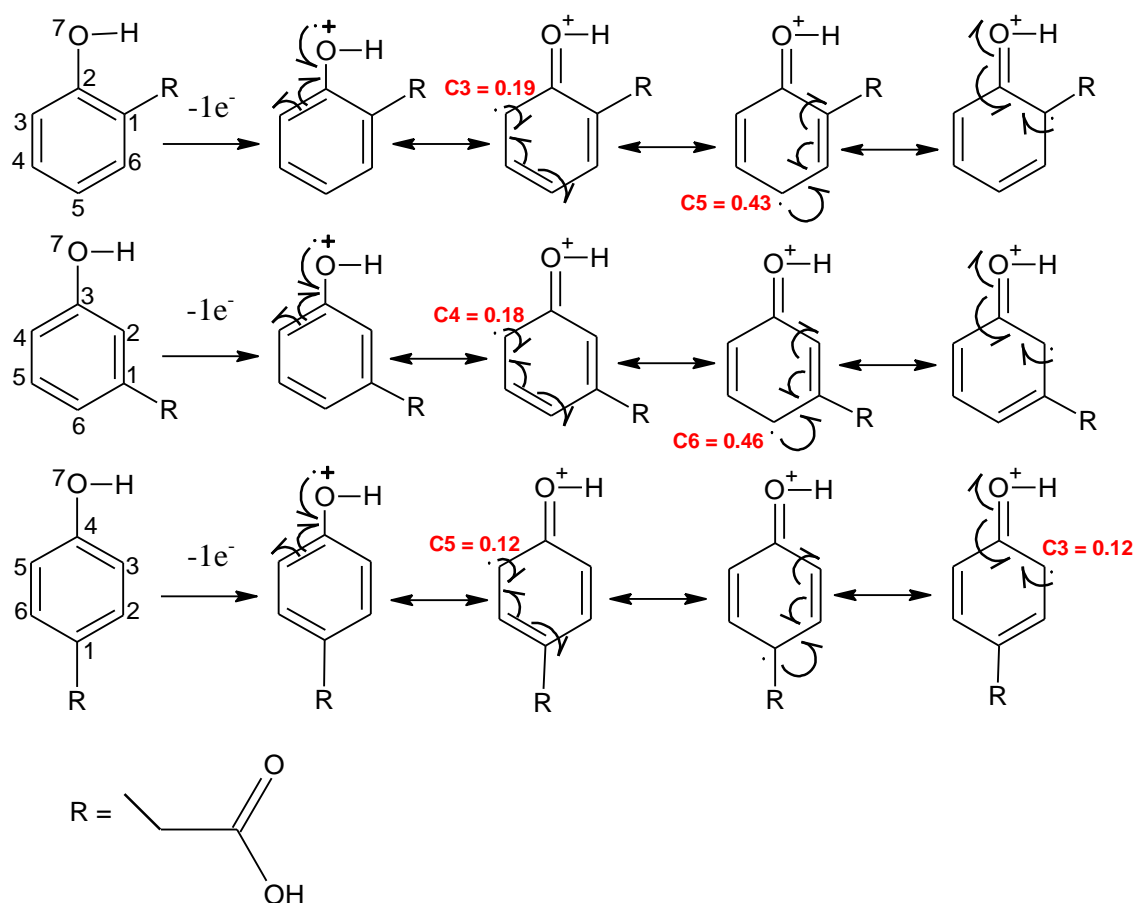


Figura 53: Estruturas de ressonância para os cátions radicais do 2-HFA, 3-HFA e 4-HFA.

O emparelhamento do 2-HFA-CR com outro cátion radical ou radical ou com um monômero neutro para formar o POLI(2-HFA) pelo C3 originaria uma estrutura poli-aril-éter com uma organização simétrica evidente de seus monômeros, empilhados por interações π entre os anéis aromáticos e ligações de hidrogênio consecutivas entre os grupos acéticos, projetados para o exterior da cadeia poli-aril-éter. Interessante, é ressaltar que a energia interna livre calculada para estes decâmeros de POLI(2-HFA) é de 675 KJ/mol, ou seja, um pouco menor que a do decâmero formado pelo C5 que foi de 1078 KJ/mol, em qualquer nível de cálculo, embora nesta última posição tenhamos uma maior densidade de spin.

As estruturas de ressonância do 3-HFA-CR mostram possibilidades para o elétron desemparelhado estar sobre os carbonos aromáticos das posições 2, 3, 4 e 6, também concordantes com os valores de densidade de spin.

Todavia os emparelhamentos de elétrons no C2 e C3 são menos prováveis, pois inviabilizariam o retorno da aromaticidade e ainda estão mais impedidos espacialmente, o C2 por estar localizado entre ambos os substituintes e o C3 por estar ligado na hidroxila, restando então às possibilidades mais prováveis de emparelhamento pelo C4 e C6, cujas densidades de spin são 0,18 e 0,46, e as energias interna livre de 967 KJ/mol e 495 KJ/mol, respectivamente.

As estruturas de ressonância do 4-HFA-CR mostram possibilidades para o elétron desemparelhado estar sobre os carbonos aromáticos das posições 3, 4 e 5, concordantes com os valores de densidade de spin, todavia C4 está mais impedido espacialmente em relação ao C3 e C5, por estar ligado na hidroxila, restam então às possibilidades de emparelhamento pelo C3 e C5, cujas densidades de spin para ambos é 0,34, confirmando a simetria da molécula estabelecendo uma única possibilidade de estrutura tridimensional semelhante com a politiramina,³⁹ cujo cátion-radical ou radical pode se ligar aos átomos de carbono na posição orto em relação à hidroxila (C3 ou C5), neste caso, adquirindo uma conformação que favorece as ligações de hidrogênio entre os grupos acéticos num arranjo mais desordenado, levando a um caráter mais passivante do POLI(4-HFA), em relação aos POLI(2-HFA) e POLI(3-HFA).

A resistência a transferência dos espectros de impedância (Figuras 47 e 48), vem corroborar com esta conclusão, uma vez que o maior ordenamento no crescimento do polímero (linear ou helicoidal), proporciona uma maior condutibilidade elétrica, indicadas por uma menor resistência a transferência de carga para o POLI(2-HFA) e POLI(3-HFA) em relação ao POLI(4-HFA), mostradas na Tabela 7.

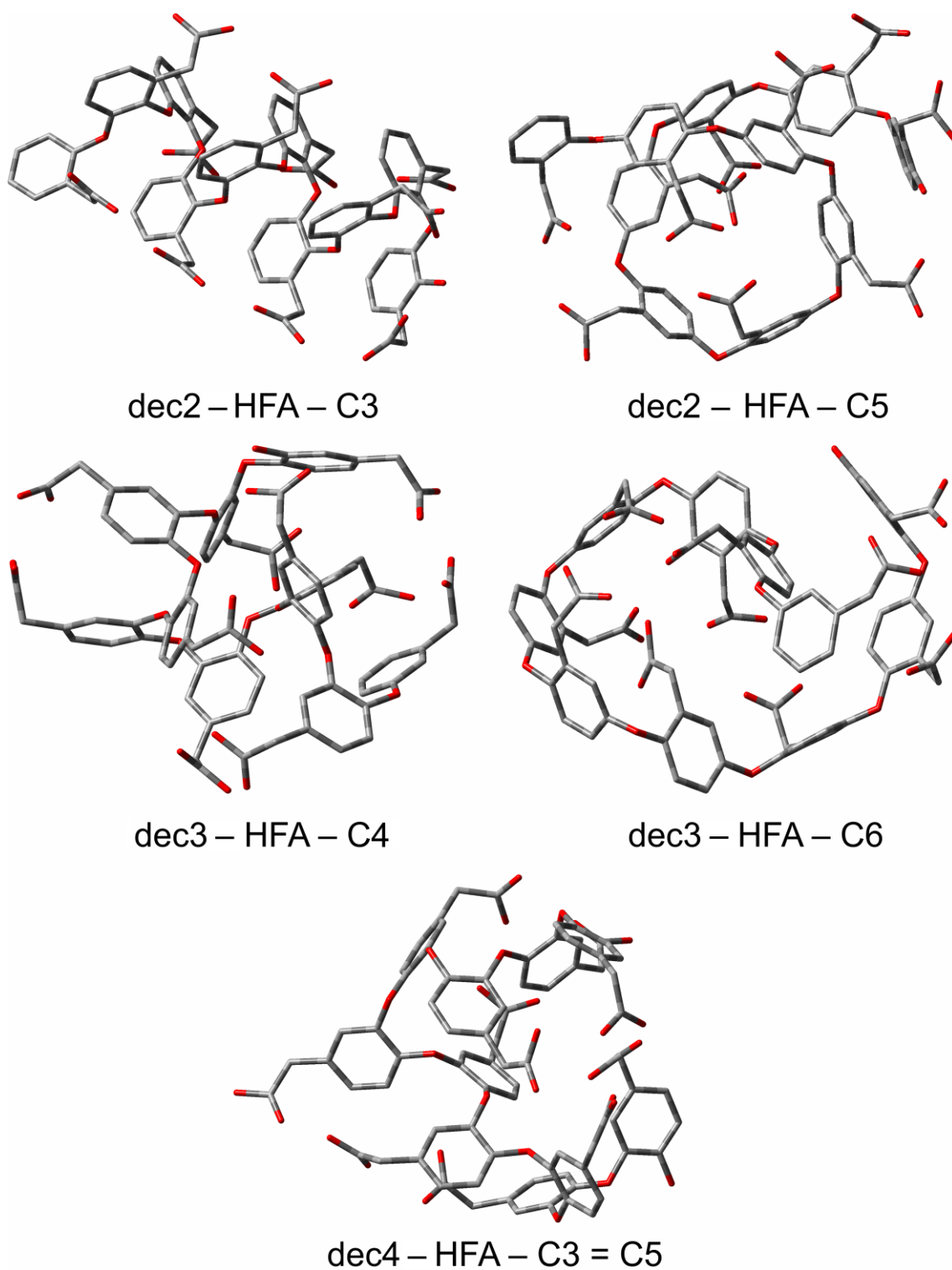


Figura 54: Decâmeros otimizados dos ácidos hidroxifenilacéticos por DFT através da obtenção das estruturas conformacionais de mínimos globais de energias pelo método de Monte Carlo. dec2-HFA (A), dec3-HFA (B) e dec4-HFA (C).

Estes resultados apresentam boa concordância entre os aspectos orgânicos e físico-químicos teóricos, ou seja, o crescimento da cadeia POLI(2-HFA) via C3 e/ou C4, POLI(3-HFA) via C4 e/ou C6 e POLI(4-HFA) via C3=C5 sugerem a formação de polímeros com algumas semelhanças e algumas diferenças, cujos decâmeros modelados por DFT são mostrados na Figura 54.

A diferença de energia dos decâmeros é muito pequena para discriminar as posições C3 e/ou C4 no POLI(2-HFA) e C4 e/ou C6 e POLI(3-HFA). De fato, para discriminação destas posições, precisaríamos de diferenças consideráveis de energia, de 2 a 10 ordens de grandezas. Em síntese, uma análise das caracterizações eletroquímicas e morfológicas associadas aos estudos teóricos, demonstram que a eletropolimerização do POLI(2-HFA) deve ocorrer preferencialmente pelo C5, que possui uma maior densidade de spin, promovendo a formação de uma estrutura helicoidal. Todavia, a eletropolimerização via C3 formando uma macromolécula mais linear e mais condutora, pode ocorrer possivelmente em uma menor escala.

A eletropolimerização do POLI(3-HFA) deve ocorrer preferencialmente pelo C6, originando uma estrutura polimérica helicoidal muito semelhante a do POLI(2-HFA). Essa semelhança estrutural explica as semelhanças obtidas entre os dois polímeros observadas principalmente na caracterização eletroquímica. A outra possibilidade para eletropolimerização do POLI(3-HFA) pelo C4 também pode ocorrer, mas é menos provável, pois tem uma menor densidade de spin neste. Ainda, a eletropolimerização do POLI(3-HFA) via C4 proporcionaria uma estrutura mais caótica e menos condutora que deveria ser semelhante a do POLI(4-HFA) cujas propriedades eletroquímicas e morfológicas são muito discrepantes do POLI(2-HFA) e POLI(3-HFA).

4.1.11 – Mecanismos propostos para eletropolimerizações dos ácidos hidroxifenilacéticos

O mecanismo de eletropolimerização, de maneira geral, pode envolver um misto de etapas eletroquímicas e químicas, sendo que a primeira delas é a iniciação promovida pela aplicação de um potencial positivo gerando uma oxidação eletroquímica dos monômeros conforme discutido no item 4.1.2. Sabemos que o cátion radical ou radical formado é energeticamente muito instável, sendo possível que os acoplamentos monoméricos ocorram instantaneamente, logo após a formação das espécies

intermediárias. Nesse sentido, visando ampliar a investigação foram realizados experimentos de VOQ e VC, sucessivamente, cujos voltamogramas são mostrados na Figura 55.



Verifica-se na primeira varredura da Figura 55A, que o pico de oxidação em 1,04 V referente à oxidação do 2-HFA, embora seja uma VOQ seu potencial de oxidação característico permanece inalterado em relação ao que observamos na primeira ciclagem de VC para a formação do POLI(2-HFA) evidenciado na Figura 32A. Imediatamente após esta varredura, aplicou-se novamente outra VOQ, todavia iniciando em 0,3 V quando é observado que antes de atingirmos novamente o potencial de pico de oxidação do monômero surgem dois picos característicos do POLI(2-HFA) (ver Figura 33B) nos potenciais aproximados de 0,49 V e 0,67 V (segunda varredura da Figura 55), ou seja, após a oxidação em 1,04 V ocorre a nucleação através dos cátions radicais ou radicais e a consecutiva propagação promovendo o crescimento da cadeia polimérica neste potencial.

Para confirmação em outro EG, após a oxidação do monômero por VOQ foi realizada uma VC apenas em HClO_4 (aq) entre os potenciais de 0 V e 1,2 V cujo voltamograma está disponível no inserto da Figura 55.

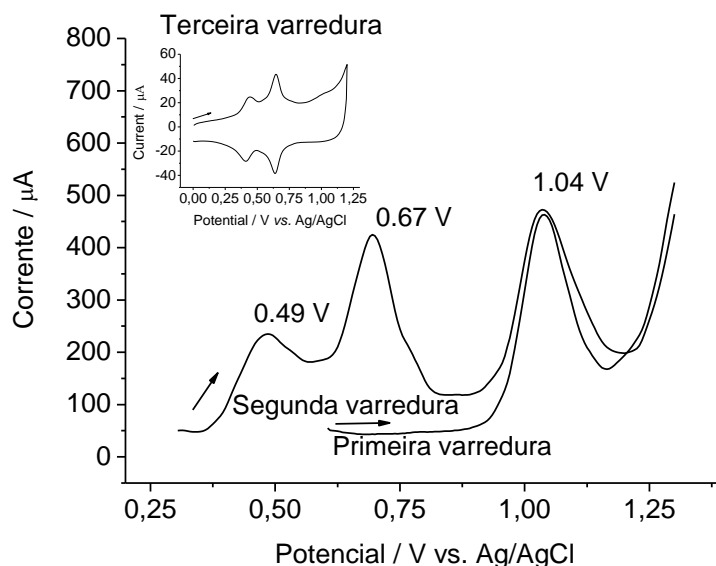


Figura 55: Voltamograma de onda quadrada: Primeira e segunda varredura do 2-HFA em EG.

Voltametria cíclica: Terceira varredura do 2-HFA eletropolimerizado em EG. Parâmetros:

VOQ (Amplitude: 0,02 V, Incremento: 0,005 V, Frequência: 30 Hz) e VC ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$).

Eletrólito suporte: HClO_4 0,5 mol. L^{-1} contendo 2,5 mmol. L^{-1} de 2-HFA (não adicionado na terceira varredura).

Os sinais característicos do POLI(2-HFA) eletroativo são evidenciados, pelo surgimento de seus dois pares redox bem definidos e característicos identificados durante a sua respectiva eletropolimerização (ver Figura 33A) e consecutiva resposta em $\text{HClO}_{4(\text{aq})}$, após modificação (ver Figura 36, curva b), comprova que após nuclear e crescer em torno de 1,04 V o material polimérico fica adsorvido no EG. Os baixos valores de correntes em torno de 20 a 40 μA do inserto da Figura 55, em relação aos 350 a 450 μA (ver Figura 36, curva b) diz respeito ao número de camadas, certamente o voltamograma do inserto da Figura 55 representa um material com poucas camadas de POLI(2-HFA), enquanto que o voltamograma da Figura 36, curva b, provavelmente, representa um material com várias camadas de POLI(2-HFA) em função dos 100 ciclos de potencial para crescimento, como evidenciados na Figura 33A.

A proposta de um mecanismo de eletropolimerização requer o conhecimento prévio do número de elétrons envolvidos na oxidação dos monômeros.

Técnicas como a VC podem ser empregadas para esta finalidade, todavia a voltametria de onda quadrada (VOQ) é mais adequada para sistemas totalmente irreversíveis.²²⁸⁻²³⁰ Nesses sistemas costuma-se observar apenas o pico catódico ou anódico, conforme observado na Figura 33, o crescimento de todos os filmes poliméricos derivados dos ácidos hidroxifenilacéticos mostraram a ausência de pico catódico, para os respectivos monômeros.

Figura 56 mostra os voltamogramas de onda quadrada para a oxidação dos três isômeros derivados dos ácidos hidroxifenilacéticos nos potenciais entre 0,8 e 1,2 V em diferentes frequências de aplicação de pulso.

Também, na Figura 56, é possível observar a relação entre as correntes de pico e as respectivas frequências aplicadas, já que outra característica dos processos redox irreversíveis diz respeito à relação linear existente entre as correntes e suas respectivas frequências, como podemos comprovar. Este comportamento ocorre para os três isômeros, ou seja, a ausência dos picos redox catódico para os monômeros e a linearidade entre as frequências de aplicação de pulso e as correntes de pico nos garantem que a oxidação monomérica dos derivados dos ácidos hidroxifenilacéticos são processos oxidativos irreversíveis, cujos produtos desta oxidação são o POLI(2-HFA), POLI(3-HFA) e POLI(4-HFA) adsorvidos no EG, todavia isso não tem qualquer consequência sobre o processo de oxidação monomérica, já que ela é totalmente irreversível.

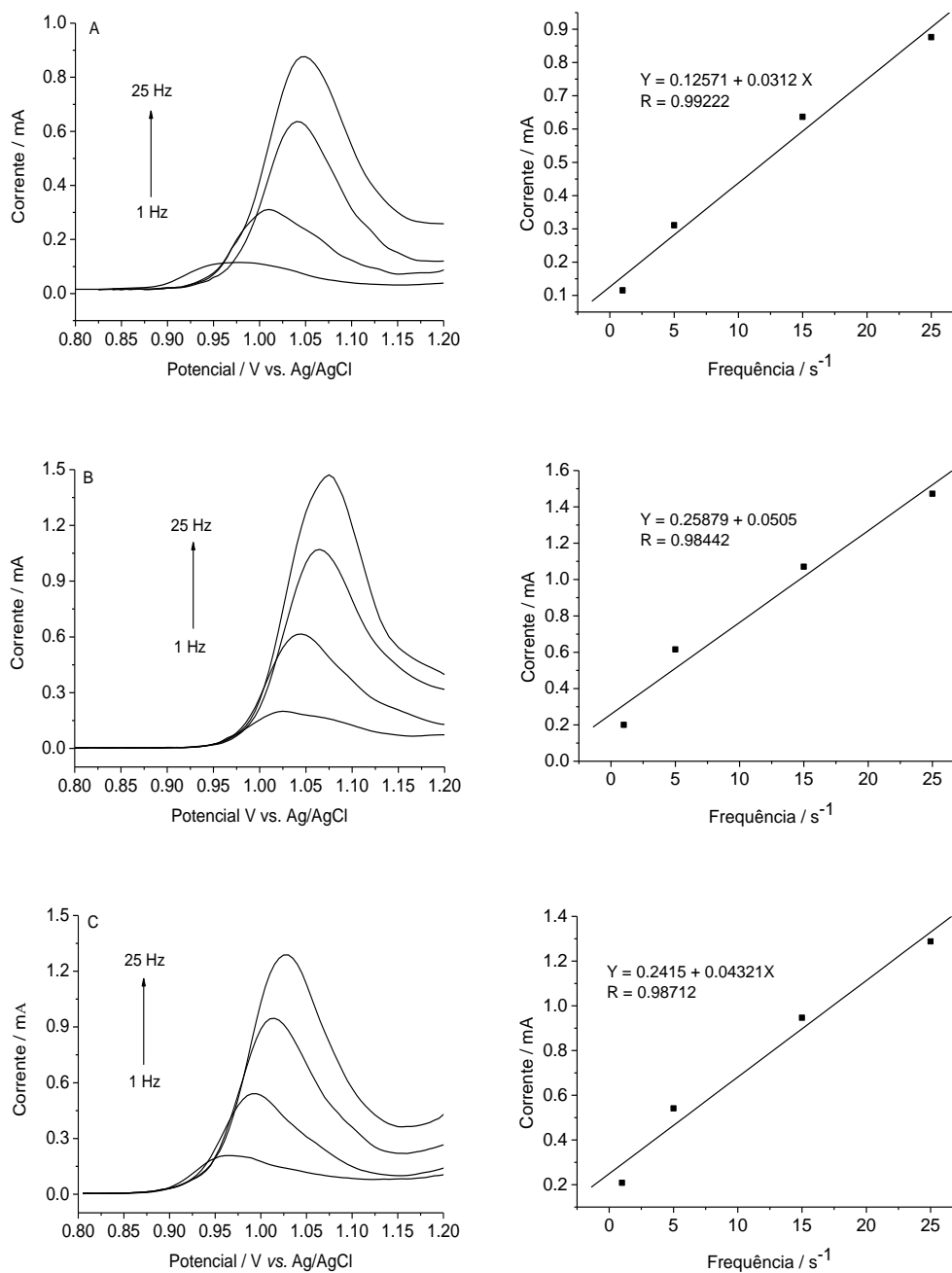


Figura 56: À esquerda, voltamogramas de onda quadrada para oxidação de 2-HFA (A), 3-HFA (B) e 4-HFA (C). Amplitude: 0,02 V, Incremento: 0,005 V, Frequência: 1, 5, 15 e 25 Hz, Eletrólito suporte: $HClO_4$ 0,5 mol. L^{-1} contendo 2,5 mmol. L^{-1} de 2-HFA, 3-HFA e 4-HFA ($v = 50$ mV s^{-1} , Eletrólito suporte de $HClO_4$ 0,5 mol. L^{-1}). À direita, parâmetros de regressão linear da curva I_p vs. f .

Para calcularmos o número de elétrons envolvidos na oxidação anódica de cada monômero usou-se a Equação 16.

Equação 16:

$$\Delta \frac{Ep}{\log f} = \pm \frac{2,3RT}{2n\alpha F}$$

onde: Ep é o potencial de pico, f frequência, R é a constante dos gases ideais, T é a temperatura, n é o número de elétrons, α é o coeficiente de transferência eletrônica e F é a constante de Faraday.^{229,230}

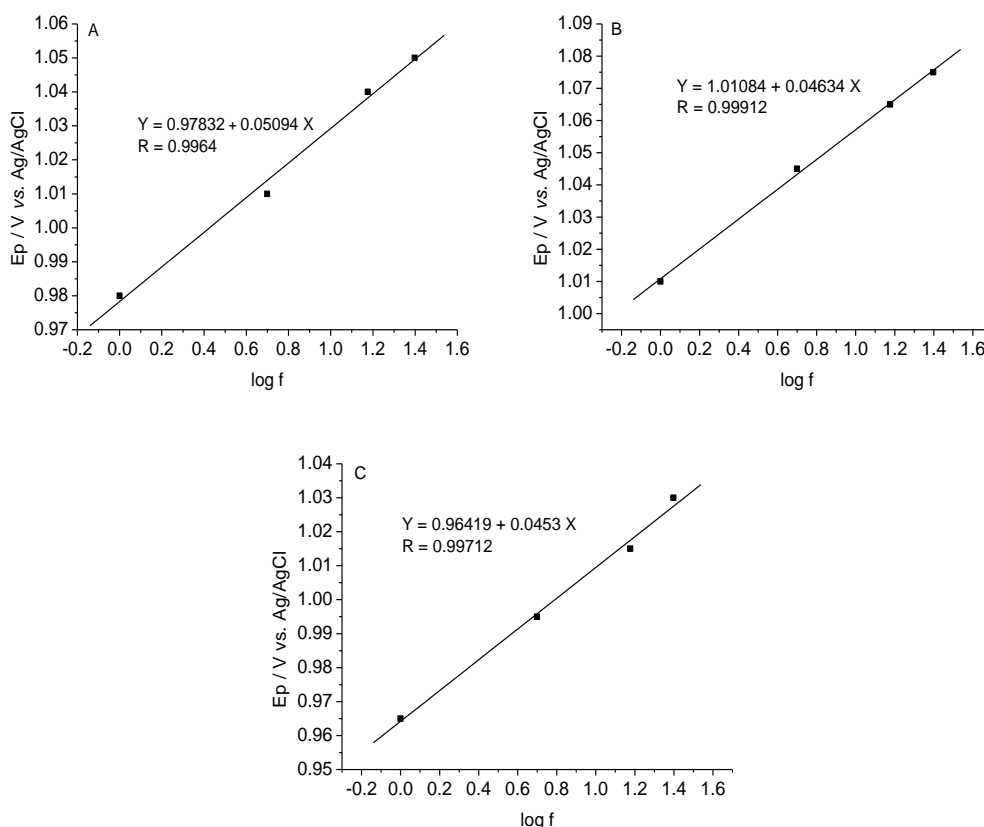


Figura 57: Parâmetros de regressão linear da curva Ep vs. $\log f$ obtidos dos voltamogramas de onda quadrada para (A) 2-HFA, (B) 3-HFA e (C) 4-HFA. Amplitude: 0,02 V, Incremento: 0,005 V, Frequências: 1, 5, 15 e 25 Hz, Eletrólito suporte: HClO_4 0,5 mol.L⁻¹ contendo 2,5 mmol.L⁻¹ de 2-HFA, 3-HFA e 4-HFA.

O quociente à esquerda da igualdade pode ser obtido pela tangente da reta Ep vs. $\log f$ e o quociente à direita da igualdade pode ser resumido em $\pm 0,0295 / n\alpha$ para $R = 8,314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$, $T = 298,15 \text{ K}$ e $F = 96485,3399 \text{ C}$. O sinal positivo ou negativo está relacionado com a inclinação durante a oxidação e redução, respectivamente. A Figura 57 mostra as relações entre Ep e $\log f$ obtidas para a oxidação dos monômeros 2-HFA,

3-HFA e 4-HFA, respectivamente, por VOQ em diferentes frequências, extraídas da Figura 56.

Aplicando os coeficientes angulares na Equação 16, obtemos que $n = 1$, ou seja, os ácidos hidroxifenilacéticos perdem um elétron na oxidação anódica por unidade monomérica, conforme ilustrado na Figura 53, com um coeficiente de transferência eletrônica (α) de 0,58, 0,64 e 0,65, respectivamente, para o 2-HFA, 3-HFA e 4-HFA. O valor maior de α para o 4-HFA está concordante com o menor potencial de oxidação necessário para oxidá-lo conforme discutido no item 4.1.2.

A perda de um elétron nos monômeros gera os cátions radicais que se acoplam formando os dímeros, que são possivelmente reoxidados e encontram mais espécies de cátions radicais ampliando para trímeros e sucessivamente promovendo o crescimento da cadeia polimérica através de acoplamentos radicalares, semelhante ao proposto por Benyoucef e colaboradores.²¹⁴

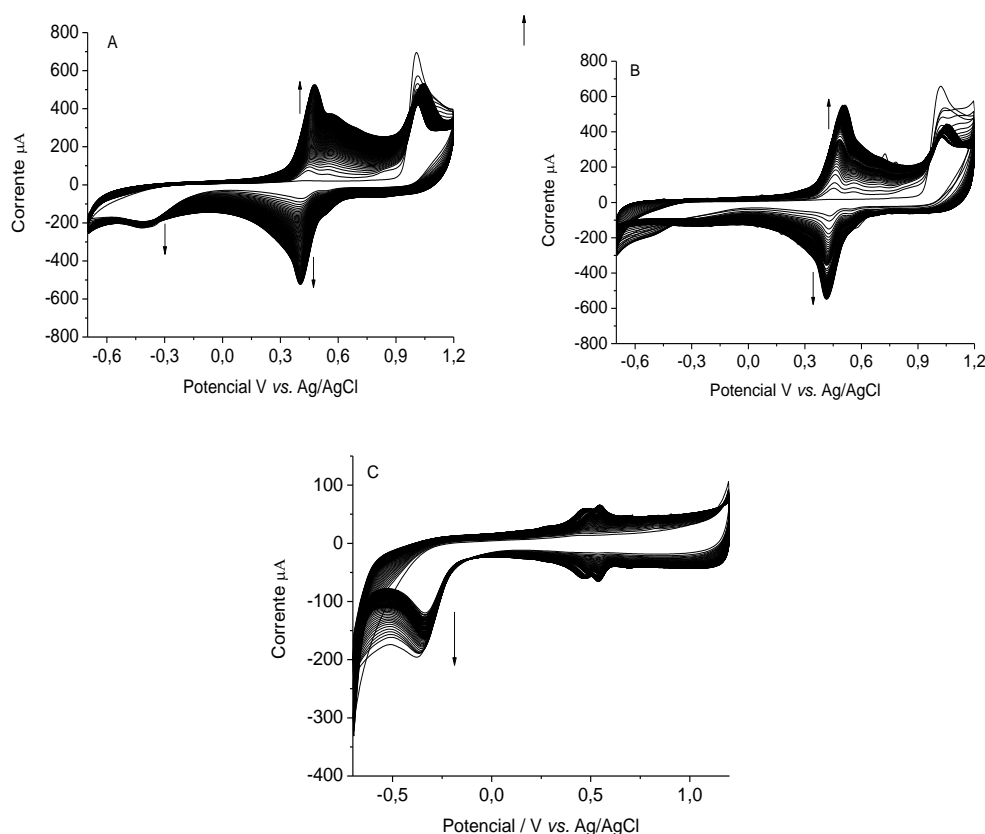


Figura 58: Voltamogramas de eletropolimerização de 2,5 mmol.L⁻¹ de 3-HFA em presença de: (A) oxigênio molecular, (B) nitrogênio molecular e (C) oxigênio molecular na ausência de 3-HFA em HClO₄ 0,5 mol. L⁻¹ a $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

A saída de mais um elétron do cátion radical levaria a formação de um cátion, sendo que essa hipótese é descartada, pois além de encontrarmos pelos experimentos de VOQ apenas a perda provável de um único elétron. Estudos envolvendo o borbulhamento de oxigênio molecular no núcleo reacional (Figura 58), demonstraram inibir inicialmente a polimerização do POLI(3-HFA), como é comum em reações que envolvem emparelhamento de elétrons (Figura 59). Não ocorreria a inibição se houvesse a formação de cátions.

A Figura 58 mostra os voltamogramas obtidos para eletropolimerização do 3-HFA em atmosferas de oxigênio molecular (Figura 58A) e de nitrogênio molecular (Figura 58B).

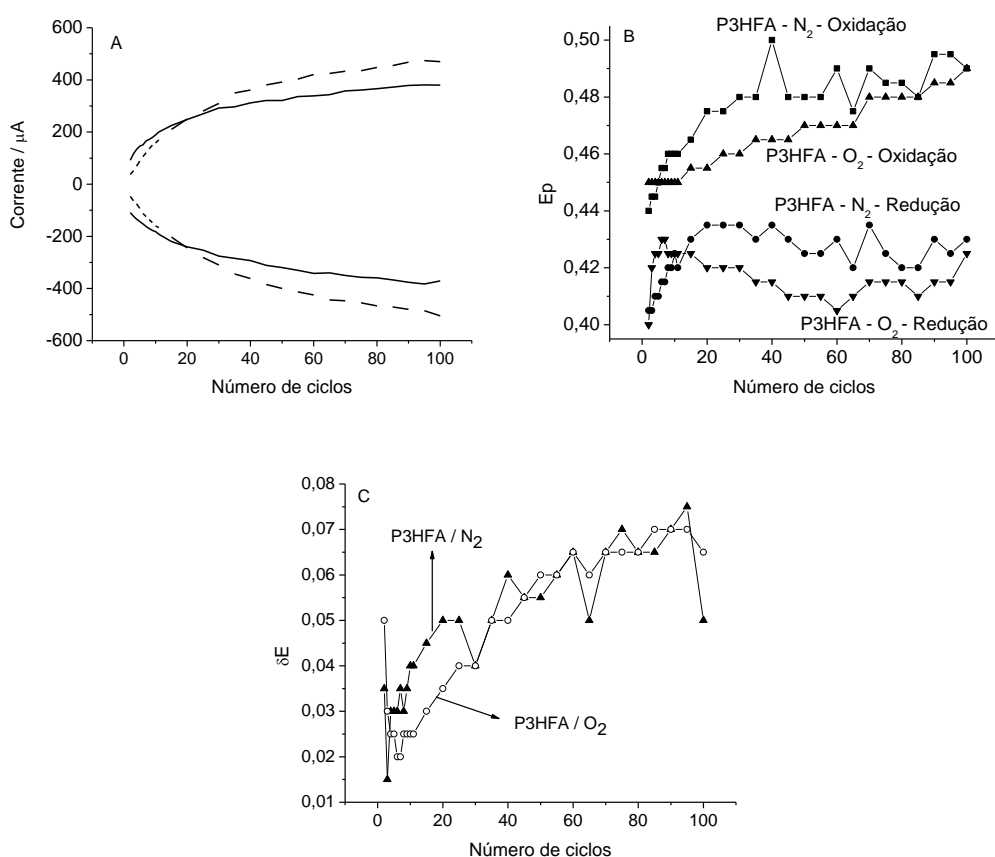


Figura 59: (A) I_p vs. número de ciclos na eletrossíntese do POLI(3-HFA) na presença de oxigênio molecular (---) e nitrogênio molecular (—). (B) E_p vs. número de ciclos para o POLI(3-HFA) na presença de oxigênio molecular (-▲-) oxidação e (-▼-) redução; na presença de nitrogênio molecular (-■-) oxidação e (-●-) redução. (C) δE vs. número de ciclos na eletrossíntese do POLI(3-HFA) na presença de oxigênio molecular (-○-) e nitrogênio molecular (-▲-).

A diferença mais notória diz respeito a uma onda observada em -0,34 V relativa à redução de oxigênio em meio ácido. Foi possível, também, observar esta onda em -0,34 V, no voltamograma da Figura 58C, quando é adicionado oxigênio molecular no eletrólito suporte de HClO_4 (aq), na ausência de monômero.

A Figura 59A mostra os valores de corrente de pico para oxidação e redução do POLI(3-HFA) após os sucessivos ciclos voltamétricos. Observamos que até o vigésimo ciclo as correntes de POLI(3-HFA), em meio de nitrogênio molecular são superiores as correntes do POLI(3-HFA) em meio de oxigênio molecular, o que demonstra, claramente que, enquanto esse oxigênio não é consumido ocorre interferência considerável na eletropolimerização. Concluindo que, não ocorre ataque nucleofílico do oxigênio fenólico sobre cátions e sim, acoplamento de cátions radicais ou radicais, entre si.

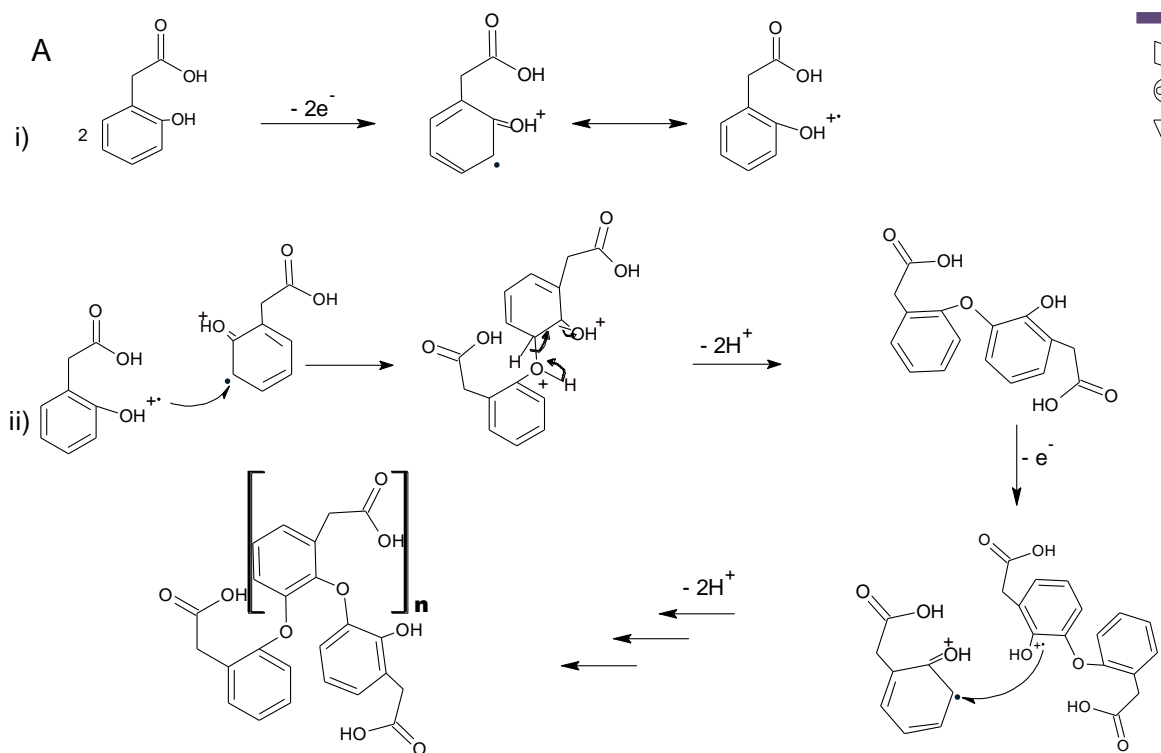
A Figura 59B mostra que os valores de potencial de pico para oxidação e redução do POLI(3-HFA), após as sucessivas ciclagens. Podemos perceber que até o vigésimo ciclo, o POLI(3-HFA) eletropolimerizado em meio contendo oxigênio molecular oxida e reduz em potenciais mais elevados do que o POLI(3-HFA), eletropolimerizado em nitrogênio molecular, todavia após o ciclo 20 ocorre uma inversão. A Figura 59C mostra a variação de potencial de oxidação e redução em função do número de ciclos, onde percebemos que até o ciclo 20 o POLI(3-HFA) em oxigênio molecular mostra-se mais reversível do que o POLI(3-HFA) eletropolimerizado em nitrogênio molecular, todavia após o ciclo 20 ocorre uma inversão.

Estudos de pKas dos monômeros antes e após a perda de um elétron foram realizados por ciclos termodinâmicos teóricos, sendo seus valores disponibilizados na Tabela 10.

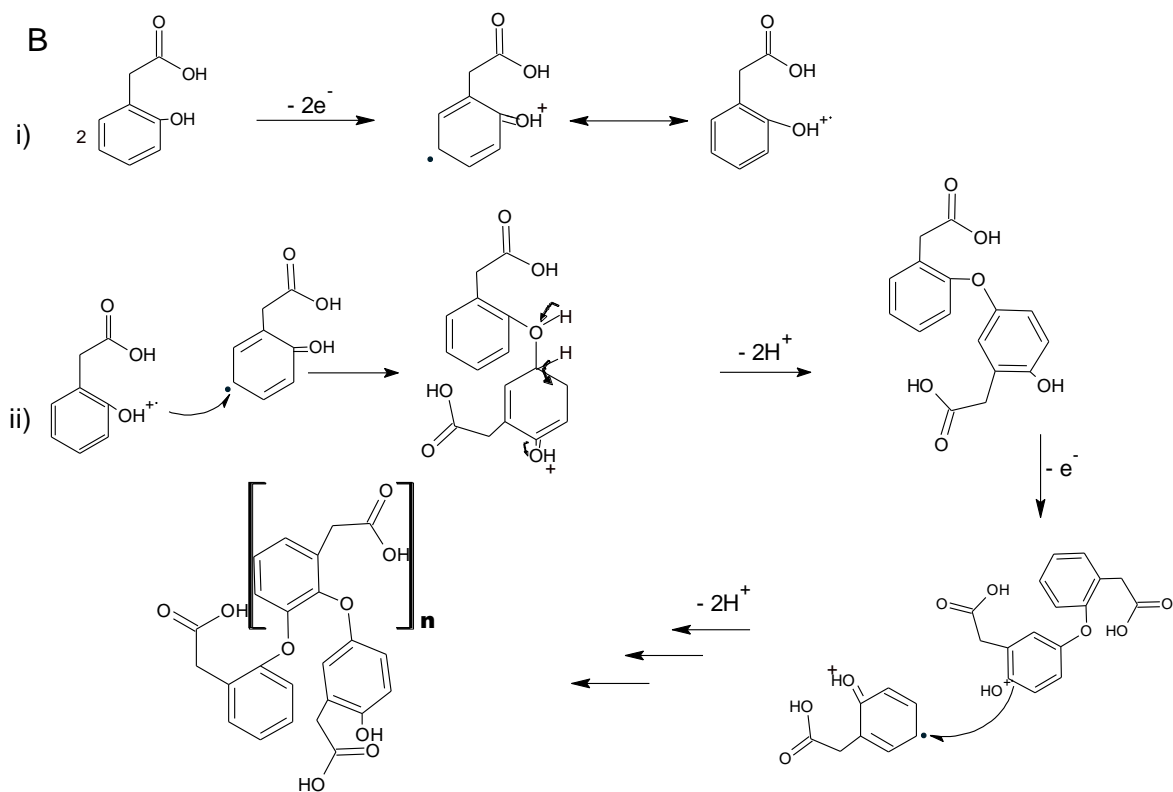
Tabela 10: Valores de pKas teóricos para os isômeros derivados dos ácidos hidroxifenilacéticos e seus cátions radicais.

	Isômeros		Cátions radicais	
	*pKa ₁	**pKa ₂	pKa ₁	pKa ₂
2-HFA / 2-HFA-CR	4,64	10,00	3,80	8,50
3-HFA / 3-HFA-CR	4,32	9,99	3,71	8,38
4-HFA / 4-HFA-CR	4,48	9,67	4,03	8,23

* pKa 1 = $-\text{CH}_2\text{-COOH}$. ** pKa 2 = $-\text{OH}$.



i) Eletrooxidação ii) Acoplamento



i) Eletrooxidação ii) Acoplamento

Figura 60: Mecanismo de eletropolimerização para POLI(2-HFA) via C3 (A) e C5 (B).

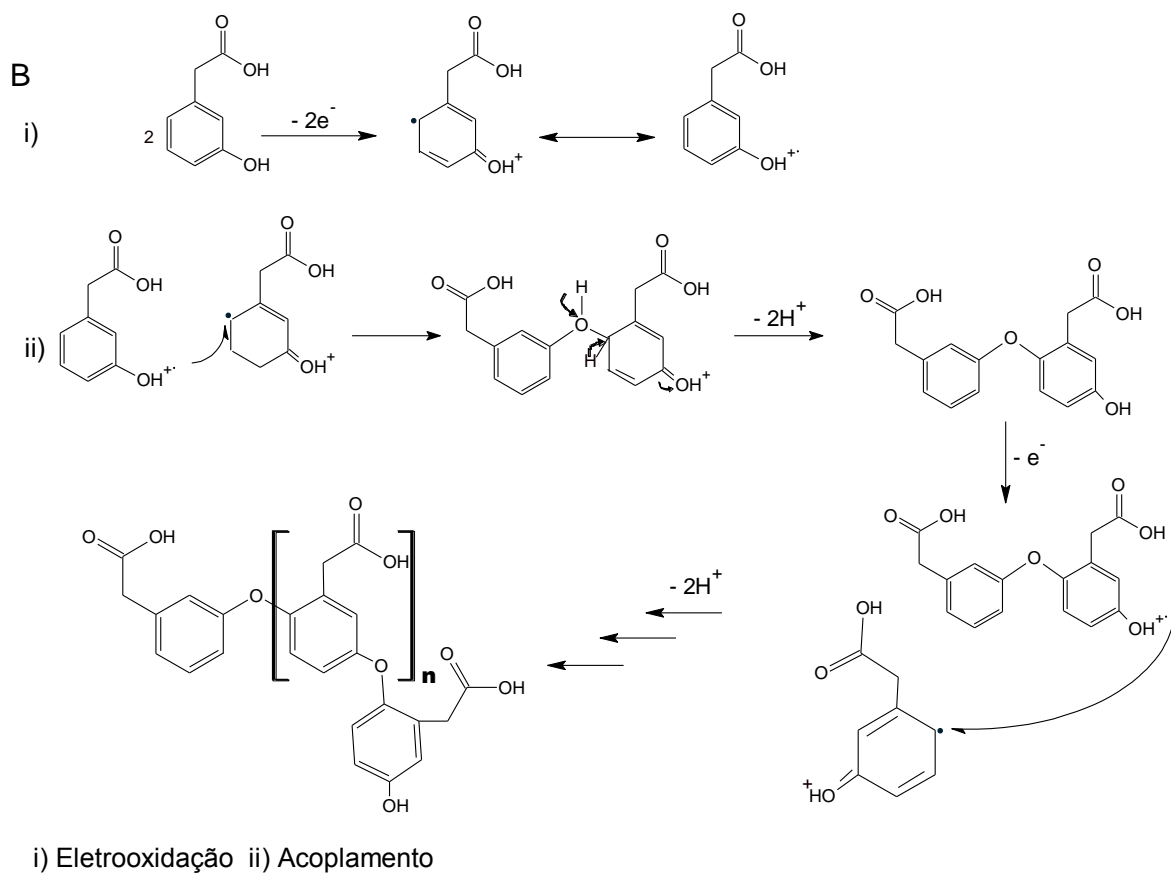
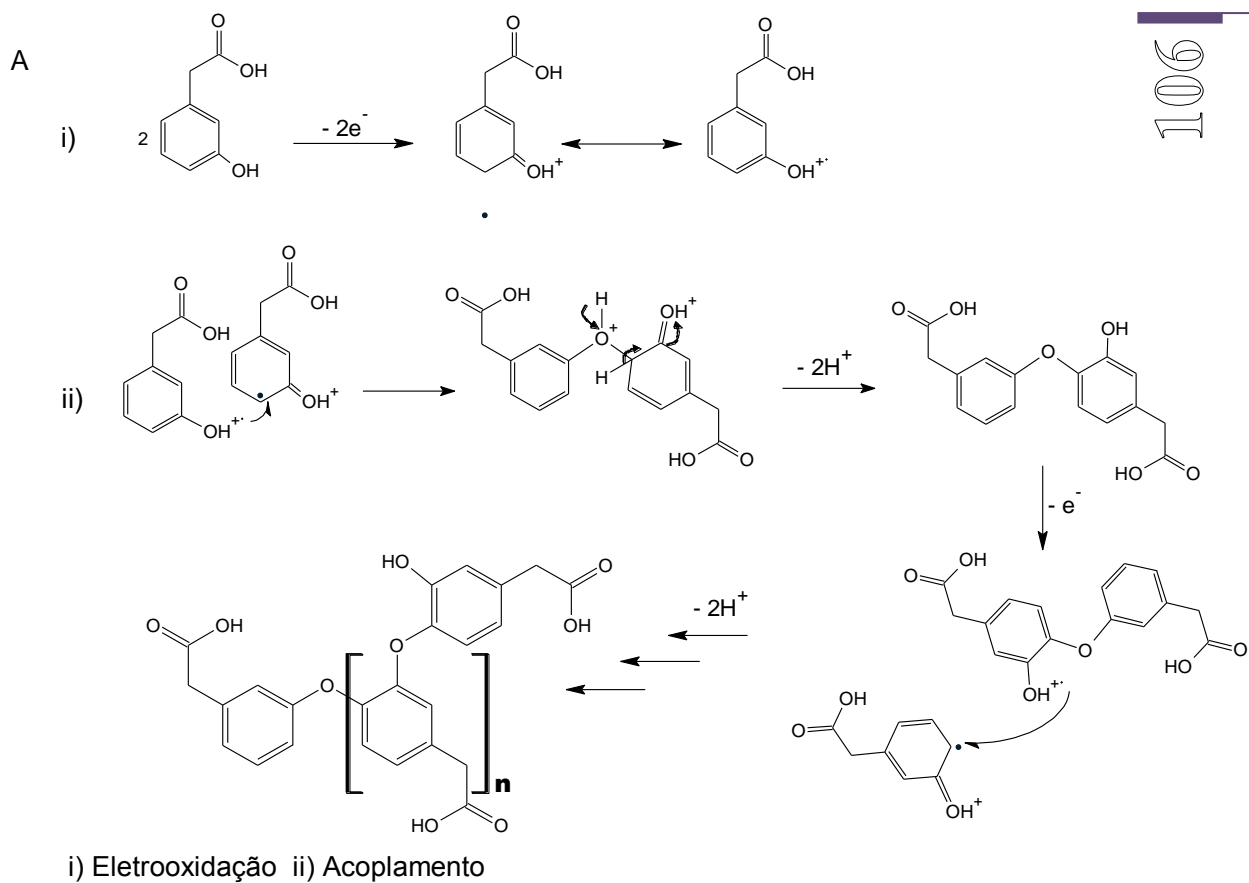


Figura 61: Mecanismo de eletropolimerização para POLI(3-HFA) via C4 (A) e C6 (B).

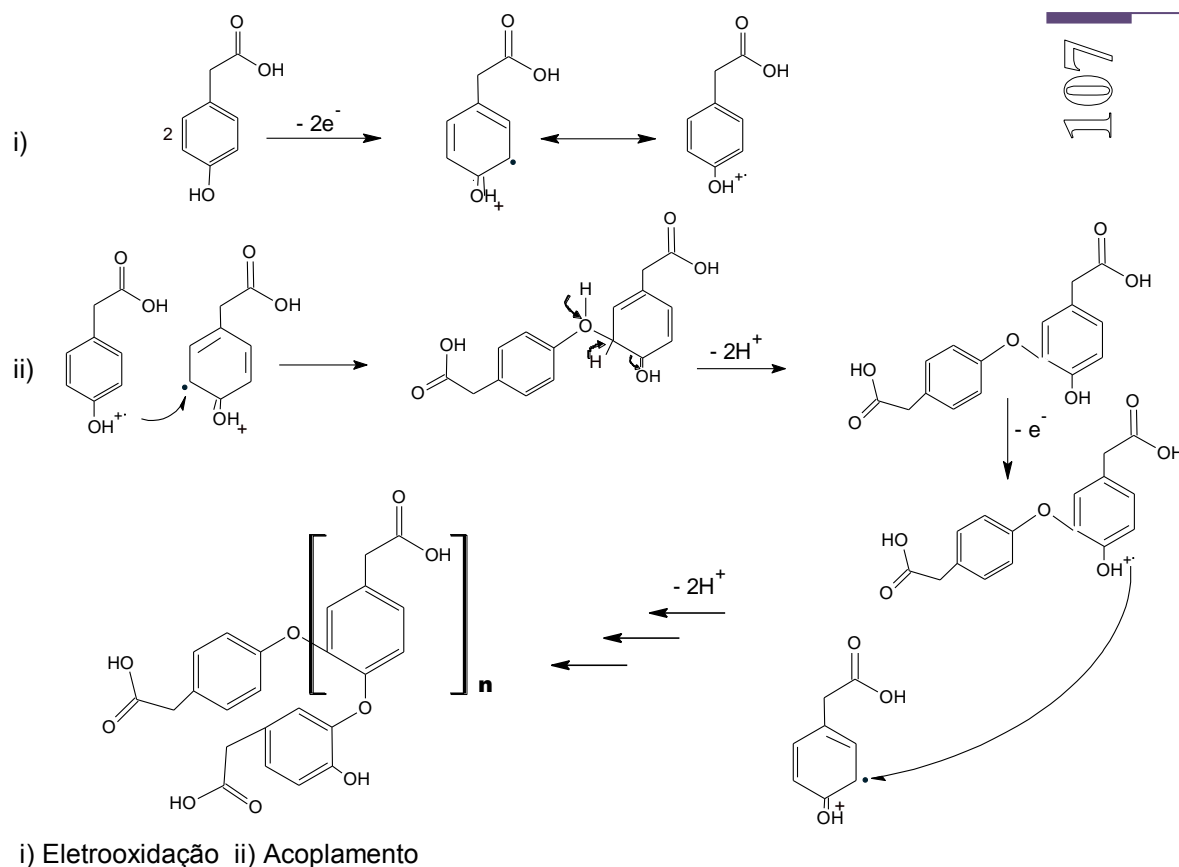


Figura 62: Mecanismo de eletropolimerização para POLI(4-HFA) via C3 ou C5.

Os valores encontrados na literatura para o pK_{a1} do 2-HFA, 3-HFA e 4-HFA são 4,17, 4,21 e 4,50, respectivamente.²³¹ Estes resultados mostram uma boa aproximação, aos calculados teoricamente, o que torna confiável os valores calculados de pK_{as} para os cátions radicais. Sendo pK_{a1} relativo ao substituinte acético, e pK_{a2} relativo ao substituinte fenólico. A desprotonação do cátion radical, que leva a formação de um radical, apenas ocorreria acima de pH 8, todavia o pH de eletrossíntese está em aproximadamente 0,3. Ou seja, durante a eletrossíntese, não ocorre a formação de radicais e sim, o provável acoplamento entre os cátions radicais, levando ao crescimento da cadeia polimérica.

A proposta para o mecanismo de polimerização dos HFAs pode ser dividida basicamente em três etapas: eletrooxidação dos monômeros; acoplamento de cátions radicais envolvendo os carbonos aromáticos e o oxigênio fenólico e a consecutiva perda de prótons para reconstituir a aromaticidade.

A etapa de propagação da polimerização é determinada a partir da reoxidação dos oligômeros durante os ciclos de potencial na superfície do eletrodo de grafite em

potenciais cada vez menores devido à formação de um material eletroativo. A seguir esses cátions radicais de oligômeros são reoxidados e acoplam-se aos cátions radicais de outros monômeros presentes no meio reacional; A etapa de terminação ocorre após cessar os ciclos de potencial. As Figuras 60, 61 e 62, mostram as propostas mecânicas para a formação dos POLI(2-HFA), POLI(3-HFA) e POLI(4-HFA), respectivamente.

As interações entre os cátions radicais podem ocorrer nos carbonos 3, 4, 5 e 6 (átomos com maiores densidade de spin) para os três monômeros conforme demonstrado na Figura 53 o que altera consideravelmente a estrutura espacial dos polímeros conforme demonstrado na Figura 54, todavia os mecanismos abaixo sugerem nos anéis aromáticos as posições C3 e C5 para o POLI(2-HFA), possivelmente com menor e maior rendimento de eletrossíntese, respectivamente, e C4 e C6 para o POLI(3-HFA), também possivelmente com menor e maior rendimento de eletrossíntese, respectivamente, conforme discutido detalhadamente no item 4.1.10.

4.1.12 – Estudos de imobilização das bases nitrogenadas nos polímeros derivados dos ácidos poli-hidroxifenilacéticos

A oxidação eletroquímica de ácidos nucleicos naturais e sintéticos tem sido amplamente estudada em vários substratos, como eletrodos de grafite pirolítico, grafite espectroscópico impregnado com parafina, carbono vítreo e outros. A oxidação da guanina e adenina envolve duas etapas, ocorrendo em cada uma delas, a perda de dois elétrons e dois prótons, todavia a primeira etapa é determinante para a velocidade da reação. A Figura 63 apresenta os mecanismos de oxidação para guanina e adenina.²³²

A detecção direta dos processos de hibridização, para a imobilização de oligonucleotídeos é baseada nos sítios de oxidação das bases presentes ao longo do oligonucleotídeo utilizado. É bem conhecido que dentre as bases do DNA, a 2-amino-6-hidroxipurina (guanina) e a 6-aminopurina (adenina) são as mais utilizadas como marcadores, por apresentarem os menores potenciais de oxidação. Os sítios de oxidação para essas bases nitrogenadas, são mostrados na Figura 64. La-Scalea e colaboradores²³³ mostraram a evolução do estudo e determinação eletroquímica de ácidos nucleicos ao longo dos anos, iniciando com o uso dos eletrodos de mercúrio e hoje os recentes avanços no desenvolvimento de eletrodos modificados com DNA fazendo uso das nanopartículas. O mecanismo de oxidação para cada base nitrogenada separada foi descrito por Peng e colaboradores.^{234,235}

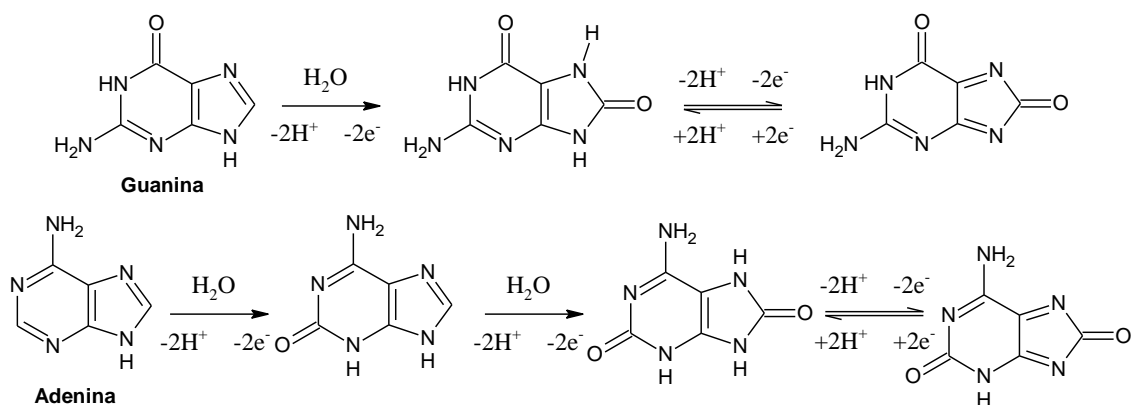


Figura 63: Mecanismo de oxidação para guanina e adenina.

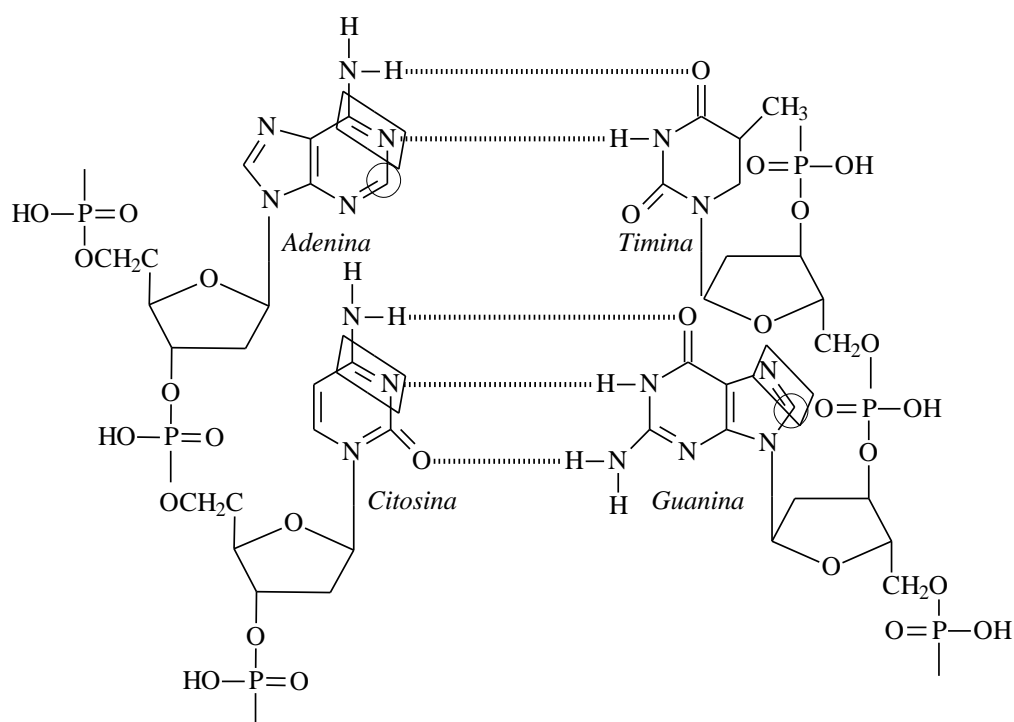


Figura 64: Pareamento Watson-Crick de bases e seus sítios de oxidação e redução no DNA. (O) sítios de oxidação para guanina e adenina e (□) sítios de redução para a guanina, adenina e citosina.^{236,237}

A Tabela 11 mostra os potenciais de pico das bases nitrogenadas isoladas em EG modificados com os poli(ácidos hidroxifenilacéticos) em tampão acetato (pH 4,0) e tampão fosfato (pH 7,0). Nestes valores de pH, devem ocorrer modificações estruturais nos polímeros e nas bases nitrogenadas justificando assim a investigação.

Tabela 11: Potenciais de oxidação de bases nitrogenadas imobilizadas, isoladamente, nos eletrodos modificados com ácidos poli-hidroxifenilacéticos.

	Potencial / V vs. Ag/AgCl							
	Guanina		Adenina		Timina		Citosina	
	Acetato	Fosfato	Acetato	Fosfato	Acetato	Fosfato	Acetato	Fosfato
POLI(2-HFA)	0,96	0,76	1,31	1,08	1,38	1,20	1,55	1,33
POLI(3-HFA)	0,92	0,70	1,28	1,00	1,38	1,15	1,51	1,31
POLI(4-HFA)	0,92	0,76	1,22	1,05	1,32	1,19	1,55	1,34

Como no estudo de imobilização de bases nitrogenadas em EG modificados com poli-aminofenóis realizado por Franco, D. L. e colaboradores,⁹¹ os potenciais de oxidação das bases nitrogenadas imobilizadas em EG modificados com poli(ácidos hidroxifenilacéticos) mostraram uma pequena variação dependente da natureza química do polímero e uma variação significativa em função do pH. Em tampão acetato (pH 4,0), para todos EG modificados com poli(ácidos hidroxifenilacéticos), os picos de oxidação de guanina estão entre 0,92 V e 0,96 V, já nas detecções em tampão fosfato (pH 7,0), estes picos aparecem entre 0,70 V e 0,76 V, verificamos que ela tem a sua oxidação facilitada em pH 7,0. O pico de oxidação da adenina também muito usado para o monitoramento de genossensores tem a sua oxidação nas matrizes de poli(ácidos hidroxifenilacéticos) variando entre 1,22 V e 1,31 V em tampão acetato, já em tampão fosfato varia entre 1,00 V e 1,08 V. Em relação ao potencial de oxidação da timina e da citosina, um comportamento semelhante é observado. Ou seja, o potencial do pico de oxidação de todas as bases nitrogenadas, em tampão acetato, foi maior do que o potencial do pico de oxidação em tampão fosfato. Este comportamento era esperado uma vez que em meio ácido as bases nitrogenadas estão protonadas dificultando a transferência de elétrons. Ao contrário, em meio neutro os elétrons estão livres, facilitando assim o processo de oxidação. Em termos de análise clínica, a detecção das bases nitrogenadas é mais adequada em tampão de fosfato, que apresenta pH fisiológico.^{91,238-241}

A Figura 65 mostra o comportamento voltamétrico da mistura das bases de puricas e pirimidicas imobilizadas nos EG modificados com poli(ácidos hidroxifenilacéticos), em tampão fosfato, pH 7,0.

Um tratamento matemático de deconvolução foi necessário para a perfeita separação dos picos de oxidação das quatro bases nitrogenadas.

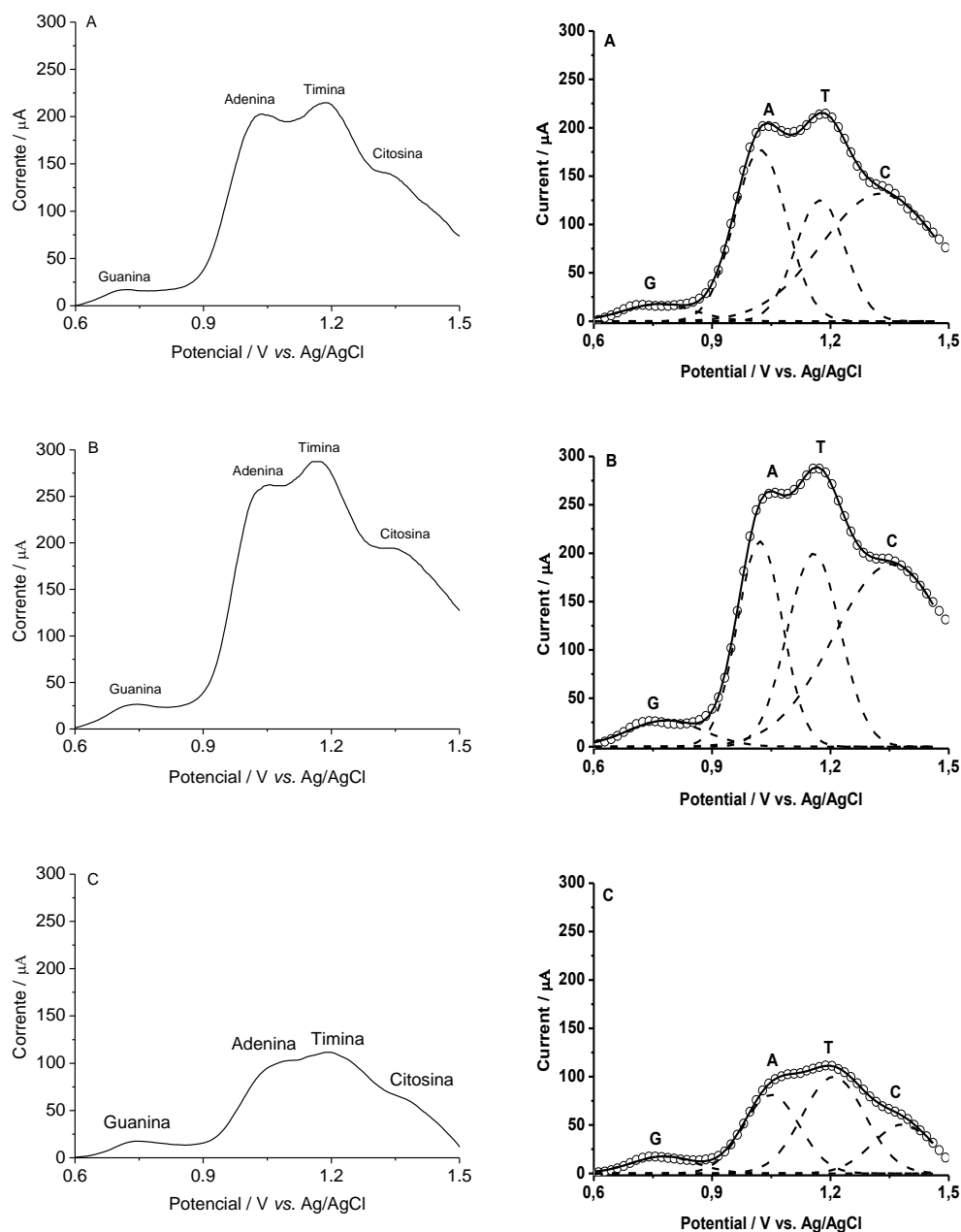


Figura 65: À esquerda, voltamogramas de pulso diferencial dos eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA) (A), POLI(3-HFA) (B) e POLI(4-HFA) (C), contendo guanina, G, (2 mmol.L^{-1}), adenina, A, (2 mmol.L^{-1}), timina, T, (20 mmol.L^{-1}) e citosina, C, (20 mmol.L^{-1}). Eletrólito: tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. À direita, deconvolução dos voltamogramas de pulso diferencial dos eletrodos de grafite modificados com POLI(2-HFA) (A), POLI(3-HFA) (B) e POLI(4-HFA) (C). Resultados experimentais (\circ), deconvolução (----) e fitagem (—), $R^2 > 0,99948$ e $\chi^2 < 3,25 \times 10^{-6}$ para todas as fitagens.

A Tabela 12 mostra os potenciais de oxidação encontrados no estudo da mistura das bases nitrogenadas, onde se observa que não ocorreram alterações significativas em relação aos potenciais detectados nas bases nitrogenadas isoladamente disponíveis na Tabela 11. A citosina é a base nitrogenada mais difícil de detectar. As curvas experimentais disponíveis na Figura 65 obtidas pela imobilização das bases nitrogenadas após lavagem, posterior ao tratamento de deconvolução, mostram que os sinais de correntes e de amplitudes de correntes dos picos de oxidação para as quatro bases nitrogenadas, têm valores mais altos para o POLI(3-HFA) em relação ao POLI(2-HFA) e ao POLI(4-HFA), conforme Tabela 13.

Tabela 12: Potenciais de oxidação de uma mistura das bases nitrogenadas imobilizadas em eletrodos de grafite modificados com ácidos poli-hidroxifenilacéticos.

	Potencial / V vs. Ag/AgCl			
	Guanina	Adenina	Citosina	Timina
POLI(2-HFA)	0,72	1,03	1,18	1,32
POLI(3-HFA)	0,74	1,06	1,17	1,33
POLI(4-HFA)	0,75	1,09	1,20	1,35

Os valores de amplitude de corrente disponíveis na Tabela 13, podem ser explicados em função da maior condutividade do POLI(2-HFA) e POLI(3-HFA) em relação ao POLI(4-HFA), mas ao comparamos os valores para o POLI(2-HFA) e POLI(3-HFA), percebemos uma maior retenção das bases nitrogenadas no POLI(3-HFA). Possivelmente, relacionada com as interações intermoleculares entre o polímero e as bases nitrogenadas, em que sua estrutura preferencialmente em espiral, deve ter um papel fundamental (Figura 54) para a melhor retenção. Em contrapartida, a estrutura tridimensional mais desordenada do POLI(4-HFA) deve promover uma interação menos efetiva com as bases nitrogenadas. Consequentemente, ocorre um maior lixiviamento durante a etapa de lavagem, justificando assim uma menor retenção destas moléculas e um maior lixiviamento durante as etapas de lavagem, evidenciadas nos menores valores de correntes.

A atividade eletroquímica da guanina e adenina são preferencialmente exploradas no monitoramento de sinal em genossensores.²³⁹⁻²⁴¹ Comparando os sinais de corrente destas bases, verificamos que o EG/POLI(2-HFA) e EG/POLI(4-HFA), atingem apenas 66 % e 65 %, respectivamente, do sinal do EG/POLI(3-HFA) em

relação à Guanina. Analogamente, em relação à Adenina, apenas 81 % e 38 %, e por esse motivo o eletrodo de grafite modificado com POLI(3-HFA) foi a matriz selecionada dentre as três para o desenvolvimento do genossensor para diagnóstico de DNA genômico de *Neisseria meningitidis*.

Tabela 13: Amplitude de corrente nos picos de potenciais de oxidação da mistura das bases nitrogenadas imobilizadas em eletrodos de grafite modificados com ácidos polihidroxifenilacéticos.

	Amplitudes das correntes de pico / μA			
	Guanina	Adenina	Timina	Citosina
POLI(2-HFA)	17,96	176,78	125,89	131,18
POLI(3-HFA)	27,17	211,51	198,42	187,90
POLI(4-HFA)	17,52	81,29	99,75	50,59

4.1.13 – Estudos de imobilizações de biomoléculas

A sensibilidade, seletividade e estabilidade de um biossensor estão diretamente associadas com a etapa da imobilização de biomoléculas sobre a superfície do eletrodo ou do eletrodo modificado.

A imobilização adequada de biomoléculas pode ser realizada através de controles químicos, como por exemplo, o pH e o ponto isoelétrico. Esses controles, podem garantir a maior cobertura da superfície analítica, aumentando a capacidade de reação entre a biomolécula e o substrato e mantendo a afinidade e estabilidade da respectiva biomolécula imobilizada.²⁴²

Moléculas sintéticas denominadas oligonucleotídeos podem ser usadas em sensores de hibridação de DNA, os chamados genossensores, podendo hibridizar com DNA de bactérias causadoras da doença. Outro potencial de aplicação está na imobilização de peptídeos sintéticos capazes de formar complexos estáveis com o respectivo anticorpo específico.

Após análise dos resultados obtidos nas eletropolimerizações dos filmes derivados dos ácidos hidroxifenilacéticos e suas respectivas caracterizações, foi escolhido como plataforma para o desenvolvimento de biossensores, os eletrodos de grafite modificados com POLI(3-HFA), por ser um polímero que apresenta relativamente um bom rendimento mássico, uma boa cinética de transferência de

elétrons, uma melhor estabilidade eletroquímica, cuja estrutura tridimensional provavelmente proporcionou uma maior interação com as bases nitrogenadas, sendo assim considerado que a sua aplicação no desenvolvimento de biossensores seria mais promissora em relação aos seus isômeros.

Assim, foram testadas as aplicações desta plataforma na imobilização de oligonucleotídeos sintéticos (NM1), visando à detecção do evento de hibridização com DNA genômico de *Neisseria meningitidis*, como também a imobilização de um peptídeo sintético (AM1), para detecção do anticorpo IgG específico contra *Anaplasma marginale*.

4.1.14 – Aplicação das plataformas de EG/POLI(3-HFA) em sistemas poliméricos para detecção de *Neisseria meningitidis*

Muitos trabalhos do grupo LAFIP-NANOTEC são exemplos de sensoriamento por biossensores convencionais, usando biomoléculas como, por exemplo, DNA imobilizado sobre eletrodos de grafite modificados com filmes poliméricos para diagnóstico da dengue, hanseníase e câncer de próstata^{130,160,137,159,158}

Madurro, J. M. e colaboradores apresentaram comparações conclusivas entre metodologias de detecção convencionais por biossensores e usando os sistemas biomiméticos obtidos a partir da imobilização de peptídeos sintéticos, imobilizados sobre a superfície de eletrodos de grafite modificados com filmes poliméricos para diagnóstico de dengue, hanseníase e leishmaniose.²⁴³

Neste trabalho foi imobilizado um oligonucleotídeo sintético NM1 equivalente a um fragmento de DNA da bactéria *Neisseria meningitidis* sobre os EG/POLI(3-HFA) configurando um sistema polimérico para detecção de *Neisseria meningitidis* (SPNM). A Figura 66A mostra os voltamogramas de pulso diferencial deste sistema, antes e após contato com o DNA genômico de *Neisseria meningitidis* em diferentes concentrações, usando o intercalador brometo de etídio.

Os resultados mostram que o alvo complementar promove aumento na amplitude do sinal de corrente, devido à intercalação do brometo de etídio na região onde NM1 hibridiza com ssDNA formando uma dupla fita de DNA. A amostra de DNA genômico de *Neisseria meningitidis*, extraída de uma cultura pura destas bactérias apresenta muitos interferentes potenciais, como RNA ou proteínas ou polissacarídeos o que indica que o sistema é seletivo e discrimina o alvo complementar. A Figura 66B

mostra a relação entre o sinal de amplitude de corrente do brometo de etídio e a concentração de alvo nas sucessivas adições através de uma reta de regressão que apresentou um bom coeficiente de correlação linear.

O procedimento experimental do item 3.2.12 na ausência de NM1 e na presença de 600 ng de DNA genômico foi testado resultando em um sinal de BE insignificante (Figura 66, curva tracejada) comprovando a importância da sonda NM1 no reconhecimento e descartando a possibilidade de adsorção inespecífica do alvo.

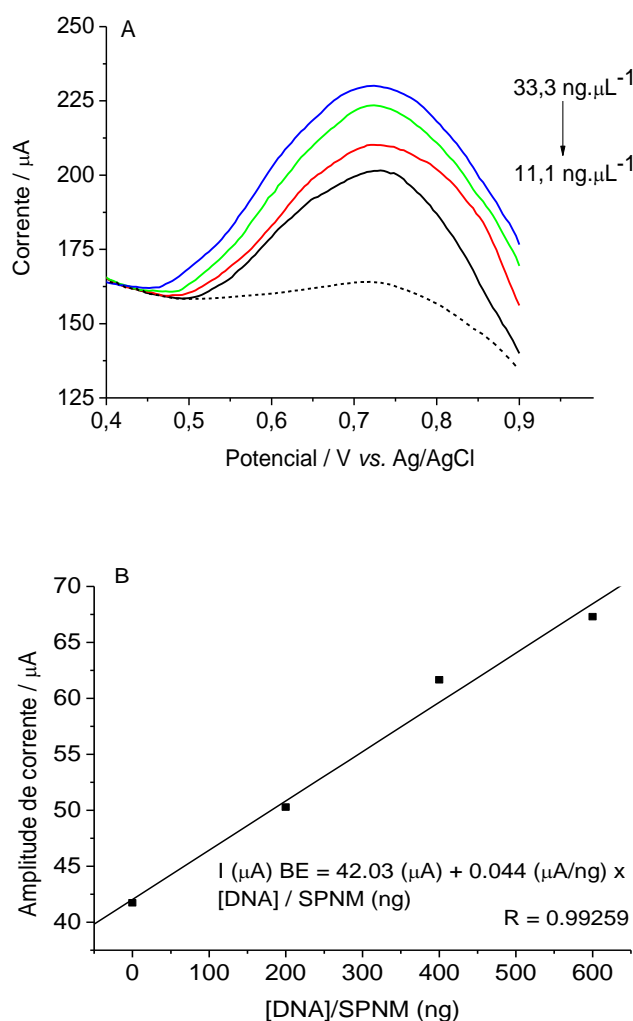


Figura 66: (A) Voltamogramas de pulso diferencial do brometo de etídeo na ausência de NM1 (---) e para SPNM antes (—) e depois da hibridação com o alvo complementar de DNA genômico de *Neisseria meningitidis* em diferentes concentrações, 200 ng (—), 400 ng (—) e 600 ng (—). Eletrólito: tampão fosfato ($0,10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), pH 7,4. Velocidade de varredura: 20 mVs^{-1} .

(B) Parâmetros de regressão linear da curva ΔI vs. [DNA]/SPNM.

A Figura 67A mostra o espectro de impedância em forma de Diagrama de Nyquist do SPNM, antes e após contato com o DNA genômico de *Neisseria meningitidis* em diferentes concentrações.

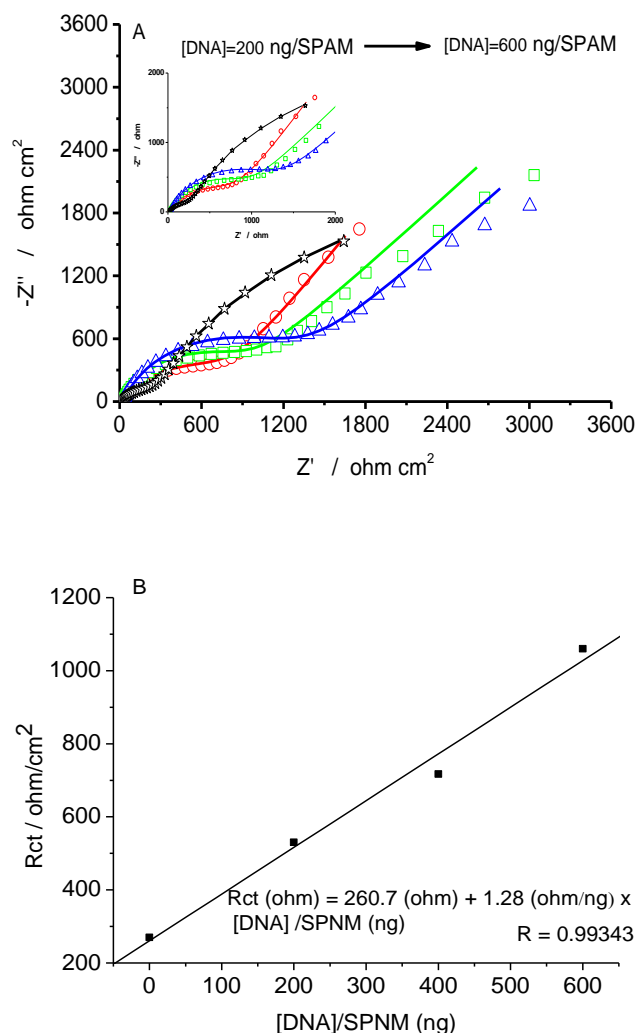


Figura 67: (A) Diagramas Nyquist (Z'' vs. Z') em KCl 0,1 M contendo $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ / $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5 mmol.L⁻¹ para SPNM antes (-☆-) e depois da hibridização com o alvo complementar de DNA genômico à (-○-) 200 ng, (-□-) 400ng e (-△-) 600 ng. $E_{pa} = 0,24$ V; Amplitude 10 mV; Intervalo de Frequência: 10^6 a 10^{-2} Hz. As linhas sólidas representam o ajuste dos dados experimentais a um circuito equivalente. Inseto: Ampliação na região de alta frequência para SPNM após a hibridização com os alvos. (B) Parâmetros de regressão linear da curva R_{ct} vs. [DNA]/SPNM.

A Figura 67B mostra a equação que relaciona o sinal de R_{ct1} e a concentração de alvo nas sucessivas adições através de uma reta de regressão que apresentou um bom coeficiente de correlação linear ($R = 0,99259$). Foram necessárias duas simulações, uma

para o sistema e outra para o sistema após reconhecimento do alvo, cujos circuitos equivalentes são representados por $R_s([R_{ct1}Q_{dl1}])(R_{ct2}Q_{dl2})$ e $R_s([R_{ct1}Q_{dl1}])Q_{dl2}$, respectivamente.

O parâmetro escolhido para monitoramento foi o R_{ct1} que representa a resistência à transferência de carga em relação à área superficial mais externa do sistema eletroquímico discriminando melhor o sensoriamento após o reconhecimento do DNA genômico que está na interface com a solução eletrolítica. Os resultados mostram que o alvo complementar após o reconhecimento promove um aumento na R_{ct1} do par redox $Fe(CN)_6^{2-}/Fe(CN)_6^{3-}$.

Os sensoriamentos diretos e indiretos das hibridizações usando espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria de pulso diferencial do brometo de etídio, respectivamente, foram comparados na Figura 68, com a finalidade de investigar a sensibilidade das técnicas, ou seja, após as adições sucessivas de incremento de alvo, poderíamos verificar qual técnica promoveria uma melhor resposta de sinal. Para isso foi necessário fazer uma normalização dos valores dos sinais de corrente e resistência à transferência de carga, transformando os em números adimensionais no intervalo de zero (menor sinal) a um (maior sinal).

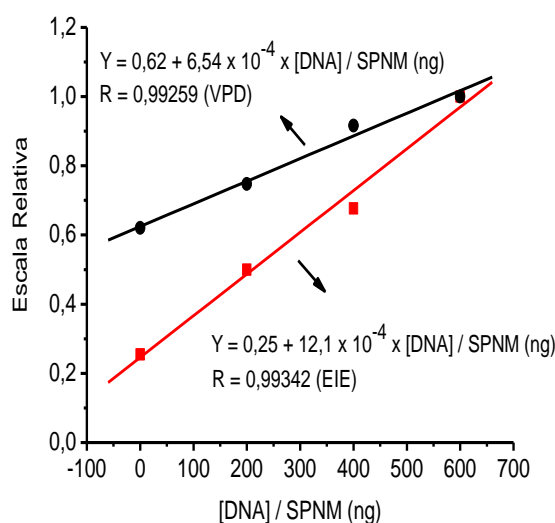


Figura 68: Parâmetros de regressão linear após normalização das curvas ΔI vs. $[DNA] / SPNM$ (-●-) e R_{ct} vs. $[DNA] / SPNM$ (-■-).

Temos que quanto maior a inclinação das respectivas regressões, maior é a resposta de sinal detectado após a hibridização do alvo e matematicamente esta inclinação está associada ao coeficiente angular (A) da equação da reta $Y = B + AX$, em que os valores para EIE e VPD/BE, são $1,21 \times 10^{-3}$ e $0,65 \times 10^{-3}$, respectivamente. Isto

nos leva a afirmar que a EIE é aproximadamente duas vezes mais sensível do que a VPD/BE neste sistema estudado, como já era esperado, pois a literatura relata que a EIE é uma das técnicas mais poderosas e sensíveis para investigação das propriedades elétricas da superfície de eletrodos modificados.^{174-176,179}

A Figura 69 mostra a topografia das superfícies do SPNM, antes e após contato com o DNA genômico de *Neisseria meningitidis* em diferentes concentrações.

Tabela 14: Parâmetros topográficos estatísticos do SPNM antes e após as adições de DNA genômico de *Neisseria meningitidis*.

	Sa (nm)	Sq (nm)	Sdq (um)
SPNM	$28,87 \pm 1,93$	$35,13 \pm 1,79$	$0,07 \pm 0,0021$
SPNM:200 ng	$37,23 \pm 5,15$	$46,10 \pm 6,58$	$0,12 \pm 0,0151$
SPNM:400 ng	$48,30 \pm 5,47$	$59,97 \pm 4,18$	$0,11 \pm 0,0035$
SPNM:600 ng	$60,77 \pm 22,34$	$80,77 \pm 32,31$	$0,16 \pm 0,0613$

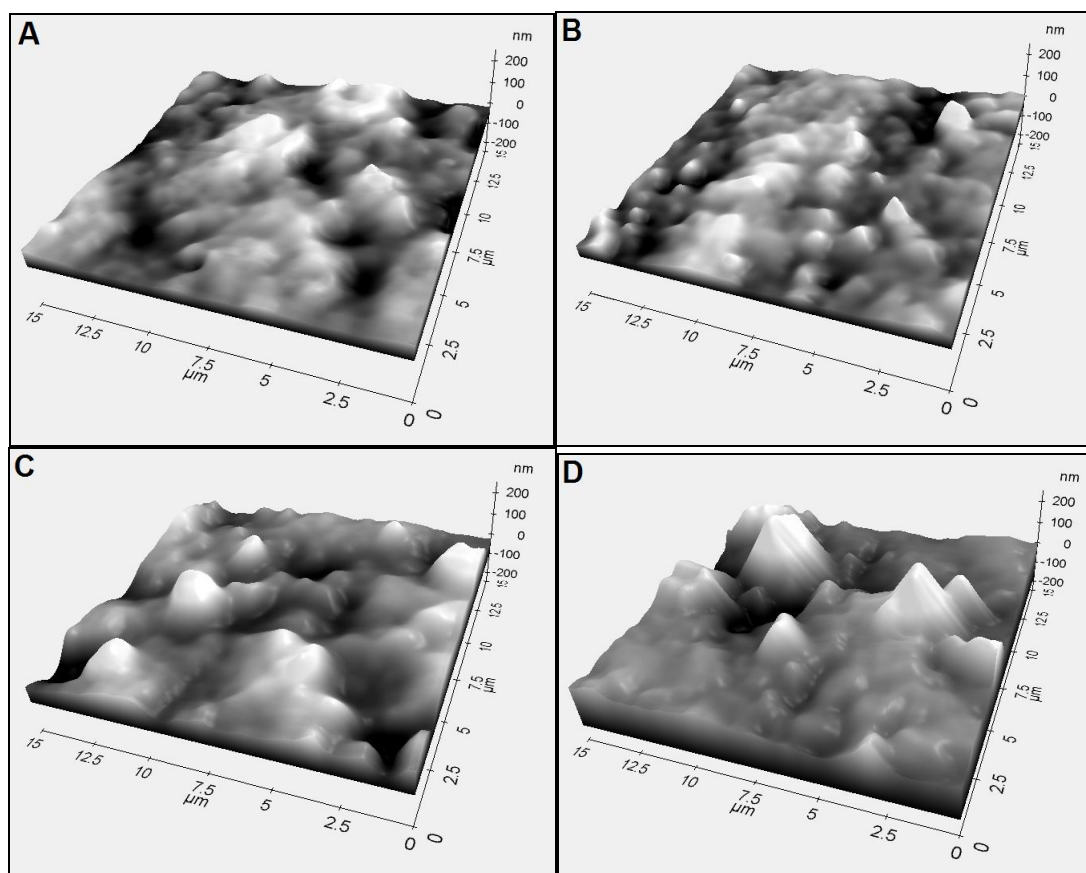


Figura 69: Imagens de microscopia de força atômica do (A) SPNM e SPNM com (B) 200 ng, (C) 400 ng e (D) 600 ng de DNA genômico.

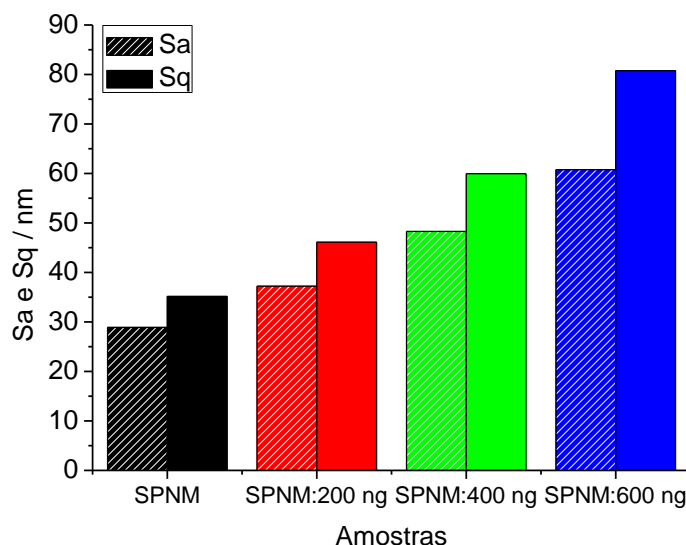


Figura 70: Parâmetros estatísticos topográficos do SPNM antes e após a adição de DNA genômico de *Neisseria meningitidis* nas concentrações de 200 ng (SPNM:200 ng), 400 ng (SPNM:400 ng) e 600 ng (SPNM:600 ng).

Podemos notar que a superfície do SPNM (Figura 67A) é menos rugosa em relação às demais, em que foram adicionados o alvo. Percebemos que o sistema reconhece o alvo, e mesmo após a lavagem nota-se a retenção do alvo baseado na modificação da superfície topográfica que alias é gradativa em termos de rugosidade em função da quantidade de DNA genômico adicionado (Figuras 69B, C e D).

A análise dos parâmetros topográficos dispostos na Tabela 14 está de acordo com os aspectos visuais observados na Figura 69.

Notamos que o EG tem sua rugosidade diminuída após a eletropolimerização dos ácidos hidroxifenilacéticos conforme discutido no item 4.1.9. Todavia a adsorção dos NM1 faz aumentar a rugosidade da superfície. O DNA genômico possui uma grande quantidade de pares de bases e quando reconhecido pelo SPNM também incrementa a rugosidade da superfície numa certa linearidade que pode ser observada na Figura 70.

4.1.15 – Aplicação das plataformas de EG/POLI(3-HFA) em sistemas poliméricos para detecção de *Anaplasma marginale*

O genoma da *A. marginale* é circular com dimensões entre 1,2 e 1,6 Mpb (milhões de pares de bases). As proteínas principais de superfície (MSP - major surface protein) da *A. marginale*, fornecem informações importantes principalmente sobre as sequências dos genes e anticorpos monoclonais e seus potenciais valores em ensaios de diagnósticos. A membrana da *A. marginale* é composta por seis MSPs em que a MSP1a (105 kDa) está envolvida nos processos transmissão desta doença em animais e sua porção N-terminal contém o epitopo sensível à neutralização e comprovadamente com importância imunogênica.²⁴⁴⁻²⁴⁸

Santos, P. S e colaboradores, usando a técnica de Phage Display (PD) selecionaram dois peptídeos miméticos da região antigênica da MSP1a que, posteriormente, foram sintetizados e denominados AM1 e AM2. Ambos foram submetidos a três testes comprobatórios de ELISA⁹, sendo o primeiro contra anticorpo anti-MSP1a comercial. O segundo ensaio diz respeito a testes seletivos em relação a outras bactérias como a *Brucella abortus*, *Leptospira interrogans*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e por fim o terceiro ensaio foi realizado em amostras reais de numa mistura de soros sanguíneos de animais não contaminados e contaminados por *A. marginale*. Os resultados obtidos mostraram que AM2 apresentou reação cruzada com Brucelose. Todavia AM1 mostrou-se eficiente, inclusive no teste de seletividade e, por esse motivo, foi imobilizado sobre os eletrodos de grafite modificados com POLI(3-HFA). Configurando assim, a utilização deste sistema polimérico para detecção de Anaplasmoose bovina (SPAM) em soros sanguíneos de bovinos contaminados, por espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria de pulso diferencial.²⁴⁹

Os experimentos realizados por EIE utilizando SPAM na presença dos soros de bovinos doentes, ou seja, contaminados com *A. marginale* (IgG⁺) e também na presença dos soros de bovinos saudáveis (IgG⁻). Na Figura 71 estas detecções podem ser vistas no formato de Diagrama de Nyquist, onde obtemos um semi-círculo em regiões de alta frequência (à esquerda no eixo x) e a tendência a uma reta em regiões de baixa frequência (à direita no eixo x). A presença dos semi-círculos com diâmetros diferentes

⁹Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay é um ensaio imunoenzimático que utiliza normalmente anticorpos e antígenos cuja complementaridade é verificada por mudança de cor.

indicam a presença de materiais com diferentes superfícies e mostram o sucesso da imobilização do peptídeo AM1 por adsorção física na superfície do eletrodo de grafite modificado com POLI(3-HFA).

A adsorção física foi eficiente neste caso, por que o EG/POLI(3-HFA) teve seu caráter aniônico, conforme discutido no item 4.1.6, acentuado através de uma redução, aplicando um potencial de -0,2V por um período de 120 s. Em contrapartida, o peptídeo AM1 apresenta caráter catiônico em tampão acetato, pH 4,3, devido seu ponto isoelétrico (PI) ser 5,8. Ou seja, o pH do tampão de diluição está menor do que o PI fazendo com que sua estrutura fique catiônica e adsorva eficientemente no EG/POLI(3-HFA) aniônico. O aumento dos valores de R_{ct} é observado nas regiões de altas frequências, ou seja, mesmo após a lavagem o peptídeo não é lixiviado.

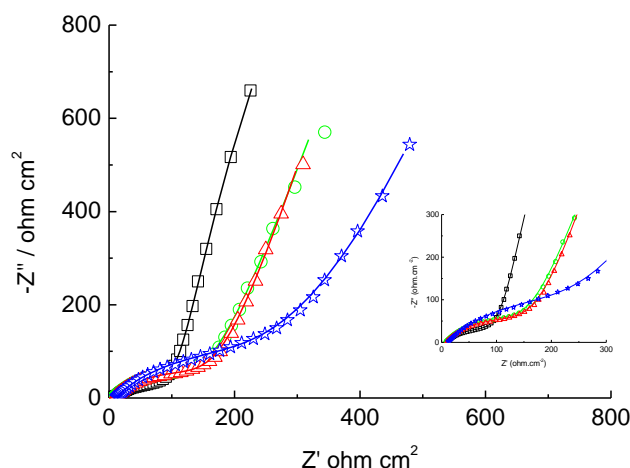


Figura 71: Diagrama de Nyquist do eletrodo de grafite modificado com POLI(3-HFA) (-□-), (-△-) SPAM, (-☆-) SPAM:IgG⁺ (alvo complementar) e (-○-) SPAM:IgG⁻ (alvo não-complementar) em solução contendo 5 mol.L⁻¹ de ferrocianeto de potássio, 5 mmol.L⁻¹ de ferricianeto de potássio e 0,1 mol.L⁻¹ de cloreto de potássio. Potencial aplicado: +0.24 V, amplitude: 0,10 V. (—) Simulação. Inseto: Região de alta frequência ampliada.

O SPAM na presença do alvo complementar também proporcionou um aumento na resistência (Z'), já que a ampliação da camada biológica após o reconhecimento resulta num aumento de R_{ct} do sistema, promovendo uma diminuição da transferência eletrônica entre o par redox ferro/ferricianeto e a superfície do eletrodo. A seletividade também pode ser comprovada quando o SPAM foi colocado em contato com o sistema sonda/alvo não-complementar (SPAM:IgG⁻) em que os valores de R_{ct} (diâmetro do semi-círculo da região de altas frequências) são semelhantes para o SPAM e

SPAM:IgG⁻, demonstrando que após a lavagem ocorreu à lixiviação das IgG⁻ devido a sua não complementaridade. Simulações foram realizadas para as quatro curvas visando quantificar os parâmetros que estão dispostos na Tabela 15. Observa-se que um único circuito físico equivalente representado por $R_s([R_{ct1}Q_{dl1}]W_1)Q_{dl2}$ foi suficiente para explicar os resultados eletroquímicos.

A morfologia da camada eletroativa do SPAM (Figura 70) suporta a existência destas duas regiões, uma mais interna, formada pela interface de EG / POLI(3-HFA), descrito por Q_{dl2} , e outra mais externa, formada pela interface POLI(3-HFA) / AM1 / eletrólito, representada por R_{ct1} , Q_{dl1} e W_1 .

Tabela 15: Parâmetros obtidos, a partir dos resultados de simulação de espectroscopia de impedância eletroquímica para os SPAM e SPAM na presença do alvo complementar (IgG⁺) e não complementar (IgG⁻).

	SPAM	SPAM:IgG ⁺	SPAM:IgG ⁻
$R_s / \Omega \text{ cm}^2$	9,04	12,28	7,73
$Q_{dl1} / \text{mF cm}^{-2}$	0,0012	0,0011	0,0011
$R_{ct1} / \Omega \text{ cm}^2$	157,8	266,6	152,5
$W / (\Omega \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1/2})$	0,0261	0,0082	0,0390
$Q_{dl2} / \text{mF cm}^{-2}$	0,0181	0,0327	0,0131
$\chi^2 / (x 10^{-3})$	6,30	6,32	11,5

De acordo com estes valores podemos observar uma similaridade entre os valores de R_{ct1} para o SPAM e SPAM:IgG⁻ de $157,8 \Omega \cdot \text{cm}^2$ e $152,5 \Omega \cdot \text{cm}^2$, respectivamente. Devido a uma excelente especificidade, o SPAM foi capaz de discriminar soros bovinos de animais saudáveis (IgG⁻), dos soros sanguíneos de bovinos contaminados com *A. marginale* que contêm anticorpos anti-MSP1a (IgG⁺).

Já o SPAM na presença dos soros sanguíneos de animais contaminados (IgG⁺) (SPAM:IgG⁺) proporcional um sinal EIE, com aumento substancial da R_{ct1} . Este passou para um valor de $266,6 \Omega \cdot \text{cm}^2$, cerca de $108,8 \Omega$ maior do que o background (SPAM). Demonstrando assim, o reconhecimento efetivo do SPAM:IgG⁺ devido ao aumento da camada de material biológico, gerando maior resistência à transferência de carga entre o par redox ferro/ferricianeto e o EG/POLI(3-HFA).

Os valores de χ^2 são bons para o SPAM e SPAM:IgG⁺ e razoáveis para SPAM:IgG⁻, descrevendo uma boa correlação entre os resultados eletroquímicos experimentais e o circuito físico proposto para simulação, lembrando que o valor de R_{ct1} é o parâmetro mais importante em termos analíticos e mais usado para investigar a seletividade.²⁵⁰ A comparação da capacitância da dupla camada elétrica revelou modificações, quando o SPAM interage com o anticorpo específico nos soros positivos (IgG⁺), produz um aumento de 2 vezes, devido às cargas elétricas na superfície do SPAM. A difusão das espécies eletroativas em EIE em geral aparece como uma impedância de Warburg nas regiões de baixas frequências (10 kHz a 0,1 Hz). Observamos valores similares para o SPAM e o SPAM:IgG⁻, todavia o SPAM:IgG⁺ promove uma diminuição de 3 vezes neste parâmetro, que pode estar associado diretamente a uma diminuição da taxa de transporte de massa em função de uma camada bloqueadora formada pelo acoplamento do SPAM a IgG⁺, promovendo assim uma menor difusão das espécies.

Estudos paralelos foram realizados para investigar a transferência eletrônica do ferri/ferrocianeto de potássio agora por VPD. A Figura 72 mostra estes voltamogramas que expressam os sinais de correntes e potenciais na detecção direta de *A. marginale*.

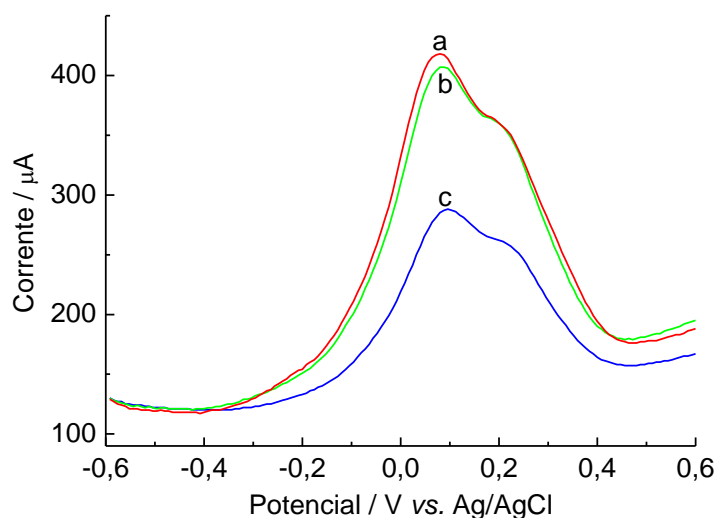


Figura 72: Voltamogramas de pulso diferencial do SPAM (a), SPAM:IgG⁻ (alvo não complementar) (b) e SPAM:IgG⁺ (alvo complementar) (c). Eletrólito: Solução de K₃[Fe(CN)]₆ / K₄[Fe(CN)]₆ 0,33 mmol.L⁻¹ e KCl 0,1 mol.L⁻¹. $\nu = 16 \text{ mVs}^{-1}$.

A Figura 73 mostra a deconvolução do sinal da Figura 70, curvas a e c, onde podemos observar após o tratamento matemático temos claramente a distinção entre

dois picos, o primeiro em torno de 0,07 V, que está relacionado, provavelmente, a grupos oxidáveis do peptídeo AM1, já que Enache, T. e Oliveira-Brett A. M., recentemente estudaram a atividade eletroativa de peptídeos em eletrodos de carbono.²⁵¹

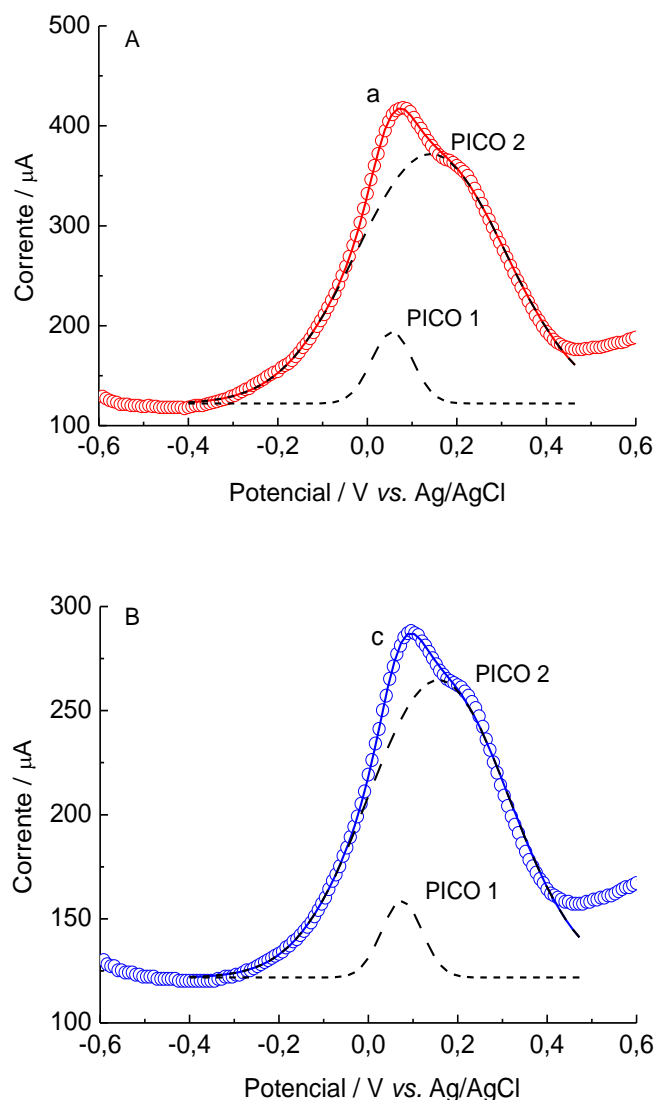


Figura 73: Voltamogramas de pulso diferencial do SPAM, curva a (A) e SPAM:IgG+, curva c (B). Eletrólito suporte: Solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ / $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0,33 mol.L⁻¹ e KCl 0,1 mol.L⁻¹. $\nu = 16 \text{ mVs}^{-1}$. Resultados experimentais (o), deconvolução (---) e fitagem (linhas sólidas). $R^2 > 0,99603$ e $\chi^2 = 1 \times 10^{-5}$ para todas as fitagens.

O segundo pico mais intenso em torno de 0,17 V, referentes a oxidação do par redox ferri/ferrocianeto de potássio. Todos os voltamogramas apresentaram um pico e

um ombro à direita, referente à oxidação do material biológico imobilizado, peptídeo AM1 e ferri/ferrocianeto de potássio, respectivamente.

Avaliando os valores de corrente de pico de oxidação para o primeiro pico percebemos uma diminuição acentuada no sistema após o reconhecimento, contendo SPAM:IgG⁺ (I_{pa} = 287 μ A), Figura 72, curva c, e semelhanças nas correntes de oxidação entre SPAM (I_{pa} = 417 μ A), Figura 72, curva a, e SPAM:IgG⁻ (I_{pa} = 407 μ A), Figura 72, curva b, indicando assim, que a transferência eletrônica foi reduzida em 130 μ A, após o reconhecimento do alvo pelo SPAM.

As respostas altas de transferência eletrônica para a SPAM e a SPAM:IgG⁻, mostram que estas superfícies viabilizam a troca iônica, ou seja, as respostas de corrente muito semelhantes para estes dois sistemas mostram a especificidade deste sensor usando amostras reais de soro sanguíneo que contém vários interferentes potenciais como úrea, ácido úrico, albumina e glutamatos.

Avaliando os valores de corrente de pico percebemos que a maior contribuição para a discriminação de sinal entre o SPAM antes e após o reconhecimento da IgG⁺ está relacionada com o segundo pico, Figuras 73A e 73B, onde obtemos para as curvas a e c, 372 μ A e 264 μ A, respectivamente, em que a diferença de sinal é de 108 μ A. Interessante resaltar, que estes resultados de VPD estão concordantes com os obtidos em EIE, como era esperado após o SPAM reconhecer a IgG⁺ ocorre uma aumento na resistência de 108,8 Ω e uma diminuição da corrente de 108 μ A, que em função da mesma magnitude parece ser uma boa aproximação da Lei de ohm^r, já que ambas detecções foram realizadas nas mesmas condições experimentais.

A Figura 74 mostra os experimentos adicionais de AFM realizados para avaliar as alterações morfológicas na superfície do EG/POLI(3-HFA) após sua interação com o peptídeo AM1 e posteriormente com o soro positivo contendo IgG⁺.

O eletrodo de grafite modificado com POLI(3-HFA) e o SPAM não diferiram significativamente um do outro com alturas variando entre 100 nm e 200 nm, ao passo que após o processo de reconhecimento da IgG⁺ uma aglutinação é observada elevando a altura do SPAM para valores entre 200 e 300 nm, aumentando a rugosidade do

^r A Lei de Ohm formulada pelo físico alemão Georg Simon Ohm, afirma que, para um condutor mantido à temperatura constante, a razão entre a tensão entre dois pontos e a corrente elétrica é constante. Essa constante é denominada de resistência elétrica.

sistema em conformidade com os estudos de VPD e EIE, já que os peptídeos são relativamente pequenos comparados com as imunoglobulinas e por isso foi evidenciado a formação de estruturas macromoleculares que promoveram grandes mudanças conformacionais na topografia.^{190,252}. Estes resultados estão de acordo com a literatura que demonstram que os peptídeos obtidos a partir de seleções PD podem ser usados como sondas no desenvolvimento de imunossensores.²⁵³

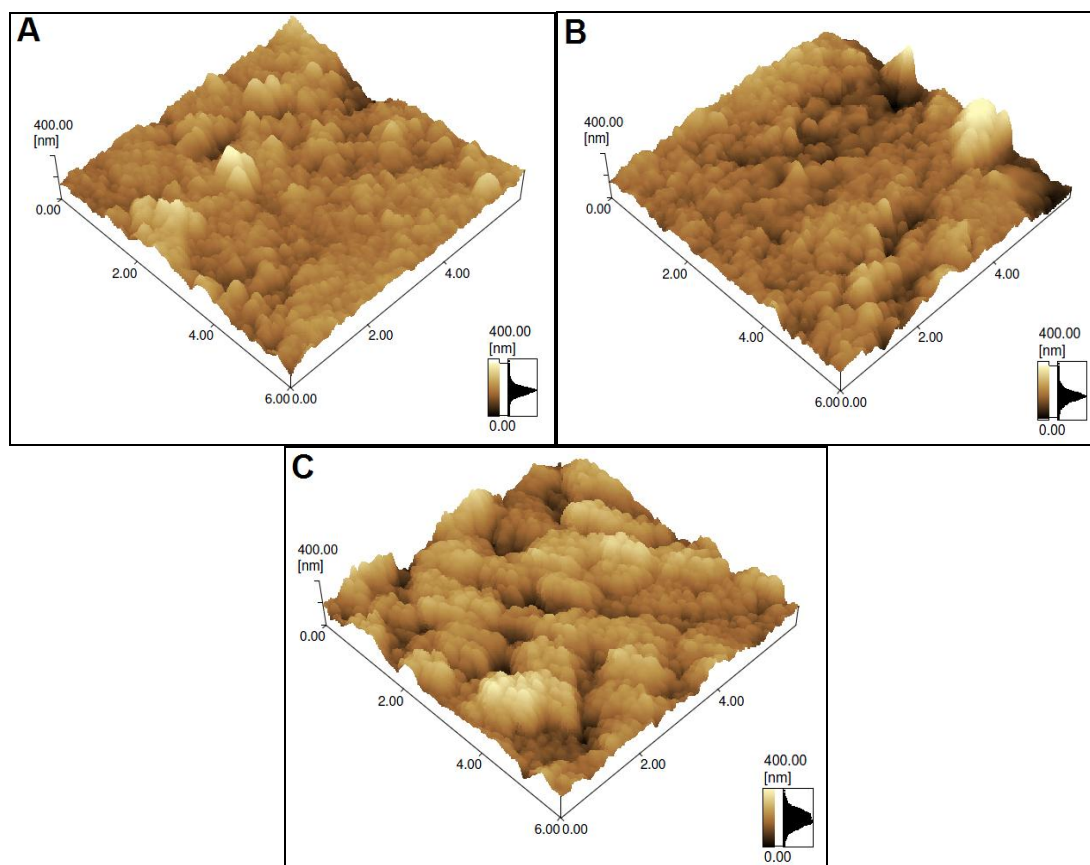


Figura 74: Imagens de microscopia de força atômica do eletrodo de grafite modificado com POLI(3-HFA) (A), SPAM (B) e SPAM:IgG⁺ (C).

A eletropolimerização dos isômeros do ácido hidroxifenilacético sobre eletrodos de grafite foi realizada com sucesso, sendo que os voltamogramas dos filmes poliméricos eletroativos sugerem a presença de dois pares redox, possivelmente, devido à formação de polarons e bipolarons durante as sucessivas ciclagens.

Todos os diagnósticos de reversibilidade aplicados aos três filmes poliméricos mostraram que os materiais derivados do ácido hidroxifenilacético adsorvidos no grafite são quase-reversíveis, todavia a cinética eletroquímica é mais pronunciada no poli(ácido 3-hidroxifenilacético) em relação aos seus outros isômeros. As massas eletrodepositadas inferem que o poli(ácido 2-hidroxifenilacético) e poli(ácido 3-hidroxifenilacético) apresentam um maior rendimento de eletrossíntese em relação ao poli(ácido 4-hidroxifenilacético), o que evidencia através de imagens de microscopia de força atômica que mostram que, neste último, ocorre uma menor modificação na superfície do grafite em relação aos seus outros dois isômeros. As caracterizações eletroquímicas de troca iônica dos pares redox foram concordantes entre si, indicando que esta classe de polímeros apresenta um comportamento aniônico em pH neutro, cujos perfis voltamétricos nas sondas positiva e negativa foram semelhantes para o poli(ácido 2-hidroxifenilacético) e poli(ácido 3-hidroxifenilacético) diferenciando do poli(ácido 4-hidroxifenilacético) que apresenta-se como um material menos condutor em relação aos dois primeiros, mais condutores, conforme demonstrado nos espectros de impedância eletroquímica.

Os eletrodos eletroquimicamente modificados submetidos aos testes de estabilidade e reversibilidade mostraram que o poli(ácido 3-hidroxifenilacético) apresenta uma menor perda de carga nas condições investigadas em relação aos seus outros dois isômeros, presumindo assim que sua estrutura tridimensional viabiliza melhor a entrada e saída dos íons percloratos durante os processos de oxidação e redução, respectivamente.

As estruturas otimizadas para os decâmeros mais prováveis, resultantes da eletropolimerização dos isômeros do ácido hidroxifenilacético, justificam o comportamento morfológico e eletroquímico destes materiais, pois mostraram que as posições *orto* e *meta* substituídas proporcionam estruturas mais semelhantes entre si, em detrimento a posição *para* substituídas.

As propostas de mecanismo foram realizadas através de iniciação por oxidação anódica eletroquímica irreversível dos respectivos monômeros cujos experimentos de voltametria de onda quadrada demonstraram a perda de um elétron de cada espécie promovendo a formação dos respectivos cátions-radicaís.

A nucleação e propagação dos três filmes poliméricos ocorre no potencial aproximado de 1 Volt em que os cátions-radicaís se unem e reconstituem a aromaticidade. Depois são novamente eletro-oxidados, e sucessivamente se unem a outros cátion-radicaís, com a formação através de ligação $-[R-O-R']_n-$, ocorrendo através do ataque do oxigênio fenólico de uma espécie ao carbono do anel aromático de outra espécie. As posições de acoplamentos nos carbonos do anel, investigadas por densidade de spins, mostraram-se concordantes com as possíveis estruturas de ressonância nas espécies intermediárias respaldando assim, as sugestões mecanísticas. Principalmente, via carbono 3 e 6 para as posições *orto* e *meta*, respectivamente, uma vez que a posição *para*, por apresentar simetria, fornece uma única possibilidade de crescimento de cadeia.

As plataformas produzidas através da modificação eletroquímica de grafite com ácidos hidroxifenilacéticos submetidas aos ensaios de incorporação e retenção de bases nitrogenadas mostraram que os eletrodos de grafite modificados com poli(ácido 3-hidroxifenilacético) são mais eficientes em relação aos outros isômeros estudados. A sua superioridade está no que tange ao comportamento eletroquímico em geral, e principalmente, na estabilidade. Sendo assim, justificada a escolha desta plataforma para produção dos sistemas poliméricos através da imobilização por adsorção física de moléculas sintéticas de reconhecimento.

A imobilização de oligonucleotídeos sintéticos representativos de fragmentos de DNA da bactéria *Neisseria meningitidis* nesta matriz constituiu um sistema polimérico que se mostrou eficiente para detectar seu DNA genômico em diferentes concentrações. Por voltametria de pulso diferencial, usando brometo de etídio como intercalador, ou por espectroscopia de impedância eletroquímica, sendo esta última técnica mais sensível em uma curva analítica.

Nessa matriz, a imobilização de peptídeos sintéticos representativos de materiais protéicos, como os encontrados na parede celular da bactéria *Anaplasma marginale*, constituiu um sistema polimérico que se mostrou eficiente para detectar seus anticorpos, discriminando seletivamente animais saudáveis de animais contaminados por voltametria de pulso diferencial e por espectroscopia de impedância eletroquímica. As

imagens de microscopia de força atômica para os dois sistemas poliméricos asseguram sua eficácia no reconhecimento biológico da meningite bacteriana e anaplasmosse bovina, mesmo usando amostras complexas que contenham muitos interferentes como outras proteínas, carboidratos, RNA e ureia, ácido úrico, glutamato e albumina, respectivamente.

Sistemas poliméricos portáteis usando eletrodos impressos eletroquimicamente modificados podem ser construídos no futuro, para detectar meningite bacteriana em humanos e anaplasmosse bovina em animais.

Equação genérica: $y=y_0 + (A/(w*\sqrt{\pi/2}))*\exp(-2*((x-x_c)/w)^2)$

Deconvolução da Figura 37 A - POLI(2-HFA) – Picos de oxidação

Variável	Módulo	Erro
y0	0	±0
xc1	480.39142	±0.92879
w1	135.54421	±1.81
A1	69.25984	±0.84786
xc2	650.37086	±0.64578
w2	97.00172	±1.79502
A2	54.44028	±0.99971

POLI(2-HFA) – Picos de redução

Variável	Módulo	Erro
y0	-0.03598	±0.00161
xc1	601.27443	±0.92957
w1	114.63041	±2.09336
A1	-37.55194	±0.69657
xc2	382.17371	±0.63784
w2	128.42015	±1.7394
A2	-66.63429	±0.7873

Deconvolução da Figura 37 B - POLI(3-HFA) – Picos de oxidação

Variável	Módulo	Erro
y0	0	±0
xc1	523.03336	±0.62587
w1	88.36306	±1.68678
A1	21.24693	±0.66475
xc2	628.16932	±2.00173
w2	290.17154	±2.74006
A2	108.02629	±0.71315

POLI(3-HFA) - Picos de redução

Variável	Módulo	Erro
y0	-0.32806	±0.01176
xc1	450.46083	±0.72245
w1	105.25078	±2.02196
A1	-28.85578	±0.88974
xc2	839.46943	±7.98217
w2	573.63231	±35.67515
A2	208.12865	±20.95441

Deconvolução da Figura 37 B - POLI(4-HFA) - Picos de oxidação

Variável	Módulo	Erro
y0	0	±0
xc1	548.86019	±3.35323
w1	201.7993	±3.56917
A1	64.27208	±2.02964
xc2	755.0399	±4.16906
w2	169.31326	±12.98795
A2	24.48356	±2.71793

POLI(4-HFA) - Picos de redução

Variável	Módulo	Erro
y0	-0.12495	±0.01311
xc1	878.33693	±12.38043
w1	773.8352	±103.63222
A1	99.11638	±23.70351
xc2	371.9527	±1.80127
w2	216.05222	±4.89825
A2	-51.74649	±2.64661

Convolução da Figura 45 - POLI(2-HFA) - Picos de oxidação na velocidade de:

10 mV s⁻¹

Variável	Módulo	Erro
y0	0	±0
xc	0.64866	±0.00849
w	0.32751	±0.01924
A	0.00005	±2.2249E-6

20 mV s⁻¹

Variável	Módulo	Erro
y0	-0.00012	±0.00007
xc	0.64893	±0.00707
w	0.47844	±0.01924
A	0.00018	±0.00008

30 mV s⁻¹

Variável	Módulo	Erro
y0	-0.00021	±0.00013
xc	0.65216	±0.00667
w	0.51556	±0.10292
A	0.0003	±0.00014

40 mV s⁻¹

Variável	Módulo	Erro
y0	-0.00019	±0.0001
xc	0.65394	±0.00624
w	0.47743	±0.07481
A	0.00031	±0.00011

50 mV s⁻¹

Variável	Módulo	Erro
y0	-0.00017	±0.00009
xc	0.65516	±0.00559
w	0.44666	±0.05569
A	0.00032	±0.00008

60 mV s⁻¹

Variável	Módulo	Erro
y0	-0.00019	±0.00009
xc	0.65439	±0.00517
w	0.44089	±0.05053
A	0.00036	±0.00009

70 mV s⁻¹

Variável	Módulo	Erro
y0	-0.00019	±0.00009
xc	0.65885	±0.00531
w	0.42942	±0.04543
A	0.00039	±0.00009

80 mV s⁻¹

Variável	Módulo	Erro
y0	-0.00019	±0.00008
xc	0.66026	±0.00487
w	0.41945	±0.03983
A	0.00042	±0.00008

90 mV s⁻¹

Variável	Módulo	Erro
y0	-0.0002	±0.00009
xc	0.66427	±0.00506
w	0.42062	±0.0388
A	0.00046	±0.00009

100 mV s⁻¹

Variável	Módulo	Erro
y0	-0.00019	±0.00008
xc	0.66421	±0.0046
w	0.41022	±0.03433
A	0.00048	±0.00008

110 mV s⁻¹

Variável	Módulo	Erro
y0	-0.00021	±0.00009
xc	0.66564	±0.00471
w	0.41238	±0.03417
A	0.00053	±0.00009

POLI(2-HFA) - Picos de redução na velocidade de:

10 mV s⁻¹

Variável	Módulo	Erro
y0	0.00002	±0.00002
xc	0.52063	±0.00595
w	0.41707	±0.06165
A	-0.00005	±0.00002

20 mV s⁻¹

Variável	Módulo	Erro
y0	0.00002	±0.00002
xc	0.51022	±0.00522
w	0.40983	±0.04739
A	-0.00008	±0.00002

30 mV s⁻¹

Variável	Módulo	Erro
y0	-0.00002	±9.9894E-6
xc	0.49487	±0.00473
w	0.3477	±0.02404
A	-0.00008	±8.7679E-6

40 mV s⁻¹

Variável	Módulo	Erro
y0	-0.00003	±0.00001
xc	0.48306	±0.00474
w	0.34367	±0.02534
A	-0.00009	±0.00001

50 mV s⁻¹

Variável	Módulo	Erro
y0	-0.00004	±0.00002
xc	0.47879	±0.00464
w	0.34283	±0.02615
A	-0.00011	±0.00001

60 mV s⁻¹

Variável	Módulo	Erro
y0	-0.00004	±0.00002
xc	0.47374	±0.00442
w	0.3583	±0.02396
A	-0.00014	±0.00002

70 mV s⁻¹

Variável	Módulo	Erro
y0	-0.00005	±0.00002
xc	0.47084	±0.00441
w	0.36165	±0.02587
A	-0.00016	±0.00002

80 mV s⁻¹

Variável	Módulo	Erro
y0	-0.00005	±0.00002
xc	0.46767	±0.00431
w	0.37101	±0.02468
A	-0.00019	±0.00002

90 mV s⁻¹

Variável	Módulo	Erro
y0	-0.00005	±0.00003
xc	0.46435	±0.00429
w	0.37429	±0.02463
A	-0.00021	±0.00002

100 mV s⁻¹

Variável	Módulo	Erro
y0	-0.00005	±0.00003
xc	0.46207	±0.00415
w	0.38225	±0.02251
A	-0.00024	±0.00002

110 mV s⁻¹

Variável	Módulo	Erro
y0	-0.00005	±0.00003
xc	0.45933	±0.00417
w	0.38604	±0.02487
A	-0.00027	±0.00003

Deconvolução da Figura 65 A - POLI(2-HFA) – Oxidação das Bases Nitrogenadas

Variável	Módulo	Erro
y0	0.12649	±0.0011
xc1	61.7635	±1.70777
w1	84.2542	±4.20856
A1	6.25221	±0.43137
xc2	142.96634	±1.04494
w2	313.62579	±2.48768
A2	96.22635	±1.05527
Xc3	142.96634	±1.04494
W3	313.62579	±2.48768
A3	96.22635	±1.05527
Xc4	142.96634	±1.04494
W4	313.62579	±2.48768
A4	96.22635	±1.05527

Deconvolução da Figura 65 B - POLI(3-HFA) – Oxidação das Bases Nitrogenadas

Variável	Módulo	Erro
y0	0	±0
xc1	782.52645	±2.4976
w1	192.87408	±5.5149
A1	6.52321	±0.16288
xc2	1021.38663	±0.96821
w2	114.2147	±1.13139
A2	30.42324	±0.58706
Xc3	1158.07532	±1.06529
W3	134.1073	±3.14975
A3	33.59868	±2.06728
Xc4	1355.80003	±3.43832
W4	293.88748	±10.35915
A4	69.526	±2.60798

Deconvolução da Figura 65 C - POLI(4-HFA) – Oxidação das Bases Nitrogenadas

Variável	Módulo	Erro
y0	0	±0
xc1	777.05215	±1.28698
w1	162.7286	±2.86187
A1	3.59289	±0.05306
xc2	1050.50584	±3.21025
w2	141.9037	±2.76435
A2	14.46075	±0.86475
Xc3	1208.55052	±1.66651
W3	158.11828	±8.25956
A3	19.82442	±1.64356
Xc4	1383.19553	±5.85719
W4	153.89983	±7.06705
A4	9.7655	±0.91274

Deconvolução da Figura 73 A - SPAM

Variável	Módulo	Erro
y0	0.12649	±0.0011
xc1	61.7635	±1.70777
w1	84.2542	±4.20856
A1	6.25221	±0.43137
xc2	142.96634	±1.04494
w2	313.62579	±2.48768
A2	96.22635	±1.05527

DECONVOLUÇÃO DA FIGURA 73 B - SPAM: IgG+

Variável	Módulo	Erro
y0	0.12160	±0.00078
xc1	74.48256	±2.15186
w1	89.07089	±5.36489
A1	4.01161	±0.34529
xc2	155.9935	±1.35413
w2	314.00939	±3.07913
A2	56.6005	±0.76656

- ¹Scognamiglio, V.; "Nanotechnology in glucose monitoring: Advances and challenges in the last 10 years". *Biosensors and Bioelectronics*, 47, **2013**, 12–25.
- ²Shirakawa, H. and Ikeda, S.; "Infrared Spectra of Poly(acetylene)". *Polymer Journal*, 2, **1970**, 231-244.
- ³Shirakawa, H. and Ikeda, S.; "Cyclotrimerization of acetylene by the tris(acetylacetonato)titanium(III)-diethylaluminum chloride system". *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition*, 12, **1974**, 929-937.
- ⁴Shirakawa, H., Louis, E. J., MacDiarmid, A.G., Chiang, C.K. and Heeger, A.J.; "Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, (CH)_x". *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1, **1977**, 578 - 580.
- ⁵Maia, D.J., De Paoli, M.-A., Alves, O.L., Zarbin, A.J.G. and Neves, S. D.; "Síntese de polímeros condutores em matrizes sólidas hospedeiras". *Química Nova*, 23, **2000**, 204-215.
- ⁶MacDiarmid, A.G.; "Synthetic metals": a novel role for organic polymers". *Current Applied Physics*, 1, **2001**, 269-279.
- ⁷Lange, U., Roznyatovskaya, N.V. and Mirsky, V.M.; "Conducting polymers in chemical sensors and arrays". *Analytica Chimica Acta*, 614, **2008**, 1-26.
- ⁸Adhikari, B. and Majumdar, S.; "Polymers in sensor applications". *Progress in Polymer Science*, 29, **2004**, 699-766.
- ⁹Schultze, J.W. and Karabulut, H.; "Application potential of conducting polymers". *Electrochimica Acta*, 50, **2005**, 1739-1745.
- ¹⁰Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska O., Oliwa K. and Adley, C.; "An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors". *Biotechnology Advances*, 28, **2010**, 232–254.
- ¹¹Kanatzidis, M.G.; "Polymeric Electrical Conductors". *Chemical and Engineering News*, 3, **1990**, 36-54.
- ¹²Bredas, J.L. and Street, G.B.; "Polarons, bipolarons, and solitons in conducting polymers". *Accounts of Chemical Research*, 18, **1985**, 309-315.
- ¹³Chandrasekhar, P. *Conducting Polymers, Fundamentals and Applications: A Practical Approach*, (Springer, 1999).
- ¹⁴Chung, T.C., Kaufman, J.H., Heeger, A.J. and Wudl, F. *Physical Review B*, 30, **1984**, 702-710.
- ¹⁵Otero, T.F., Grande, H. and Rodriguez, J. *Electrochimica Acta*, 41, **1996**, 1863-1869.
- ¹⁶Wallace, G.G., Spinks, G.M., Kane-Maguire, L.A.P. and Teasdale, P.R. *Conductive Electroactive Polymers: Intelligent Materials Systems*, (CRC Press, 2003).

- ¹⁷Eramo, G., Pineri, M., Schultze, J.W. and Vorotyntsev, M.A.; "Electron and proton conducting polymers: recent developments and prospects". *Electrochimica Acta*, 45, **2000**, 2403-2421.
- ¹⁸D'Eramo, F., Zón, M.A., Fernández, H., Sereno, L. and Arévalo, A.H.; "Studies of a novel conducting polymer by cyclic and square wave voltammetries: Its synthesis and characterization". *Electrochimica Acta*, 53, **2008**, 7182-7190.
- ¹⁹Eftekhari, A. and Jafarkhani, P.; "Polymerization of aniline through simultaneous chemical and electrochemical routes". *Polymer journal*, 38, 2006, 651-658.
- ²⁰Skotheim, T.A. *Handbook of Conducting Polymers*, (CRC, 1997).
- ²¹Zoppi, R.A. and De Paoli, M.A.; "Aplicações Tecnológicas de Polímeros Intrinsecamente Condutores: Perspectivas Atuais ". *Química Nova*, 16, **1993**, 560-569.
- ²²Tan, K.L., Tan, B.T.G., Khor, S.H., Neoh, K.G. and Kang, E.T.; "The effects of synthesis conditions on the characteristics and chemical structures of polyaniline: A comparative study". *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 52, **1991**, 673-680.
- ²³Wan, M.; "The influence of polymerization method and temperature on the absorption spectra and morphology of polyaniline". *Synthetic Metals*, 31, **1989**, 51-59.
- ²⁴Nalwa, H.S. *Handbook of Organic Conductive Molecules and Polymers*, (John Wiley & Sons, 1996).
- ²⁵Medeiros, E. S., Oliveira, J. E., Consolin-Filho, N., Paterno, L. J., Mattoso, L. H. C.; "Uso de Polímeros Condutores em Sensores. Parte 1: Introdução aos polímeros condutores" *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, 7, **2012**, 62-77.
- ²⁶Colvin, V.L., Schlamp, M.C. and Alivisatos, A.P.; "Light-emitting diodes made from cadmium selenide nanocrystals and a semiconducting polymer". *Nature*, 370, **1994**, 354-357.
- ²⁷Greenham, N.C., Moratti, S.C., Bradley, D.D.C., Friend, R.H. and Holmes, A.B.; "Efficient light-emitting diodes based on polymers with high electron affinities". *Nature*, 365, **1993**, 628-630.
- ²⁸Grem, G., Leditzky, G., Ullrich, B. and Leising, G.; "Realization of a blue-light-emitting device using poly(p-phenylene)". *Advanced Materials*, 4, **1992**, 36-37.
- ²⁹Strukelj, M., Papadimitrakopoulos, F., Miller, T.M. and Rothberg, L.J.; "Design and Application of Electron-Transporting Organic Materials". *Science*, 267, **1995**, 1969-1972.
- ³⁰Raistrick, I.D. *Electrochemistry of Semiconductors and Electronics: Processes and Devices*, (William Andrew Inc, 1992).
- ³¹Li, F. and Albery, W.J.; "Electrochemical polymerization of poly(thiophene-3-ethyl acetate) -- a new candidate for a rechargeable battery cathode". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 302, **1991**, 279-284.
- ³²Roman, L.S., Andersson, M.R., Yohannes, T. and Inganás, O.; "Photodiode performance and nanostructure of polythiophene/C60 blends". *Advanced Materials*, 9, **1997**, 1164-1168.

- ³³Gazotti Jr, W.A., Casalbore-Miceli, G., Geri, A. and de Paoli, M.A.; "A Solid-State Electrochromic Device Based on Two Optically Complementary Conducting Polymers". *Advanced Materials*, 10, **1998**, 60-64.
- ³⁴Sapp, S.A., Sotzing, G.A., Reddinger, J.L. and Reynolds, J.R.; "Rapid switching solid state electrochromic devices based on complementary conducting polymer films". *Advanced Materials*, 8, **1996**, 808-811.
- ³⁵Sansinena, J.M., Olazábal, V., Otero, T.F., Polo da Fonseca, C.N. and De Paoli, M.-A.; "A solid state artificial muscle based on polypyrrole and a solid polymeric electrolyte working in air". *Chemical Communications*, 1, **1997**, 2217 - 2218.
- ³⁶Wung, C.J., Pang, Y., Prasad, P.N. and Karasz, F.E.; "Poly(p-phenylene vinylene)-silica composite: a novel sol-gel processed non-linear optical material for optical waveguides". *Polymer*, 32, **1991**, 605-608.
- ³⁷Gardner, J.W. and Bartlett, P.N.; "Design of conducting polymer gas sensors: Modelling and experiment". *Synthetic Metals*, 57, **1993**, 3665-3670.
- ³⁸Kuwabata, S. and Martin, C.R.; "Mechanism of the Amperometric Response of a Proposed Glucose Sensor Based on a Polypyrrole-Tubule-Impregnated Membrane". *Analytical Chemistry*, 66, **1994**, 2757-2762.
- ³⁹Castro, C.M., Vieira, S.N., Gonçalves, R.A., Brito-Madurro, A.G. and Madurro, J.M.; "Electrochemical and morphologic studies of nickel incorporation on graphite electrodes modified with polytyramine". *Journal of Materials Science*, 43, **2008**, 475-482.
- ⁴⁰Hable, C.T. and Wrighton, M.S.; "Electrocatalytic oxidation of methanol and ethanol: a comparison of platinum-tin and platinum-ruthenium catalyst particles in a conducting polyaniline matrix". *Langmuir*, 9, **1993**, 3284-3290.
- ⁴¹Lofrano, R.C.Z., Madurro, J.M., Abrantes, L.M. and Romero, J.R.; "Electrocatalytic hydrogenation of carbonylic compounds using an electrode with platinum particles dispersed in films of poly-[allyl ether p-(2-aminoethyl)phenol] co-polymerized with allyl phenyl ether". *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 218, **2004**, 73-79.
- ⁴²Kivelson, S. and Heeger, A.J.; "Intrinsic conductivity of conducting polymers". *Synthetic Metals*, 22, **1988**, 371-384.
- ⁴³Lei, J., Cai, Z. and Martin, C.R.; "Effect of reagent concentrations used to synthesize polypyrrole on the chemical characteristics and optical and electronic properties of the resulting polymer". *Synthetic Metals*, 46, **1992**, 53-69.
- ⁴⁴Brazovskii, S. and Kirova, N.; "Optics of polymers in the light of solid state physics". *Synthetic Metals*, 125, **2001**, 129-138.

- ⁴⁵Ismail, K.M., Khalifa, Z.M., Azzem, M.A. and Badawy, W.A.; "Electrochemical preparation and characterization of poly(1-amino-9,10-anthraquinone) films". *Electrochimica Acta*, 47, **2002**, 1867-1873.
- ⁴⁶Chen, S.-M. and Fa, Y.-H.; "The electropolymerization and electrocatalytic properties of polymerized new fuchsin film modified electrodes". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 553, **2003**, 63-75.
- ⁴⁷Blanco-López, M.C., Lobo-Castañón, M.J., Miranda-Ordieres, A.J. and Tuñón-Blanco, P.; "Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23, **2004**, 36-48.
- ⁴⁸Souza, M. F. B.; "Eletrodos quimicamente funcionalizados aplicados à eletroanálise: Uma breve abordagem". *Química Nova*, 20, **1997**, 191-195.
- ⁴⁹Mekhalif, Z., Cossement, D., Hevesi, L. and Delhalle, J.; "Electropolymerization of pyrrole on silanized polycrystalline titanium substrates". *Applied Surface Science*, 254, **2008**, 4056-4062.
- ⁵⁰Fungaro, D.A. and Brett, C.M.A.; "Eletrodos funcionalizados com polímeros perfluorados e sulfonados: aplicações em análises ambientais". *Química Nova*, 23, **2000**, 805-811.
- ⁵¹Breme, F., Buttstaedt, J. and Emig, G.; "Coating of polymers with titanium-based layers by a novel plasma-assisted chemical vapor deposition process". *Thin Solid Films*, 377-378, **2000**, 755-759.
- ⁵²Plueddemann, E.P. *Silane Coupling Agents*, (Plenum Press, New York, 1991).
- ⁵³Luzinov, I., Julthongpiput, D., Liebmann-Vinson, A., Cregger, T., Foster, M.D. and Tsukruk, V.V.; "Epoxy-Terminated Self-Assembled Monolayers: Molecular Glues for Polymer Layers". *Langmuir*, 16, **2000**, 504-516.
- ⁵⁴Mekhalif, Z., Cossement, D., Hevesi, L. and Delhalle, J.; "Electropolymerization of pyrrole on silanized polycrystalline titanium substrates". *Applied Surface Science*, 254, **2008**, 4056-4062.
- ⁵⁵Justino, C.I.L., Rocha-Santos, T.A. and Duarte, A.C. "Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications". *Trends in Analytical Chemistry*, 29, **2010**, 1172-1183.
- ⁵⁶Bernius, M. T., Inbasekaran, M., O'Brien, J. and Wu, W. S.; "Progress with light-emitting polymers". *Advanced Materials*, 12, **2000**, 1737-1750.
- ⁵⁷Coakley, K. M. and McGehee, M. D.; "Conjugated polymer photovoltaic cells". *Chemistry of Materials*, 16, **2004**, 4533-4542.
- ⁵⁸Gunes, S., Neugebauer, H. and Sariciftci, N. S.; "Conjugated polymer-based organic solar cells". *Chemical Reviews*, 107, **2007**, 1324-1338.
- ⁵⁹Raposo, M. and Oliveira, O. N.; "Energies of Adsorption of Poly(o-methoxyaniline) Layer-by-Layer Films". *Langmuir*, 16, **2000**, 2839-2844.

- ⁶⁰McQuade, D. T., Pullen, A. E. and Swager T. M.; "Conjugated polymer-based chemical sensors". *Chemical Reviews*, 100, **2000**, 2537-2374.
- ⁶¹Schwartz, B. J.; "Conjugated polymers as molecular materials: How chain conformation, film morphology influence energy transfer and interchain interactions". *Annual Review of Physical Chemistry*, 54, **2003**; 141-172.
- ⁶²Gerard, M., Chaubey, A. and Malhotra, B. D.; "Application of conducting polymers to biosensors". *Biosensors & Bioelectronics*, 17, **2002**, 345-359.
- ⁶³Rahman, M. A., Kumar, P., Park, D. S. and Shim, Y. B.; "Electrochemical sensors based on organic conjugated polymers". *Sensors*, 8, **2008**, 118-141.
- ⁶⁴Winqvist, F.; "Voltammetric electronic tongues – basic principles and applications". *Microchimica Acta*, 163, **2008**, 3-10.
- ⁶⁵Vidal, J. C., Garcia-Ruiz, E. and Castillo, J. R.; "Recent advances in electropolymerized conducting polymers in amperometric biosensors". *Microchimica Acta*, 143, **2003**; 93-111.
- ⁶⁶Pereira, A. C., Santos, A. D. and Kubota, L. T.; "Trends in amperometric electrodes modification for electroanalytical applications". *Quimica Nova*, 25, **2002**, 1012-1021.
- ⁶⁷Zajoncova, L. and Pospiskova, K.; "Membranes for Amperometric Biosensors". *Chemicke Listy*, 103, **2009**, 291-301.
- ⁶⁸Singh, M., Kathuroju, P. K. and Jampana, N.; "Polypyrrole based amperometric glucose biosensors". *Sensors and Actuators B-Chemical*, 143, **2009**, 430-443.
- ⁶⁹Scampicchio, M., Ballabio, D., Arecchi, A., Cosio, S. M. and Mannino, S.; "Amperometric electronic tongue for food analysis". *Microchimica Acta*, 163, **2008**, 11-21.
- ⁷⁰Wang, Y., Xu, H., Zhang, J. M. and Li, G.; "Electrochemical sensors for clinic analysis". *Sensors*, 8, **2008**, 2043-2081.
- ⁷¹Chou, C. H, Chang, J. L. and Zen, J. M.; "Homogeneous Platinum-Deposited Screen-Printed Edge Band Ultramicroelectrodes for Amperometric Sensing of Carbon Monoxide". *Electroanalysis*, 21, **2009**, 206-209.
- ⁷²Meena, A. and Rajendran, L.; "Analytical solution of system of coupled non-linear reaction diffusion equations. Part I: Mediated electron transfer at conducting polymer ultramicroelectrodes". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 647, **2010**, 103-116.
- ⁷³Macpherson, J. V. and Simjee, N.; "Unwin PR. Hydrodynamic ultramicroelectrodes: kinetic and analytical applications". *Electrochimica Acta*, 47, **2001**, 29-45.
- ⁷⁴Rebouillat, S., Lyons, M. E. G.; "Flynn A. Mediated electron transfer at conducting polymer ultramicroelectrodes". *Analyst*, 125, **2000**, 1611-1628.
- ⁷⁵Jaffrezic-Renault, N. "Analytical electrochemistry for environment: electrochemical microsensors for the in situ monitoring of pollutants". *Actualite Chimique*, **2009**, 52-55.

- ⁷⁶Gebicki, J. and Chachulski, B.; "Metrological parameters of sulphur dioxide amperometric sensor containing addition of aprotic solvents". *Sensors and Actuators B Chemical*, 141,**2009**, 249-255.
- ⁷⁷Bencsik, G., Janaky, C., Endrodi, B. and Visy, C.; "Electrocatalytic properties of the polypyrrole/magnetite hybrid modified electrode towards the reduction of hydrogen peroxide in the presence of dissolved oxygen". *Electrochimica Acta*, 73,**2012**,53-58.
- ⁷⁸Stasyuk, N., Smutok, O., Gayda, G., Vus, B., Koval'chuk, Y. and Gonchar, M.; "Bi-enzyme L-arginine-selective amperometric biosensor based on ammonium-sensing polyaniline-modified electrode". *Biosensors & Bioelectronics*, 37,**2012**, 46-52.
- ⁷⁹Babu, T.G. S., Varadarajan, D., Murugan, G., Ramachandran, T. and Nair, B. G.; "Gold nanoparticle polypyrrole composite modified TiO₂ nanotube array electrode for the amperometric sensing of ascorbic acid". *Journal of Applied Electrochemistry*, 42, **2012**, 427-434.
- ⁸⁰Zade, S. S., Zamoshchik, N. and Bendikov, M.; "From Short Conjugated Oligomers to Conjugated Polymers. Lessons from Studies on Long Conjugated Oligomers". *Accounts of Chemical Research*, 44, **2011**, 14-24.
- ⁸¹Jing, X. B., Wang, L. X., Wang, X. H., Geng, Y. H., Wang, F. S.; "Synthesis, structure, properties and applications of conducting polyaniline". *Acta Polymerica Sinica*, **2005**, 1, 655-663.
- ⁸²Lapiente, R., Cases, F., Garcés, P., Morallón, E. and Vázquez, J.L.; "A voltammetric and FTIR-ATR study of the electropolymerization of phenol on platinum electrodes in carbonate medium: Influence of sulfide". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 451, **1998**, 163-171.
- ⁸³Yang, H. and Bard, A.J.; "The application of fast scan cyclic voltammetry. Mechanistic study of the initial stage of electropolymerization of aniline in aqueous solutions". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 339, **1992**, 423-449.
- ⁸⁴Yamada, K., Teshima, K., Kobayashi, N. and Hirohashi, R.; "Electropolymerization of aniline derivatives in non-aqueous solution without a proton donor". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 394, **1995**, 71-79.
- ⁸⁵Chiang, J.-C. and MacDiarmid, A.G.; "Polyaniline: Protonic acid doping of the emeraldine form to the metallic regime". *Synthetic Metals*, 13, **1986**, 193-205.
- ⁸⁶Gattrell, M. and Kirk, D.W.; "A Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study of the Passive Film Produced during Aqueous Acidic Phenol Electro-oxidation". *Journal of the Electrochemical Society*, 139, **1992**, 2736-2744.
- ⁸⁷Vieira, S.N., Ferreira, L.F., Franco, D.L., Afonso, A.S., Gonçalves, R.A., Brito-Madurro, A.G. and Madurro, J.M.; "Electrochemical Modification of Graphite Electrodes with Poly(4-aminophenol)". *Macromolecular Symposia*, 245-246, **2006**, 236-242.

- ⁸⁸Franco, D.L., Afonso, A.S., Vieira, S.N., Ferreira, L.F., Gonçalves, R.A., Brito-Madurro, A.G. and Madurro, J.M.; "Electropolymerization of 3-aminophenol on carbon graphite surface: Electric and morphologic properties". *Materials Chemistry and Physics*, 107, **2008**, 404-409.
- ⁸⁹Silva, F., Vieira, S., Goulart, L., Boodts, J., Brito-Madurro, A. and Madurro, J. M.; "Electrochemical Investigation of Oligonucleotide-DNA Hybridization on Poly(4-Methoxyphenethylamine)". *International Journal of Molecular Sciences*, 9, **2008**, 1173-1187.
- ⁹⁰Silva, T.A.R., Ferreira, L.F., Boodts, J.F.C., Eiras, S.P., Madurro, J. M. and Brito-Madurro, A. G.; "Poly(4-hydroxyphenylacetic acid): A new material for immobilization of biomolecules". *Polymer Engineering & Science*, 48, **2008**, 1963-1970.
- ⁹¹Franco, D.L., Afonso, A.S., Ferreira, L.F., Gonçalves, R.A., Boodts, J.F.C., Brito-Madurro, A.G. and Madurro, J.M.; "Electrodes modified with polyaminophenols: Immobilization of purines and pyrimidines". *Polymer Engineering & Science*, 48, **2008**, 2043-2050.
- ⁹²Silva, T.A.R., Ferreira, L.F., Souza, L.M., Goulart, L.R., Madurro, J.M. and Brito-Madurro, A.G.; "New approach to immobilization and specific-sequence detection of nucleic acids based on poly(4-hydroxyphenylacetic acid)". *Materials Science and Engineering: C*, 29, **2009**, 539-545.
- ⁹³Brito-Madurro, A., Ferreira, L., Vieira, S., Ariza, R., Filho, L. and Madurro, J. M.; "Immobilization of purine bases on a poly-4-aminophenol matrix". *Journal of Materials Science*, 42, **2007**, 3238-3243.
- ⁹⁴Ferreira, L.F., Boodts, J.F.C., Brito-Madurro, A.G. and Madurro, J.M.; "Gold electrodes modified with poly(4-aminophenol): incorporation of nitrogenated bases and an oligonucleotide". *Polymer International*, 57, **2008**, 644-650.
- ⁹⁵da Silva, T. V. S., Teixeira, R. R., Franco, D. L., Madurro, J. M., Brito-Madurro, A. G., Espindola, F. S.; "Bioelectrode for detection of human salivary amylase". *Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems (Print)*, 32, **2012**, 530-535.
- ⁹⁶Coelho, N. M., Melo, E. I., Rezende, H. C., Madurro, A. G. B., Madurro, J. M.; "Surface properties of sensors based on aminophenol-polymerized film". *Journal of Solid State Electrochemistry*, 16, **2012**, 945-951.
- ⁹⁷Iost, R. M., Silva, W. C., Madurro, J. M., Brito-Madurro, A. G., Ferreira, L. F., Crespilho, F. N.; "Recent advances in nano-based electrochemical biosensors: application in diagnosis and monitoring of diseases". *Frontiers in Bioscience*, 3, **2011**, 663-689.
- ⁹⁸Iost, R. M., Madurro, J.M., Brito-Madurro, A. G., Nantes, I. L., Caseli, L., Crespilho, F. N.; "Strategies of Nano-Manipulation for Application in Electrochemical Biosensors". *International Journal of Electrochemical Science*, 6, **2011**, 2965-2997.

- ⁹⁹Ferreira, L. F., Souza, L. M., Franco, D.L., Castro, A.C. H., Oliveira, A. A., Boodts, J.F. C., Brito-Madurro, A. G., Madurro, J. M.; "Formation of novel polymeric films derived from 4-hydroxybenzoic acid". *Materials Chemistry and Physics*, 129,**2011**, 46-52.
- ¹⁰⁰Oliveira, R. M. L., Vieira, S.N., Alves, H.C., França, E.G., Franco, D. L., Ferreira, L.F., Brito-Madurro, A. G., Madurro, J.M.; "Electrochemical and morphological studies of an electroactive material derived from 3-hydroxyphenylacetic acid: a new matrix for oligonucleotide hybridization". *Journal of Materials Science*, 45, **2010**, 475-482.
- ¹⁰¹Afonso, A. S., Goulart, L. R., Goulart, I. M. B., Machado, A. E. H., Madurro, J.M., Brito-Madurro, A. G.; "A promising bioelectrode based on gene of Mycobacterium leprae immobilized onto poly(4-aminophenol)". *Journal of Applied Polymer Science*, 118, **2010**, 2921-2928.
- ¹⁰²Cosnier, S.; "Biosensors based on electropolymerized films: new trends". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377, **2003**, 507-520.
- ¹⁰³Pathak, P. Katiyar, V. K. and GIRI, S.; "Cancer Research - Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer Research". *AZojono Journal of Nanotechnology*, 3,**2007**.
- ¹⁰⁴Lui, C.,Cady, N.C., Batt, C. A. "Nucleic Acid-based Detection of Bacterial Pathogens Using Integrated Microfluidic Platform Systems". *Sensors*, 9, **2009**, 3713-3744.
- ¹⁰⁵Gooding, J.J.; "Biosensor technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends". *Analytica Chimica Acta*, 559, **2006**, 137-151.
- ¹⁰⁶D'Orazio, P.; "Biosensors in clinical chemistry". *Clinica Chimica Acta*, 334, **2003**, 41-69.
- ¹⁰⁷Lee, J.-O., So, H.-M., and Hwan, Y.; "Aptamers as Molecular Recognition Elements for ElectricalNanobiosensors". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390,**2008**, 1023-1032.
- ¹⁰⁸Ramanathan, K., Bangar, M.A., Yun, M., Chen, W., Myung, N.V.and Mulchandani, A.; "Bioaffinity Sensing Using Biologically Functionalized Conducting-Polymer Nanowire". *Journal of the American Chemical Society*, 127, **2004**, 496-497.
- ¹⁰⁹Ramanathan, K., Pandey, S.S., Kumar, R., Gulati, A., Murthy, A.S.N.and Malhotra, B.D.; "Covalent immobilization of glucose oxidase to poly(o-amino benzoic acid) for application to glucose biosensor". *Journal of Applied Polymer Science*, 78, **2000**, 662-667.
- ¹¹⁰Mikkelsen, S.R.and Corton, E.; "Bioanalytical Chemistry". *John Wiley and Sons*, (New Jersey, 2004)
- ¹¹¹Sharma, S.K., Sehgal, N.and Kumar, A.; "Biomolecules for development of biosensors and their applications". *Current Applied Physics*, 3, **2003**, 307-316.
- ¹¹²Mello, L.D.and Kubota, L.T.; "Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries". *Food Chemistry*, 77, **2002**, 237-256.

- ¹¹³Liu, S., Ye, L., He, P. and Fang, Y.; "Voltammetric determination of sequence-specific DNA by electroactive intercalator on graphite electrode". *Analytica Chimica Acta*, 335, **1996**, 239-243.
- ¹¹⁴Swaile, B.A.H. and Chambers, J.Q.; "Electrochemical release of ethidium into and fluorescence detection of DNA-ethidium complexes in the diffusion layer at a carbon paste electrode". *Analytical Biochemistry*, 196, **1991**, 415-420.
- ¹¹⁵Zhu, N.N., Zhang, A.P., Wang, Q.J., He, P.G. and Fang, Y.Z.; "Electrochemical detection of DNA hybridization using methylene blue and electro-deposited zirconia thin films on gold electrodes". *Analytica Chimica Acta*, 510, **2004**, 163-168.
- ¹¹⁶Zhu, N., Chang, Z., He, P. and Fang, Y.; "Electrochemically fabricated polyaniline nanowire-modified electrode for voltammetric detection of DNA hybridization". *Electrochimica Acta*, 51, **2006**, 3758-3762.
- ¹¹⁷Teles, F.R.R. and Fonseca, L.P.; "Trends in DNA biosensors". *Talanta*, 77, **2008**, 606-623.
- ¹¹⁸Radstrom, P., Backman, A., Qian, N., Kragstjerg, P., Pahlson, C. and Olcen, P.; "Detection of bacterial DNA in cerebrospinal fluid by an assay for simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and streptococci using a seminested PCR strategy". *Journal of Clinical Microbiology*, 32, **1994**, 2738-2744.
- ¹¹⁹Azzazy, H. M. and Highsmith, W.E. Jr.; "Phage display technology: clinical applications and recent innovations". *Clinical Biochemistry*, 35, **2002**, 425-445.
- ¹²⁰Parcm3ey, S. and Smith, G.; "Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes". *Gene*, 73, 1988, 305-318.
- ¹²¹Smith, G. P.; "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface". *Science*, 228, **1985**, 1315-1317.
- ¹²²Stephen, C. W. and Lane, D. P.; "Mutant conformation of p53. Precise epitope mapping using a filamentous phage epitope library". *Journal of Molecular Biology*, 225, **1992**, 577-583.
- ¹²³Rowley, M. J., O'Connor, K. and Wijeyewickrema, L.; "Phage display for epitope determination: a paradigm for identifying receptor-ligand interactions". *Biotechnology annual review*, 10, **2004**, 151-188.
- ¹²⁴Petrenko, V. C.; "Evolution of phage display: from bioactive peptides to bioselective nanomaterials". *Expert Opinion on Drug Delivery*, 5, **2008**, 1-12.
- ¹²⁵Hemminga, M. A., Vos, W. L., Nazarov, P. V., Koehorst, R. B. M., Wolfs, C. J. A. M., Spruijt, B. and Stopa, D.; "Viruses: incredible nanomachines. New advances with filamentous phages". *European Biophysics Journal*, 39, 2010, 541-550.
- ¹²⁶Santos, P.S.; "Epítopos imunodominantes da MSP1a de *Anaplasma marginale* e suas aplicações diagnósticas e vacinais". Tese de Doutorado, 2011, Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

- ¹²⁷Liu, A., Wang, K., Weng, S., Lei, Y., Lin, L., Chen, W., Lin, X. and Chen, Y.; "Development of electrochemical DNA biosensors". *Trends in Analytical Chemistry*, 37, **2012**, 101-111.
- ¹²⁸Freudenrich, C.; "Como funciona o DNA". Disponível em: <http://saude.hsw.uol.com.br/dna1.htm>; , 2009, Acesso em: 31/05/2013.
- ¹²⁹Vinícius, M.; "DNA". Disponível em: <http://www.universitario.com.br/celo/topicos/subtopicos/genetica/dna/dna.htm3>, 2012, Acesso em: 31/05/2013.
- ¹³⁰Watson, J.D. and Crick, F.H.C.; "Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid". *Nature*, 171, **1953**, 737-738.
- ¹³¹Pividori, M.I., Merkoçi, A. and Alegret, S.; "Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods". *Biosensors and Bioelectronics*, 15, **2000**, 291-303.
- ¹³²Wang, J., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H. and Dontha, N.; "Nucleic-acid immobilization, recognition and detection at chronopotentiometric DNA chips". *Biosensors and Bioelectronics*, 12, **1997**, 587-599.
- ¹³³Palecek, E., Tomschik, M., Stankova, V. and Havran, L.; "Chronopotentiometric Stripping of DNA at Mercury Electrodes". *Electroanalysis*, 9, **1997**, 990-997.
- ¹³⁴Wang, J., Cai, X., Rivas, G. and Shiraishi, H.; "Stripping potentiometric transduction of DNA hybridization processes". *Analytica Chimica Acta*, 326, **1996**, 141-147.
- ¹³⁵Liu, J., Li, J. and Dong, S.; "Interaction of brilliant cresyl blue and methylene green with DNA studied by spectrophotometric and voltammetric methods". *Electroanalysis*, 8, **1996**, 803-807.
- ¹³⁶Erdem, A., Meric, B., Kerman, K., Dalbasti, T. and Ozsoz, M.; "Detection of Interaction Between Metal Complex Indicator and DNA by Using Electrochemical Biosensor". *Electroanalysis*, 11, **1999**, 1372-1376.
- ¹³⁷Marrazza, G., Chianella, I. and Mascini, M.; "Disposable DNA electrochemical sensor for hybridization detection". *Biosensors and Bioelectronics*, 14, **1999**, 43-51.
- ¹³⁸Erdem, A., Kerman, K., Meric, B., Akarca, U.S. and Ozsoz, M.; "Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus". *Analytica Chimica Acta*, 422, **2000**, 139-149.
- ¹³⁹Johnston, D.H. and Thorp, H.H.; "Cyclic Voltammetry Studies of Polynucleotide Binding and Oxidation by Metal Complexes: Homogeneous Electron-Transfer Kinetics". *The Journal of Physical Chemistry*, 100, **1996**, 13837-13843.
- ¹⁴⁰Jameson, J.L. and Hollenberg, A.N.; "Recent advances in studies of the molecular basis of endocrine disease". *Hormone and Metabolic Research*, 24, **1992**, 201-209.

- ¹⁴¹Baird, P.A., Anderson, T.W., Newcombe, H.B. and Lowry, R.B.; "Genetic disorders in children and young adults: A population study". *American Journal of Human Genetics*, 42, **1988**, 677-693.
- ¹⁴²McPherson, M.J., Quirke, P. and Taylor, G.R.; "PCR, a Practical Approach". IRL Press, 1993.
- ¹⁴³Keller, G.H. and Manak, M.M.; DNA Probes, (New York, 1989).
- ¹⁴⁴Loewy, Z.G. and Pottathil, R. Diagnostics in the Year 2000: Antibody, Biosensor and Nucleic Acid Technologies, (New York, 1993).
- ¹⁴⁵Watkins, T. I. and Woolfe, G.; "Effect of changing the quaternizing group on the trypanocidal activity of dimidium bromide". *Nature*. 169, **1952**, 506-507.
- ¹⁴⁶Lunn, G. and Sansone, E.B.; "Ethidium bromide: Destruction and decontamination of solutions". *Analytical Biochemistry*, 162, **1987**, 453-458.
- ¹⁴⁷Guo, M., Chen, J., Liu, D., Nie, L. and Yao, S.; "Electrochemical characteristics of the immobilization of calf thymus DNA molecules on multi-walled carbon nanotubes". *Bioelectrochemistry*, 62, **2004**, 29-35.
- ¹⁴⁸Matsumoto, Y., Terui, N. and Tanaka, S.; "Accumulated detection of ethidium bromide using a UV-irradiated DNA film modified electrode and its application for electrochemical detection of an environmental pollutant". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 610, **2007**, 193-198.
- ¹⁴⁹Minasyan, S.H., Tavadyan, L.A., Antonyan, A.P., Davtyan, H.G., Parsadanyan, M.A. and Vardevanyan, P.O.; "Differential pulse voltammetric studies of ethidium bromide binding to DNA". *Bioelectrochemistry*, 68, **2006**, 48-55.
- ¹⁵⁰Aleixo, L. M.; "Voltametria: Conceitos e Técnicas". Disponível em: www.chemkeys.com, o seu site de química. Acesso em 10/06/2013.
- ¹⁵¹Barker, G.C. and Jenkins, I.L.; "Square-wave polarography". *Analyst*, 77, **1952**, 685-696.
- ¹⁵²Chadwick, D. R.; "Viral meningitis". *British Medical Bulletin*, 75 and 76, **2005**; 1-14.
- ¹⁵³Krcméry, V. and Paradisi F.; "Nosocomial bacterial and fungal meningitis in children; an eight year national survey reporting 101 cases". *International Journal of Antimicrobial Agents*, 15, **2000**, 143-147.
- ¹⁵⁴Durand, M. L., Calderwood, S. B., Weber, D. J., Miller, S. I., Southwick, F. S., Caviness, V. S. Jr. and Swartz, M. N.; "Acute Bacterial Meningitis in adults". *The New England Journal of Medicine*, 328, **1993**, 21-28.
- ¹⁵⁵Cassady, R. A. and Whitley, R. J.; "Pathogenesis and pathophysiology of viral infections of the central nervous system". In Scheld, W. M., Whitley, R. J. and Durak, D. T.; (eds) "Infections of the Central Nervous System (2nd edn). Philadelphia: Lippincott-Raven", **1997**, 7-22.
- ¹⁵⁶Modlin, J. F.; "Update on enterovirus infections in infants children. *Advances in pediatric infectious diseases*". 12, **1997**, 80-155.

- ¹⁵⁷Echeverria, J. M., Casas, I., Tenorio, A., Ory, De F. and Martinez-Martinez P.; "Detection of Varicella-Zoster virus-specific DNA sequences in cerebrospinal fluid from patients with meningitis and no cutaneous lesions". *Journal of Medical Virology*, 43, **1994**, 331-355.
- ¹⁵⁸Leimann, B. C. Q. and Koifman R. J. "Official information systems for cryptococcal meningitis, state of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil". *Revista de Saúde Pública*, 43, **2009**, 1-4.
- ¹⁵⁹Bryan, C. S., Reynolds, K. L. and Crout, L. "Promptness of antibiotic therapy in acute bacterial meningitis". *Annals of Emergency*, 15, **1986**, 544-547.
- ¹⁶⁰Schuchat, A., Robinson, K., Wenger, J. D., Harrison, L. H., Farley, M., Reingold, A. L., Lefkowitz, L. and Perkins, B. A.; "Bacterial meningitis in the United States in 1995". *The new England Journal of Medicine*, 337, **1997**, 970-974.
- ¹⁶¹Chavanet, P., "Presumptive bacterial meningitis in adults: Initial antimicrobial therapy". *Médecine et maladies infectieuses*, 39, **2009**, 499-512.
- ¹⁶²Beek, D.; "Corticosteroids for acute adult bacterial meningitis". *Médecine et maladies infectieuses*, 39, **2009**, 531-538.
- ¹⁶³Nau, R. and Brück, W.; "Neuronal injury in bacterial meningitis: mechanisms and implications for therapy". *TRENDS in Neurosciences*, 25, **2002**, 38-45.
- ¹⁶⁴Chavanet, P., Schaller C., Levy, C., Flores-Cordero, J., Arens M., Piroth, L., Bingen, E. and Portier, H.; "Performance of a predictive rule to distinguish bacterial and viral meningitis". *Journal of Infection*, 54, **2007**, 328-336.
- ¹⁶⁵Reddy, S. B., Mainwaring, D. E., Kobaisi, M. A., Zeepongsekul, P. and Fecondo, J. V.; "Acoustic wave immunosensing of a meningococcal antigen using gold nanoparticle-enhanced mass sensitivity". *Biosensors and Bioelectronics*, 31, **2012**, 382- 387.
- ¹⁶⁶Patel, M. K., Solanki, P. R., Kumar, A., Khare S., Gupta, S. and Malhotra, B. D.; "Electrochemical DNA sensor for *Neisseria meningitidis* detection". *Biosensors and Bioelectronics*, 25, **2010**, 2586-2591.
- ¹⁶⁷ Patel, M. K., Solanki, P. R., Seth, S., Gupta, S., Khare, S., Kumar, A. and Malhotra, B.D.; "CtrA gene based electrochemical DNA sensor for detection of meningitis". *Electrochemistry Communications*, 11, **2009**, 969-973.
- ¹⁶⁸Riccardi, C. S., Costa, P. I. and Yamanaka, H.; "Imunossensor amperométrico". *Química Nova*, 25, **2002**, 316-320.
- ¹⁶⁹Skládal, P.; "Advances in electrochemical immunosensors". *Electroanalysis*, 9, **1997**, 737-745.
- ¹⁷⁰Morgan, C., Newman, D. and Price, C.; "Immunosensors: technology and opportunities in laboratory medicine". *Clinical Chemistry*, 42, **1996**, 193-209.

- ¹⁷¹Benjamin, D. C., Berzofsky, J. A., East, I. J., Gurd, F. R. N., Hannum, C., Leach, S., Margoliash, J. E., Michael, J. G., Miller, A., Prager, Reichlin, M., Sercarz, E. E., Smith-Gill, S. J., Todd, P. E. and Wilson, A. C.; "The antigenic structure of proteins: A reappraisal". *Annual Review of Immunology*, 2, **1984**, 67-101.
- ¹⁷²Nunes, G. S.; "Metodos imunoquimicos para análise de contaminante ambientais: conceitos, estado da arte e perspectivas". *Química Nova*, 28, **2005**, 462-471.
- ¹⁷³Riccia, F., Adornetto, G. and Palleschia, G.; "A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors". *Electrochimica Acta*, 84, **2012**, 74-83.
- ¹⁷⁴Tan, Y., Chu, X., Shen, G.-L. and Yu, R.-Q.; "A signal-amplified electrochemical immunosensor for aflatoxin B1 determination in rice". *Analytical Biochemistry*, 387, **2009**, 82-86.
- ¹⁷⁵Chen, H., Jiang, J.-H., Huang, Y., Deng, T., Li, J.-S., Shen, G.-L. and Yu, R.-Q.; "An electrochemical impedance immunosensor with signal amplification based on Au-colloid labeled antibody complex". *Sensors and Actuators B: Chemical*, 117, **2006**, 211-218.
- ¹⁷⁶Yang, L., Li, Y. and Erf, G.F.; "Interdigitated Array Microelectrode-Based Electrochemical Impedance Immunosensor for Detection of Escherichia coli O157:H7". *Analytical Chemistry*, 76, **2004**, 1107-1113.
- ¹⁷⁷Dijksma, M., Kamp, B., Hoogvliet, J.C. and van Bennekom, W.P.; "Development of an Electrochemical Immunosensor for Direct Detection of Interferon- γ at the Attomolar Level". *Analytical Chemistry*, 73, **2001**, 901-907.
- ¹⁷⁸Ouerghi, O., Senillou, A., Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., Ben Ouada, H. and Cosnier, S.; "Gold electrode functionalized by electropolymerization of a cyano N-substituted pyrrole: application to an impedimetric immunosensor". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 501, **2001**, 62-69.
- ¹⁷⁹Barsoukov, E. and MacDonald, J.R.; "Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment and application", 2nd Ed. Wiley Interscience, (2005, New Jersey).
- ¹⁸⁰Mandal, R., Salam, M. S. A., Chakrabarti, C. L. and Back, M. H.; "An Electrochemical Investigation of Complexation of Pb(II) by a Well-Characterized Fulvic Acid in Model Systems - Effect of Competition with Major Cations and Trace Metals". *Electroanalysis*, 15, **2003**, 903-906.
- ¹⁸¹Daniels, J. S. and Pourmand, N.; "Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges". *Electroanalysis*, 19, **2007**, 1239-1257.
- ¹⁸²Gu, H., Su, X. d. and Loh, K. P.; "Electrochemical Impedance Sensing of DNA Hybridization on Conducting Polymer Film-Modified Diamond". *The Journal of Physical Chemistry B*, 109, **2005**, 13611-13618.

- ¹⁸³Prodromidis, M. I.; "Impedimetric immunosensors-A review". *Electrochimica Acta*, **2009**, In Press.
- ¹⁸⁴Manesse, M., Stambouli, V., Boukherroub, R. and Szunerits, S.; "Electrochemical impedance spectroscopy and surface plasmon resonance studies of DNA hybridization on gold/SiO_x interfaces". *The Analyst*, **133**, **2008**, 1097-1103.
- ¹⁸⁵Ionescu, R. E., Jaffrezic-Renault, N., Bouffier, L., Gondran, C., Cosnier, S., Pinacho, D. G., Marco, M. P., Sánchez-Baeza, F. J., Healy, T. and Martelet, C.; "Impedimetric immunosensor for the specific label free detection of ciprofloxacin antibiotic". *Biosensors and Bioelectronics*, **23**, **2007**, 549-555.
- ¹⁸⁶Armstrong, F. A. and Wilson, G. S.; "Recent developments in faradaic bioelectrochemistry". *Electrochimica Acta*, **45**, **2000**, 2623-2645.
- ¹⁸⁷Suni, I. I.; "Impedance methods for electrochemical sensors using nanomaterials". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **27**, **2008**, 604-611.
- ¹⁸⁸Wang, R., Wang, Y., Lassiter, K., Li, Y., Hargis, B., Tung, S., Berghman, L. and Bottje, W.; "Interdigitated array microelectrode based impedance immunosensor for detection of avian influenza virus H5N1". *Talanta*, **79**, **2009**, 159-164.
- ¹⁸⁹Hnaïen, M., Diouani, M. F., Helali, S., Hafaid, I., Hassen, W. M., Renault, N. J., Ghram, A. and Abdelghani, A.; "Immobilization of specific antibody on SAM functionalized gold electrode for rabies virus detection by electrochemical impedance spectroscopy". *Biochemical Engineering Journal*, **39**, **2008**, 443-449.
- ¹⁹⁰Radi, A.-E., Muñoz-Berbel, X., Lates, V. and Marty, J.-L.; "Label-free impedimetric immunosensor for sensitive detection of ochratoxin A". *Biosensors and Bioelectronics*, **24**, **2009**, 1888-1892.
- ¹⁹¹Brown, W. C.; "Adaptive immunity to Anaplasma pathogens and immune dysregulation: Implications for bacterial persistence". *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, **35**, **2012**, 241–252.
- ¹⁹²Aubry, P. and Geale, D. W.; "A Review of Bovine Anaplasmosis". *Transboundary and Emerging Diseases*, **58**, **2011**, 1–30.
- ¹⁹³Guglielmone, A. A.; "Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America". *Veterinary Parasitology*, **57**, **1995**, 109-119.
- ¹⁹⁴de la Fuente, J., Garcia-Garcia, J. C., Blouin, E. F., McEwen, B. R., Clawson, D. and Kocan, K. M.; "Major surface protein 1a effects tick infection and transmission of Anaplasma marginale". *International Journal for Parasitology*, **31**, **2001c**, 1705–1714.
- ¹⁹⁵Kocan, K. M., de la Fuente, J., Guglielmone, A. A. and Meléndez, R.D.; "Antigens and alternatives for control of Anaplasma marginale infection in cattle". *Clinical Microbiology Reviews*, **16**, **2003**, 698-712.

¹⁹⁶Kessler, R. H.; “Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*”. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 21, **2001**, 177-179.

¹⁹⁷“Serviços Veterinários Estaduais”. **2011**, Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em 25/03/2013.

¹⁹⁸Rodríguez, S. D., Ortiz, M. A. G., Salgado, M. A. H., Cerda, N. A. S., Torres, R. A. and Alarcón, G. J. C.; “*Anaplasma marginale* inactivated vaccine: dose titration against a homologous challenge”. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 23, **2000**, 239-252.

¹⁹⁹Kawasaki, P. M., Kano, F. S., Tamekuni K., Garcia, J. L., Marana, E. R. M., Vidotto, O., and Vidotto, M. C.; “Immune response of BALB/c mouse immunized with recombinant MSPs proteins of *Anaplasma marginale* binding to immunostimulant complex (ISCOM)”. *Research in Veterinary Science*, 83, **2007**, 347–354.

²⁰⁰Kano, F. S., Tamekunia, K., Coelho, A. L., Garcia, J. L., Vidotto, O., Itano, E. N., and Vidotto, M. C.; “Induced immune response of DNA vaccine encoding an association MSP1a, MSP1b, and MSP5 antigens of *Anaplasma marginale*”. *Vaccine*, 26, **2008**, 3522–3527.

²⁰¹McGuire, T. C., Musoke, A. J. and Kurtti, T.; “Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin”. *Immunology*, 38, **1979**, 249-256.

²⁰²Knowles, D., Echaide, S. T., Palmer, G., McGuire, T., Stiller, D., and McElwain, T.; “Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle”. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, **1996**, 2225-2230.

²⁰³Silva, V. M. G., Araújo, F. R., Madruga, C. R. M., Soares, C.O., Kessler, R. H., Almeida, M. A. O., Fragoso, S. P., Santos, L. R., Ramos, C. A. N., Bacanelli, G. and Torres, R. A. A. J.; “Comparison between indirect Enzymelinked immunosorbent assays for *Anaplasma marginale* antibodies with recombinant major surface protein 5 and initial body antigens”. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 5, **2006**, 511-516.

²⁰⁴Goff, W. L., Johnson, W. C. and Kuttler, K. L.; “Development of an indirect fluorescence antibody test, using microfluorometry as a diagnostic test for bovine anaplasmosis”. *American Journal of Veterinary Research*, 46, **1985**, 1080-1084.

²⁰⁵Eriks, I. S., Stiller, D. and Palmer, G. H.; “Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission”. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, **1993**, 2091-2096.

²⁰⁶Silva, M., Wilkowsky, S., Echaide, S. T., Farber, M. and Oliva, A.; “Development of an Immunosensor for the Diagnosis of Bovine Anaplasmosis”. *Annals New York Acadmy of Sciences*, 1081, **2006**, 379-381.

- ²⁰⁷Madruga, C. R., Kessler, R. H., Miguita, C. T. and Miguita, M.; "Avaliação preliminar do teste de aglutinação rápida para diagnóstico de anticorpos contra *Babesia bigemina*". Campo Grande, MS: Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (EMBRAPA-CNPGC) 37, **1987**, 1-6.
- ²⁰⁸Kroon, J. F., Perié, N. M., Franssen, F. F. and Uilenberg, G.; "The indirect fluorescent antibody test for bovine anaplasmosis". *Clínica Veterinária*, 12, **1990**, 124-128.
- ²⁰⁹Morgon, N. H., Coutinho, K.; "Métodos de química teórica e modelagem molecular". São Paulo: Livraria da Física. **2007**, 539 p.
- ²¹⁰Frish, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Montgomery, J. A., Vreven, Jr. T., Kudin, K. N., Burant, J. C., Millam, J. M., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Barrone, V., Mennucci, B., Cossi, M., Scalmani, G., Rega, N., Petersson, G.A., Nakatsuji, H., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Klene, M., Li, X., Knox, J. E., Hratchian, H. P., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P., Dannenberg, J. J., Zakrzewski, V. G., Dapprich, S., Daniel, S. A. D., Strain, M. C., Farkas, O., Malick, D. K., Rabuck, A. D., Raghavachari, K., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cui, Q., Baboul, A. G., Clifford, S., Cioslowski, J., Stefanov, B. B., Liu, G., Liashenko, A., Piskorz, P., Komaromi, I., Martin, R. L., Fox, D. J., Keith, T., Al-Laham, M. A., Peng, C. Y., Nanayakkara, A., Challacombe, M., Gill, P. M. W., Johnson, B., Chen, W., Wong, M. W., Gonzalez, C., Pople, J. A. "Gaussian 03". Revision E. 01, Gaussian.Inc., Wallingford CT, **2005**.
- ²¹¹Mohamadi, F., Richards, N. G. J., Guida, W. C., Liskamp, R., Lipton, M., Caufield, C., Chang, G., Hendrickson, T., Still, W. C. J.; "MacroModel - an Integrated Software System for Modeling Organic and Bioorganic Molecules Using Molecular Mechanics". *Journal of Computational Chemistry*, **1990**, 11, 440.
- ²¹²Mcquarrie, D.A. and Simon J.D. Physical Chemistry – A molecular approach. Sausalito, C.A: University Science Books, cap. 24, 1997.
- ²¹³Huang, W., Humphrey, B. D. and MacDiarmid, A. G.; "Polyaniline, a novel conducting polymer. Morphology and chemistry of its oxidation and reduction in aqueous electrolytes". *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*, 82, **1986**, 2385-2400.
- ²¹⁴Benyoucef, A., Huerta, F., Ferrahi, M. I. and Morallon, E.; "Voltammetric and in situ FT-IRS study of the electropolymerization of *o*-aminobenzoic acid at gold and graphite carbon electrodes Influence of pH on the electrochemical behaviour of polymer films". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 624, **2008**, 245-250.

- ²¹⁵ Greef, R., Peat, R., Peter, L. M., Pletcher, D. and Robinson, J.; "Instrumental Methods in Electrochemistry". 1985, 1st ed. Ellis Horwood Limited, Market Cross House, Cooper Street, Chichester, West Sussex, PO19 1EB, England.
- ²¹⁶ Bard, A. J. and Faulkner, L. R. *Electrochemical methods: Fundamentals and applications*, (John Wiley & Sons, Canada, **1980**).
- ²¹⁷ Laviron, E., Roullier, L. and Degrand, C.; "A multilayer model for the study of space distributed redox modified electrode. Parte II: Theory and application of linear potential sweep voltammetry for simple reaction". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 112:(1), **1986**, 11-23.
- ²¹⁸ Sur, U. K., Subramanian, R. and Lakshminarayanan, V.; "Cyclic voltammetric and electrochemical impedance studies on the structure, adsorption kinetics, and barrier properties of some organic dithiol self-assembled monolayers on gold". *Journal of Colloid and Interface Science*, 266:(1), **2003**, 175-182.
- ²¹⁹ Janek, R.P., Fawcett, W.R. and Ulman, A.; "Impedance Spectroscopy of Self-Assembled Monolayers on Au(111): Sodium Ferrocyanide Charge Transfer at Modified Electrodes". *Langmuir*, 14:(11), **1998**, 3011-3018.
- ²²⁰ Protsailo, L.V. and Fawcett, W.R.; "Electrochemical Impedance Spectroscopy at Alkanethiol-Coated Gold in Propylene Carbonate". *Langmuir*, 18:(23), **2002**, 8933-8941.
- ²²¹ Steichen, M., Doneux, T. and Buess-Herman, C.; "On the adsorption of hexammineruthenium (III) at anionic self-assembled monolayers". *Electrochimica Acta*, 53:(21), **2008**, 6202-6208.
- ²²² Beni, V., Valsesia, A., Colpo, P., Bretagnol, F., Rossi, F. and Arrigan, D.W.M.; "Electrochemical properties of polymeric nanopatterned electrodes". *Electrochemistry Communications*, 9:(7), **2007**, 1833-1839.
- ²²³ Zhi, Z.-l., Drazan, V., Wolfbeis, O.S. and Mirsky, V.M.; "Electrocatalytic activity of DNA on electrodes as an indication of hybridisation". *Bioelectrochemistry*, 68:(1), **2006**, 1-6.
- ²²⁴ Sonmez, G., Schottland, P. and Reynolds, J.R.; "PEDOT/PAMPS: An electrically conductive polymer composite with electrochromic and cation exchange properties". *Synthetic Metals*, 155, **2005**, 130-137.
- ²²⁵ Ganesh, V., Pal, S. K., Kumar, S. and Lakshminarayanan, V.; "Self-assembled monolayers (SAMs) of alkoxy cyanobiphenyl thiols on gold--A study of electron transfer reaction using cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy". *Journal of Colloid and Interface Science*, 296:(1), **2006**, 195-203.
- ²²⁶ Matyszevska, D. and Bilewicz, R.; "Voltammetric study of gold-supported lipid membranes in the presence of perfluorooctanesulphonic acid". *Bioelectrochemistry*, 76, **2009**, 148-152.
- ²²⁷ Ferreira, D.C., Machado, A.E.H., Tiago, F.S., Madurro, J.M., Madurro A.G.B. and Junior, O.A.; "Molecular modeling study on the possible polymers formed during the

electropolymerization of 3-hydroxyphenylacetic acid". *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 34, **2012**, 18–27.

²²⁸De Souza, D., Machado, S. A. S. and Avaca, L. A.; "Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos". *Química Nova*, 26, **2003**, 81-89.

²²⁹Lovric, M., Komorsky-Lovric, S. and Murray, R. W.; "Adsorption effects in square-wave voltammetry of totally irreversible redox reactions". *Electrochimica Acta*, 33, **1988**, 739.

²³⁰Lovric, M., Komorsky-Lovric, S.; "Theory of reverse scan square-wave voltammetry influenced by the kinetics of reactant adsorption". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 248, **1988**, 239.

²³¹Chemical book, Disponível em: <http://www.chemicalbook.com>. Acesso em: 13/11/2013.

²³²La-Scalea, M. A., Serrano, S. H. P. and Gutz, I. G. R.; "Eletrodos funcionalizados com DNA: Uma nova alternativa em eletroanálise". *Química Nova*, 22, **1999**, 417-424.

²³³La-Scalea, M.A., Serrano, S.H.P. and Gutz, I. G. R.; "DNA-modified electrodes: A new alternative for electroanalysis". *Química Nova*, 22, **1999**, 417-424.

²³⁴Wang, J.; "SURVEY AND SUMMARY: From DNA biosensors to gene chips". *Nucleic Acids Research*, 28, **2000**, 3011-3016.

²³⁵Peng, H., Soeller, C., Cannell, M. B., Bowmaker, G. A., Cooney, R. P. and Travas-Sejdic, J.; "Electrochemical detection of DNA hybridization amplified by nanoparticles". *Biosensors and Bioelectronics*, 21, **2006**, 1727-1736.

²³⁶Palecek, E.; "From polarography of DNA to microanalysis with nucleic acid-modified electrodes". *Electroanalysis*, 8, **1996**, 7-14.

²³⁷La-Scalea, M.A., Serrano, S.H.P. and Gutz, I. G. R.; "DNA-modified electrodes: A new alternative for electroanalysis". *Química Nova*, 22, **1999**, 417-424.

²³⁸Labuda, J., Brett, A. M. O., Evtugyn, G., Fojta, M., Mascini, M., Ozsoz, M., Palchetti, I., Palecek, E. and Wang, J.; "Electrochemical nucleic acid-based biosensors". *Pure and Applied Chemistry*, 82, **2010**, 1161–1187.

²³⁹Oliveira-Brett, A. M., Piedade, J. A. P. and Diclescu, V. C.; "Voltammetric determination of all DNA nucleotides". *Analytical Biochemistry*, 332, **2004**, 321-329.

²⁴⁰Gao, H., Duan, Y., Xi, M. and Sun, W.; "Voltammetric detection of guanosine and adenosine using a carbon paste electrode modified with 1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulfate". *Microchimica Acta*, 172, **2011**, 57-64.

²⁴¹Oliveira-Brett, A. M., Silva, L. A. and Brett, M. A. C.; "Langmuir", 18, **2002**, 2326.

²⁴²Tlili, C., Korri-Youssoufi, H., Ponsonnet, L., Martelet, C. and Jaffrezic-Renault, N.J.; "Electrochemical impedance probing of DNA hybridisation on oligonucleotide-functionalised polypyrrole". *Talanta*, 68, **2005**, 131-137.

- ²⁴³Vieira, C. U., Freschi, A. P. P., Capparelli, F. E., Fujimura, P. T., Almeida, J. F., Ferreira, L. F., Goulart, I. M. B., Madurro, A. G. B. and Madurro, J. M.; “Biomarkers for serum diagnosis of infectious diseases and their potential application in novel sensor platforms”. *Critical Reviews in Immunology*, 30, **2010**, 201-222.
- ²⁴⁴Allred, D. R., McGuire, T. C., Palmer, G. H., Leib, S. R., Harkins, T. M., McElwain, T. F. and Barbet, A. F.; “Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, **1990**, 3220-3224.
- ²⁴⁵Alleman, A. R., Kamper, S. M., Viseshakul, N. and Barbet, A. F.; “Analysis of the *Anaplasma marginale* genome by pulsed-field electrophoresis”. *Journal of general microbiology*, 139, **1993**, 2439-2444.
- ²⁴⁶McGarey, D. J., Barbet, A. F., Palmer, G. H., McGuire, T. C. and Allred, D. R.; “Putative adhesins of *Anaplasma marginale*: major surface polypeptides 1a and 1b”. *Infection and Immunity*, 62, **1994**, 4594-4601.
- ²⁴⁷Bowie, M. V., de la Fuente J, Kocan, K. M., Blouin, E. F. and Barbet, A. F.; “Conservation of major surface protein 1 genes of *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between ticks and cattle”. *Gene*, 282, **2002**, 95-102.
- ²⁴⁸Kocan, K. M., Stiller, D., Goff, W. L., Claypool, P. L., Edwards, W., Ewin, S. A., McGuire, T. C., Hair, J. A. and Barron, S. J.; “Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from parasitemic to susceptible cattle”. *American Journal of Veterinary Research*, 53, **1992**, 499-507.
- ²⁴⁹Santos, P. S., Nascimento, R., Rodrigues, L. P., Santos, F. A. A., Faria, P. C. B., Martins, J. R. S., Brito-Madurro, A. G., Madurro, J. M. and Goulart, L. R.; “Functional Epitope Core Motif of the *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 1a and Its Incorporation onto Bioelectrodes for Antibody Detection”, *Plos One*, 7, **2012**, e33045.
- ²⁵⁰Lindholm-Sethson, B., Nyström, J., Malmsten, M., Ringstad, L., Nelson, A. and Geladi, P.; “Electrochemical impedance spectroscopy in label-free biosensor applications: multivariate data analysis for an objective interpretation”. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398, **2010**, 2341– 2349.
- ²⁵¹Enache, T. A. and Oliveira-Brett, A. M.; “Peptide methionine sulfoxide reductase A (MsrA): Direct electrochemical oxidation on carbon electrodes”, *Bioelectrochemistry*, 89, **2013**, 11–18.
- ²⁵²Ouerghi, O., Touhami, A., Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., Ben Ouada, H. and Cosnier, S.; “Impedimetric immunosensor using avidin–biotin for antibody immobilization”. *Bioelectrochemistry*, 56, **2002**, 131-133.
- ²⁵³Banta, S., Wu, J., Cropek, D. M. and West, A. C.; “Development of a Troponin I Biosensor Using a Peptide Obtained through Phage Display”. *Analytical Chemistry*, **2010**, 82, 8235–8243.