



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Programa de Pós-graduação em Química - Doutorado
Instituto de Química
Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia

**IMUNOSSENSOR PARA DIAGNÓSTICO DA ANAPLASMOSE
BOVINA A PARTIR DE PLATAFORMA DE GRAFITE
FUNCIONALIZADA COM POLI (ÁCIDO 3-HIDROXIBENZÓICO)**

Doutorando: Deusmaque Carneiro Ferreira

Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

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

Co-orientador: Prof. Dr. Odonório Abrahão Júnior

Uberlândia-MG

2015

DEUSMAQUE CARNEIRO FERREIRA

**IMUNOSSENSOR PARA DIAGNÓSTICO DA ANAPLASMOSE BOVINA A PARTIR
DE PLATAFORMA DE GRAFITE FUNCIONALIZADA COM POLI (ÁCIDO 3-
HIDROXIBENZÓICO)**

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

Área de Concentração: Química.

Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro
Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Graci Brito-Madurro
Co-orientador: Prof. Dr. Odonório Abrahão Júnior

Uberlândia-MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

F383i
2015

Ferreira, Deusmaque Carneiro,
Imunossensor para diagnóstico da anaplasmosse bovina a partir de
plataforma de grafite funcionalizada com poli (ácido 3-hidroxibenzoico)
/ Deusmaque Carneiro Ferreira. - 2015.
177 f. : il.

Orientador: João Marcos Madurro.
Coorientadora: Ana Graci Brito Madurro.
Coorientador: Odonório Abrahão Júnior.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Química.
Inclui bibliografia.

1. Química - Teses. 2. Anaplasmosse - Teses. 3. Biossensores - Teses.
I. Madurro, João Marcos. II. Brito Madurro, Ana Graci. III. Abrahão
Júnior, Odonório. IV. Universidade Federal de Uberlândia, Programa de
Pós-Graduação em Química. V. Título.

CDU: 54



**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 36/PPQUI.**

DATA: 19/06/2015

DISCENTE: Deusmaque Carneiro Ferreira

MATRÍCULA: 11123QMI002

TÍTULO DO TRABALHO: Desenvolvimento de imunossensor para diagnóstico da anaplasmosse bovina a partir de plataforma de grafite funcionalizada com poli(ácido 3-hidróxibenzoico).

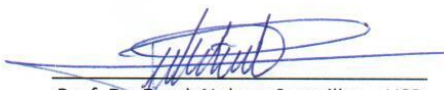
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química


LINHA DE PESQUISA: Eletroquímica Aplicada

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Desenvolvimento de imunossensor para diagnóstico de doenças.

Às quatorze horas do dia dezoito de junho do ano dois mil e quinze, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, Bloco 5I, Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Frank Nelson Crespilho, da Universidade de São Paulo e Hideko Yamanaka, da Universidade Estadual de São Paulo; Wellington de Oliveira Cruz e Eduardo de Faria Franca, 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 3 provou o(a) candidata(o). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será Imunossensor para diagnóstico da anaplasmosse bovina a partir de plataforma de grafite funcionalizada com poli(ácido 3-hidroxibenzoico).

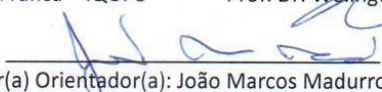
Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 19 horas e 50 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.


Prof. Dr. Frank Nelson Crespilho – USP


Profª Dra. Hideko Yamanaka – UNESP


Prof. Dr. Eduardo de Faria Franca – IQUFU


Prof. Dr. Wellington de Oliveira Cruz – IQUFU


Professor(a) Orientador(a): João Marcos Madurro – IQUFU

AGRADECIMENTOS

❖ *À minha esposa Pollyana, meu porto seguro, que suportou a minha ausência mesmo quando fisicamente tão próximo. Amo você de todo o meu coração e digo que essa vitória é fruto do seu incondicional apoio ao meu sonho de um dia ser doutor em Química.*

❖ *Aos meus pais, Márcio e Vânia, os grandes professores da minha vida, pois de vocês recebi os mais sublimes ensinamentos: o amor, a lealdade, a honestidade e a sinceridade. Amados pais vocês são a essência de minha vida.*

❖ *Ao meu irmão Deusdedit, pelas orações, e pelas belas palavras de incentivo.*

❖ *Agradeço de uma forma muito especial a todos os meus familiares pelo apoio e pelas constantes orações em prol dos meus estudos.*

❖ *Aos componentes do grupo de pesquisa, Ana Cristina, Anderson, Felipe, Fellipy, Héden, Heliane, José Manuel, Jussara, Leandro, Lídia, Lívia, Lucas, Mariana, Renata, Anderson, Thalles, Vinícius e Larrissa pelas amizades.*

❖ *Aos Professores Luciano Pereira Rodrigues, Sheila Cristina Canobre, Antônio Eduardo da Hora Machado pelas discussões que muito contribuíram para este trabalho.*

❖ *Aos Professores Robson Tadeu de Oliveira, Ronaldo Júnior de Oliveira e Milton Taidi Sonoda, muito obrigado pelo apoio, amizade, companheirismo e pelas excelentes discussões no desenvolvimento desse trabalho. Verdadeiros amigos que muito me auxiliaram nos momentos de grande dificuldade.*

❖ *Agradecimento mais que especial, ao professor Odonório, companheiro de todas as horas, sempre pronto e muito disposto para me ajudar. Obrigado por todos os ensinamentos e orientações na parte de química teórica.*

- ❖ *Agradecimento especial a Dra. Paula de Souza Santos, do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU, por ter cedido às amostras da proteína (Am1), soro positivo, soro negativo e amostras dos soros não específicos para Anaplasmosse marginale. Meu muito obrigado.*
- ❖ *Aos membros da Banca pela disponibilidade em participarem e pelas valiosas contribuições no aprimoramento deste trabalho.*
- ❖ *Aos amigos e amigas do Instituto de Ciências Tecnológicas e Exatas (ICTE) da UFTM e aos professores e funcionários do departamento de Engenharia Ambiental da UFTM.*
- ❖ *Agradecimento especial ao meu orientador, Prof. Dr. João Marcos Madurro, e a minha co-orientadora, Profa. Dra. Ana Graci Brito-Madurro, que me orientaram para desenvolver este trabalho me proporcionando, o que considereei uma grande oportunidade para aquisição de conhecimento, meu eterno obrigado.*
- ❖ *Agradecimento ao CNPq, a CAPES, à FAPEMIG, à PROPP/UFU, ao Laboratório de Química Computacional e Medicinal da UFTM, ao Instituto de Genética e Bioquímica da UFU e a Rede Mineira de Química.*
- ❖ *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 do coordenador Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz, pela possibilidade de aprimoramento profissional.*
- ❖ *Agradeço a todos, do fundo do meu coração.*

"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar aquilo que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê".

Arthur Schopenhauer

SUMÁRIO

| | |
|--|---------------|
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS..... | X |
| LISTA DE FIGURAS..... | Xiii |
| LISTA DE TABELAS..... | XXV |
| LISTA DE QUADROS..... | XXVI |
| RESUMO..... | XXVII |
| ABSTRACT..... | XXVIII |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 2 |
| 2.1 ANAPLASMOSE BOVINA | 2 |
| 2.1.1 Transmissão e ciclo de desenvolvimento | 3 |
| 2.1.2 Diagnóstico da <i>A. marginale</i> | 5 |
| 2.1.3 Controle..... | 6 |
| 2.1.5 Importância e impacto econômico | 9 |
| 2.1.6 Resposta imune e proteínas principais de superfície de <i>Anaplasma marginale</i> com importância como imunógenos | 9 |
| 2.1.7- Produção de moléculas sintéticas equivalentes às MSPs..... | 13 |
| 2.2 BIOSSENSORES..... | 14 |
| 2.2.1 Camada de reconhecimento para o desenvolvimento de genossensor | 18 |
| 2.2.2 Camada de reconhecimento para o desenvolvimento de imunossensor | 22 |
| 2.2.3 Intercalador de proteína para o desenvolvimento de um imunossensor | 25 |
| 2.2.4 Técnicas de imobilização | 27 |
| 2.2.5 Eletrodos modificados com filmes poliméricos | 28 |
| 2.2.6 Caracterização eletroquímica do imunossensor para diagnóstico da anaplasmoze bovina | 32 |
| 2.2.8 Caracterização do imunossensor por Ressonância de Plásmons de Superfície (SPR) | 38 |
| 2.3 MODELAGEM MOLECULAR | 40 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3.1 Mecânica Molecular | 41 |
| 2.3.2 Mecânica quântica | 42 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 44 |
| 4 OBJETIVOS | 45 |
| 4.1 OBJETIVO GERAL | 45 |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 45 |
| 5 PARTE EXPERIMENTAL | 46 |
| 5.1 MATERIAIS E SOLUÇÕES | 46 |
| 5.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL | 49 |
| 5.2.1 Preparação e construção dos eletrodos de grafite | 49 |
| 5.2.2 Seleção dos eletrodos de grafite | 50 |
| 5.2.3 Eletropolimerização do ácido 3-hidroxibenzóico | 51 |
| 5.2.4 Transporte iônico nos estudos de reversibilidade | 52 |
| 5.2.5 Determinação da massa do polímero | 52 |
| 5.2.6 Extração do poli (3-HBA) para análise espectroscópica no infravermelho | 53 |
| 5.2.7 Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada | 53 |
| 5.2.8 Medidas de estabilidade eletroquímica | 54 |
| 5.2.9 Microscopia de força atômica | 54 |
| 5.2.10 Estudos de imobilização das bases nitrogenadas e de oligonucleotídeos em EG/poli (3-HBA) | 55 |
| 5.2.11 Procedimento de construção do sistema polimérico para desenvolvimento do imunossensor para diagnóstico da anaplasmosse bovina | 56 |
| 5.2.12 Procedimento de detecção por Ressonância de Plásmons de Superfície (SPR) | 59 |
| 5.2.13 Metodologia empregada na modelagem molecular | 59 |

| | |
|---|-----------|
| 5.2.13.1 Caracterização do polímero obtido por espectroscopia UV-vis e espectroscopia de infravermelho..... | 59 |
| 5.2.13.3 Modelagem molecular da proteína de membrana Am1 | 61 |
| 5.2.13.4 Modelagem molecular da 4-AAP e suas interações com a proteína de membrana Am1 | 61 |
| 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 63 |
| 6.1 ESTUDO DA FORMAÇÃO E DAS PROPRIEDADES DO POLI (3-HBA) EM ELETRODO DE GRAFITE | 63 |
| 6.1.1 Otimização do número de ciclos de varredura para a funcionalização dos eletrodos de grafite..... | 67 |
| 6.1.2 Estudo da atividade eletroquímica e da estabilidade do poli (3-HBA) | 70 |
| 6.1.3 Estudo dos diagnósticos de reversibilidade do poli (3-HBA) | 74 |
| 6.1.4 Estudos morfológicos e de superfície do EG e EG/poli (3-HBA) | 82 |
| 6.2 ESTUDO TEÓRICO DO POLI (3-HBA)..... | 91 |
| 6.2.1 Comparação entre os espectros de infravermelho experimental e teórico do poli (3-HBA) | 91 |
| 6.2.2 Inferência de mecanismo para a eletropolimerização do poli (3-HBA)..... | 94 |
| 6.2.3 Espectroscopia do Ultravioleta/Visível e cálculo do band gap do poli (3-HBA). | 101 |
| 6.3 APLICAÇÃO DO EG/POLI (3-HBA) NA IMOBILIZAÇÃO DE BASES NITROGENADAS E OLIGONUCLEOTÍDEOS | 105 |
| 6.4 DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR PARA DIAGNÓSTICO DA ANAPLASMOSE BOVINA UTILIZANDO EG/POLI (3-HBA) COMO SUPERFÍCIE TRANSDUTORA..... | 110 |
| 6.4.1 Imobilização da proteína de membrana da A. marginale na superfície sensora | 111 |
| 6.4.2 Detecção direta da Am1 em EG/poli (3-HBA) | 115 |
| 6.4.3 Detecção indireta da Am1 em EG/poli (3-HBA) na presença da 4-AAP..... | 117 |
| 6.4.4 Estudo morfológico do imunossensor | 128 |

| | |
|--|------------|
| 6.4.5 Estudo de espectroscopia de impedância eletroquímica aplicado ao imunossensor | 130 |
| 6.4.6 Análise de sensibilidade, seletividade e especificidade do imunossensor para diagnóstico da anaplasmoze bovina | 139 |
| 6.4.7 Análise de detecção do imunossensor por ressonância de plásmons de superfície..... | 143 |
| 6.4.8 Análise do tempo de estocagem do imunossensor | 146 |
| 7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS..... | 149 |
| REFERÊNCIAS | 152 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-AAP – 4-aminoantipirina

AC – Corrente alternada

Ac – Anticorpo

AE - Afinidade eletrônica

AFM – Microscopia de força atômica

Ag – Antígeno

Am1 – Peptídeo sintético estável capaz de reconhecer anticorpos em soros contendo *Anaplasma marginale*.

Am2 – Peptídeo sintético instável da *A. marginale* de baixa especificidade.

C – Capacitância

CD4+ – Linfócitos T auxiliares

C_{dl} – Capacitância da dupla camada

ChelpG - Cargas obtidas através do ajuste de potenciais eletrostáticos em uma rede de pontos ao redor da molécula.

DFT – Teoria do funcional da densidade

DL₅₀ - Corresponde à dose capaz de matar 50% dos indivíduos de uma população em teste.

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dsDNA– Dupla fita de DNA (híbrido)

E – Potencial

EG – Eletrodos de grafite

EIE - Espectroscopia de impedância eletroquímica

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

E_p– Potencial de pico

E_{p1/2} - Potencial de meia onda ou potencial de meia altura

E_{pa}– Potencial de pico anódico

E_{pc}– Potencial de pico catódico

FEIMCP – Formalismo da equação integral do modelo contínuo polarizado

h – Horas

3-HBA– Ácido 3-hidroxibenzóico

HOMO – Orbital molecular ocupado de mais alta energia.

IFN- γ – Interferon gama

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

IgG⁻ – Anticorpos contidos nos soros sanguíneos de bovinos saudáveis

IL-2 – Interleucina 2

Ip – Corrente de pico

Ipa – Corrente de pico anódico

Ipc – Corrente de pico catódico

LUMO – Orbital molecular desocupado de mais baixa energia

m – Massa

MM – Mecânica molecular

MSPs - Proteínas principais de superfície

mV s⁻¹ – Milivolts por segundo

nm – Nanômetros

NO – Óxido nítrico

NV – Nível de vácuo

OPLS – Potencial otimizado para simulação de líquido

OPS - Ondas de plásmons de superfície

PBS – Tampão de fosfato de sódio contendo NaCl

PDB – Banco de dados de proteínas

PC – Polímeros condutores

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PI – Potencial de ionização

PIC – Polímeros intrinsecamente condutores

Qdl - Elemento de fase constante

R – Resistência

Rct – Resistência à transferência de carga

RMSD – Desvio quadrático médio

S – Siemens

s – Segundos

SPR – Ressonância plasmônica de Superfície

SSC – Solução de tampão citrato de sódio salino

T - Capacitância transmissiva

Th1 – Resposta imune celular (citocinas ativam os macrófagos)

TPB – Tristeza parasitária bovina

UV-Vis – Espectroscopia no ultravioleta e visível

V - Volts

VC – Voltametria cíclica

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: Aspecto morfológico da *Anaplasma marginale*. A bactéria é caracterizada por um corpo arredondado, localizado marginalmente no interior do eritrócito.

.....2

Figura 2. Mostra vários carrapatos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, principais transmissores da *Anaplasma marginale* e *Babesia sp*, fixado na pele do bovino.

.....3

Figura 3: Esquema do ciclo de desenvolvimento da *Anaplasma marginale* no bovino e no carrapato.

..... 4

Figura 4: Banho de carrapaticida em animal para controlar a infestação por carrapato

.....7

Figura 5: Animal com alguns sintomas típicos da anaplasmosse bovina como a apatia (cabeça e orelhas baixas) e inapetência (baixo consumo de alimentos)

.....8

Figura 6: Modelo de resposta imune celular e humoral contra *A. marginale*. 1 Linfócitos T auxiliares (CD4+), estimulados por antígenos de *A. marginale*, produzem interferon- γ (IFN- γ), o qual atua sobre macrófagos e linfócitos B. 2 sobre os macrófagos, o IFN- γ estimula a expressão de receptores de Fc, facilitando a fagocitose de *A. marginale*. 3 Atua também aumentando a fusão fagossomo lisossomo e a produção de óxido nítrico (NO), resultando na destruição intracelular de *A. marginale*. 4 O IFN- γ estimula a produção de IgG2 por linfócitos B. Esse isotipo tem importante função na opsonização de *A. marginale* para a fagocitose.

.....10

| | |
|---|----|
| Figura 7: Esquema ilustrativo de seleção de proteínas por <i>phage display</i> . | 14 |
| Figura 8: Esquema de um biossensor. | 15 |
| Figura 9: Ligação fosfodiéster entre nucleotídeos. | 19 |
| Figura 10: Formação das ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas purínicas e pirimidínicas. | 20 |
| Figura 11: Modelo de estrutura do DNA proposto por Watson, Crick e Wilkins. | 21 |
| Figura 12: Esquema de um Genossensor. | 22 |
| Figura 13: Estrutura de um anticorpo com destaque para as cadeias leves e pesadas e para o sítio de ligação do antígeno. | 23 |
| Figura 14: Ligação do anticorpo IgG ao antígeno específico. | 24 |
| Figura 15: Estrutura química da 4-AAP. | 25 |
| Figura 16: Mecanismo de eletropolimerização para heterociclos de cinco membros. | 29 |
| Figura 17: Escala de condutividade dos polímeros, segundo o aumento dos níveis de dopagem. Adaptado de MacDiarmid. | 30 |

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

.....33

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

.....34

Figura 20: (A) Escada de potencial de largura ΔE_p , altura ΔE_s e período τ e (B) sequência de potencial vs. tempo usada em voltametria de onda quadrada.

.....35

Figura 21: Esquema de um microscópio de força atômica.

.....37

Figura 22: (a) Representação esquemática da configuração de Kretschmann para SPR. O dielétrico em contato com o metal possibilita a transferência ressonante de energia da onda incidente para OPS; (b) Curvas de refletância na ausência (θ_{SPR_1}) e presença (θ_{SPR_2}) de espécies na superfície do filme metálico; (c) Sensograma esquemático representativo da relação entre o θ_{SPR} (dado em mDA-miligráus de ângulo-) e tempo durante a interação de espécies com a superfície do filme metálico.

.....39

Figura 23: Fluxograma de preparação dos eletrodos de grafite.

.....49

Figura 24: Eletrodo de grafite conectado à base (a), eletrodo auxiliar de platina (b) e eletrodo de referência Ag/AgCl (c), comparados a uma caneta esferográfica.

.....51

Figura 25: Apresenta um esquema da imobilização da sonda poli(GA) no EG/poli(3-HBA) e a hibridização com o alvo poli(CT).

.....56

Figura 26: Etapas do procedimento experimental do desenvolvimento do imunossensor para diagnóstico da anaplasmosse bovina, em que: (I) eletrodo de grafite; (II) eletrodo de grafite funcionalizado com o poli (3-HBA); (III) imobilização da

proteína de membrana Am1 no eletrodo funcionalizado; (IV) interação da Am1 com o seu anticorpo específico (amostras de soro de bovinos contaminados com a *A. marginale*; (V) detecção do sinal de corrente da 4-AAP após intercalar com as proteínas do complexo antígeno-anticorpo (Am1 + soro positivo).

.....58

Figura 27: Voltamogramas cíclicos em eletrodos de grafite: (A) $K_3Fe(CN)_6$ / $K_4Fe(CN)_6$ (5,0 mmol L⁻¹) em KCl (0,1 mol L⁻¹), 50 mV s⁻¹. (B) HClO₄ (0,5 mol L⁻¹), 50 mV s⁻¹.

.....64

Figura 28: VC consecutivos do eletrodo de grafite em solução de 2,5 mmol L⁻¹ de 3-HBA. Eletrólito suporte: 0,50 mol L⁻¹ HClO₄. Número de ciclos = 100; v= 50 mV s⁻¹.

.....65

Figura 29: Voltametria cíclica do EG/poli (3-HBA) em solução aquosa de HClO₄ 0,5 mol L⁻¹. Número de ciclo = 1; v= 50 mV s⁻¹.

.....66

Figura 30: VC obtidos após eletropolimerização, somente em solução de ácido perclórico 0,5 mol L⁻¹, na ausência do monômero, para os eletrodos de grafite: (A) modificado com poli (3-HBA) e (B) não-modificado, v = 50 mV s⁻¹.

.....67

Figura 31: Mostra da esquerda para a direita os VC consecutivos (10, 30, 60, 100 ciclos) do eletrodo de grafite em solução de 2,5 mmol L⁻¹ de 3-HBA. Eletrólito suporte: HClO₄ 0,50 mol L⁻¹; v= 50 mV s⁻¹.

.....69

Figura 32: (A) carga elétrica total dos picos anódicos; (B) carga elétrica total dos picos catódicos em função do número de ciclos, obtidas a partir de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 cíclicos de varredura de potencial consecutivos realizados em HClO₄ (0,5 mol L⁻¹), janela de potencial entre 0,0 e + 1, 2 V, 50 mV s⁻¹.

.....70

Figura 33: Último ciclo de varredura do EG/poli (3-HBA), em ácido perclórico 0,5 mol L⁻¹, nas seguintes velocidades / mv s⁻¹ (5; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100; 110; 150; 200; 300; 400; 500; 1000).

.....71

Figura 34: Porcentagem de carga relativa dos eletrodos de grafite modificados com poli (3-HBA) a 50 mV s⁻¹. Janela de potencial entre + 0,2 V e 0,9 V. Eletrólito suporte HClO₄ 0,50 mol L⁻¹.

.....73

Figura 35: Voltametrias cíclicas consecutivas para o EG/poli (3-HBA) em solução de HClO₄ 0,5 mol L⁻¹; v= 10 mV s⁻¹ a 100 mV s⁻¹.

.....75

Figura 36: ΔE_p vs. velocidade de varredura (10 mV s⁻¹ a 100 mV s⁻¹) em solução de HClO₄ 0,5 mol L⁻¹ para EG/poli (3-HBA).

.....76

Figura 37: E_p- E_{P/2} vs. velocidade de varredura do (■) pico anódico e (▲) pico catódico em solução de HClO₄ 0,50 mol L⁻¹ para eletrodos de grafite modificados com poli (3-HBA).

.....77

Figura 38: I_{pa} / I_{pc} vs velocidade de varredura em solução de HClO₄ 0,5 mol L⁻¹ para EG/poli (3-HBA).

.....78

Figura 39: I_p vs. v^{1/2} do (■) pico anódico e (●) pico catódico em solução de HClO₄ 0,50 mol L⁻¹ para EG/poli (3-HBA).

.....79

Figura 40: I_p / v^{1/2} vs. E_p em solução de HClO₄ 0,5 mol L⁻¹ para EG/poli (3-HBA).

.....80

Figura 41: i_p vs. $t^{1/2}$ em solução de HClO_4 0,50 mol L^{-1} para EG/polí (3-HBA).

.....81

Figura 42: Imagens de microscopia de força atômica. (A) eletrodo de grafite; (B) eletrodo de grafite modificado com poli (3-HBA), número de ciclos= 10, eletrólito suporte: HClO_4 a 0,5 mol. L^{-1} ; Janela de potencial: 0,0 a + 1,2 V; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

.....82

Figura 43: VC do 1º ciclo de varredura obtido a 50 mV s^{-1} em solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mmol L^{-1} contendo KCl 0,1 mol L^{-1} , pH 6,7, para: (a) EG; (b) EG/polí (3-HBA).

.....85

Figura 44: Diagramas de Nyquist (à esquerda) e Bode (à direita) dos espectros de impedância eletroquímica do EG e EG/polí (3-HBA), obtidos em solução de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] / \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5,0 mmol L^{-1} contendo KCl 0,1 mol L^{-1} ; polarizados a 0,21 V; Amplitude 5 mV; Intervalo de frequência: 10^4 a 10^{-2} Hz. As linhas sólidas representam os resultados simulados a partir do circuito da Figura 45.

.....86

Figura 45: Circuito elétrico equivalente proposto para os resultados de EIE para: (A) EG; (B) EG/polí (3-HBA).

.....87

Figura 46: Espectros de infravermelhos obtidos em pastilhas de KBr para: (a) 3-HBA e (b) poli (3-HBA) eletropolimerizado em pH 0,5, com 20 ciclos consecutivos em resolução de 4 cm^{-1} .

.....91

Figura 47: Espectro de infravermelho teórico obtido pelo cálculo B3LYP/6-31G para o decâmero do 3-HBA. Calculado com meia largura e meia altura em 15 cm^{-1} , corrigidos com o uso de um fator de escala de 0,947.

.....93

Figura 48: (A) Voltamograma de onda quadrada para oxidação do 3-HBA. Amplitude: 0,02 V, Incremento: 0,005 V, Frequência: 1, 5, 25 e 35 Hz, Eletrólito suporte: HClO₄ 0,5 mol L⁻¹ contendo 2,5 mmol L⁻¹ de 3-HBA; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, Eletrólito suporte de HClO₄ 0,5 mol L⁻¹). (B) Regressão linear entre a corrente de pico e os incrementos de frequência aplicados.

.....95

Figura 49: Parâmetros de regressão linear da curva E_p vs. $\log f$ obtidos dos voltamogramas de onda quadrada para o 3-HBA. Amplitude: 0,02 V, Incremento: 0,005 V, Frequências: 1, 5, 25 e 35 Hz, Eletrólito suporte: HClO₄ 0,5 mol L⁻¹ contendo 2,5 mmol L⁻¹ de 3-HBA; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

.....96

Figura 50: Estrutura do cr3-HBA com as densidades de spin dos átomos que apresentam valores iguais ou superiores a 0,10.

.....97

Figura 51: Mecanismo de polimerização para o poli (3-HBA) via C4.

.....98

Figura 52: Estrutura de mínimo de energia do bisdecâmero éter derivado do 3-HBA, otimizada utilizando análise conformacional Monte Carlo (A) estrutura protonada; (B) estrutura parcialmente desprotonada.

.....99

Figura 53: Espectro de absorção UVvis do dec(3-HBA) em acetonitrila, simulação teórica usando o funcional DFT m06 e o conjunto de base 6-311G(d, p). Inserção: Espectro de absorção UV vis experimental do (a) 3-HBA e (b) poli (3-HBA), em acetonitrila.

.....101

Figura 54: Orbitais moleculares relacionados com a transição eletrônica $S_0 \rightarrow S_1$ do dec (3-HBA).

.....102

Figura 55: VC obtido após eletropolimerização, somente em solução de ácido perclórico 0,5 mol/L, na ausência do monômero, para o eletrodo de grafite modificado com poli (3-HBA), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

.....104

Figura 56: Espectro de densidade de estados para o dec (3-HBA).

.....105

Figura 57: Pareamento Watson-Crick de bases e os respectivos sítios de oxidação e redução do DNA. (O) sítios de oxidação para A e G e (□) sítios de redução para A, C e G.

.....106

Figura 58: Voltamogramas de pulso diferencial em: (—) eletrodo de grafite modificado com poli (3-HBA); (-) eletrodo de grafite não modificado contendo guanina, G, (10 mmol L^{-1}), adenina, A, (10 mmol L^{-1}), timina, T, (10 mmol L^{-1}) e citosina, C, (10 mmol L^{-1}). Eletrólito: tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,3. Condições experimentais: Amplitude: 25 mV; duração do pulso 60 ms; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

.....107

Figura 59: Voltametria de pulso diferencial em eletrodo de grafite modificado com poli (3-HBA), contendo 18 μL de poli (GA) a $6,3 \mu\text{mol L}^{-1}$: Ausência de Poli (CT) e após 15 minutos de incubação a, 37°C , com 18 μL desse alvo nas concentrações de: $5,86 \mu\text{mol L}^{-1}$, $29 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $58,1 \mu\text{mol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 4,3. Condições experimentais: Amplitude: 25 mV; duração do pulso 60 ms; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

.....109

Figura 60: Estrutura estável em folha-beta encontrada para a proteína de membrana Am1 através do método de *web server RaptorX*. Sequência da Am1: STSSQLGGGSSTSSQLGGGSSTSSQL (S= serina, T= treonina, Q= glutamina, L= leucina G= glicina).

.....112

Figura 61: Diagrama geral de uma estrutura em folha-beta.

.....113

Figura 62: Mostra as três principais estruturas em alfa-hélice encontradas para a proteína de membrana Am2 através do método *web server RaptorX*. Sequência da Am2: SEASTSSQLGAGGGSSEASTSSQLGA (S= serina, E= ácido glutâmico, A= alanina, T= treonina, Q= glutamina, L= leucina, G= glicina).

.....114

Figura 63: Diagrama geral de uma estrutura em alfa-hélice.

.....114

Figura 64: Voltamogramas de pulso diferencial do eletrodo de grafite modificado com poli (3-HBA) contendo: (A) 18 μL de Am1 ($0,055 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$), (B) 18 μL Am1 ($0,055 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) + 18 μL do soro positivo (diluição 1:50). Eletrólito: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,3. Condições experimentais: Amplitude: 25 mV; duração do pulso 60 ms; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

.....116

Figura 65: Voltamogramas de pulso diferencial do eletrodo de grafite modificado com poli (3-HBA) após adição de (a) 18 μL da Am1 ($0,055 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) + 18 μL do soro positivo (diluição 1:25) + 18 μL 4-AAP a 10 mmol L^{-1} ; (b) 18 μL da Am1 ($0,055 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) + 18 μL 4-AAP a 10 mmol L^{-1} ; (c) 18 μL da Am1 ($0,055 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) + 18 μL do soro negativo (diluição 1:25) + 18 μL 4-AAP a 10 mmol L^{-1} . Eletrólito: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,3. Condições experimentais: Amplitude: 25 mV; duração do pulso 60 ms; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

.....117

Figura 66: Voltamogramas de pulso diferencial para: (I) eletrodo de grafite modificado com poli (3-HBA) após adição de 18 μL da Am1 ($0,055 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) + 18 μL do soro positivo (diluição 1:25) + 18 μL 4-AAP a 10 mmol L^{-1} ; (II) eletrodo de grafite não modificado com o filme após adição de 18 μL da Am1 ($0,055 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) + 18 μL do soro positivo (diluição 1:25) + 18 μL 4-AAP a 10 mmol L^{-1} . Eletrólito: tampão fosfato

0,1 mol L⁻¹, pH 7,3. Condições experimentais: Amplitude: 25 mV; duração do pulso 60 ms; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

.....119

Figura 67: Voltamogramas de pulso diferencial para o eletrodo de grafite modificado com poli (3-HBA) após adição de 18 μL da Am1 (0,055 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) + 18 μL 4-AAP (10 mmol L⁻¹, 50 mmol L⁻¹, 70 mmol L⁻¹, 1000 mmol L⁻¹, 2000 mmol L⁻¹). Em cada experimento foi realizado a lavagem em tampão fosfato para retirar o excesso do intercalador. Eletrólito: tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,3. Condições experimentais: Amplitude: 25 mV; duração do pulso 60 ms; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

.....121

Figura 68: Distribuição parcial de carga para a 4-AAP neutra e para o cátion radical da 4-AAP (cr (4-AAP) pelo método ChelpG.

.....122

Figura 69: Mostra a distribuição da densidade de spin para os átomos do cr (4-AAP) com valores superiores a 0,10.

.....123

Figura 70: Posições mais prováveis, obtidas por atracamento molecular, de interação da 4-AAP com a proteína de membrana Am1 imobilizada no dec (3-HBA), em que: (A) posições mais prováveis (4-AAP + Am1); (B) frequência da interação/posição (nº de conformação) em função da energia livre de Gibbs; (C) interação mais provável (maior frequência (35) e menor energia livre (-3 kcal mol⁻¹)).

.....124

Figura 71: Estrutura química dos aminoácidos presentes na estrutura da Am1.

.....125

Figura 72: Voltamogramas de pulso diferencial para o eletrodo de grafite modificado com poli (3-HBA) após adição de 18 μL da Am1 (0,055 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) + 18 μL 4-AAP a 10 mmol L⁻¹ + 18 μL do soro positivo (diluição 1:100) em função do tempo de interação da Am1 com o anticorpo específico (5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos,

25 minutos e 50 minutos).Eletrólito: tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,3. Condições experimentais: Amplitude: 25 mV; duração do pulso 60 ms; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

.....128

Figura 73: Imagens de microscopia de força atômica do EG/poli (3-HBA): (A) após adição de 18 µL da Am1 (0,055 µg µL⁻¹); (B) após adição de 18 µL da Am1 (0,055 µg µL⁻¹) + 18 µL do soro positivo (diluição 1:25); (C) após adição de 18 µL da Am1 (0,055 µg µL⁻¹) + 18 µL do soro negativo (diluição 1:25).

.....129

Figura 74: VC do 1º ciclo de varredura obtido a 50 mV s⁻¹ em solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mmol L⁻¹ contendo KCl 0,1 mol L⁻¹, pH 6,7, para: (—) EG; (—) Soro-; (—) soro+; (—) Am1 e (—) Interferente.

.....131

Figura 75: Diagramas de Nyquist (à esquerda) e Bode (à direita) dos espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução de K₄[Fe(CN)₆] / K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol L⁻¹ contendo KCl 0,1 mol L⁻¹, para o EG/poli (3-HBA) contendo: Am1; IgG+; IgG- e interferente (Brucelose). Polarizados a 0,22 V; Amplitude 5 mV; Intervalo de frequência: 10⁴ a 10⁻² Hz. As linhas sólidas representam os resultados simulados a partir do circuito da Figura 77.

.....132

Figura 76: Sobreposição dos diagramas de Nyquist dos espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução de K₄[Fe(CN)₆] / K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol L⁻¹ contendo KCl 0,1 mol L⁻¹, para o EG/poli (3-HBA) contendo: Am1; IgG+; IgG- e interferente (Brucelose). Polarizados a 0,22 V; Amplitude 5 mV; Intervalo de frequência: 10⁴ a 10⁻² Hz. As linhas sólidas representam os resultados simulados a partir do circuito da Figura 77.

.....134

Figura 77: Circuito elétrico equivalente proposto para os resultados de EIE para: EG/poli (3-HBA) com as seguintes imobilizações: Am1; interação da Am1 com soro

positivo; interação da Am1 com soro negativo e interação da Am1 com soro positivo de Brucelose (interferente).

.....135

Figura 78: Voltamogramas de pulso diferencial para o eletrodo de grafite modificado com poli (3-HBA) após adição de 18 μL da Am1 ($0,055 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) + 18 μL 4-AAP a 10 mmol L^{-1} , com adição de 18 μL do soro de bovino com anaplasmosose após as seguintes diluições: 1:1000; 1:800; 1:400; 1:200; 1:100, 1:50, 1:25. Em todas as medidas foi subtraído o sinal do branco. Eletrólito: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,3. Condições experimentais: Amplitude: 25 mV; duração do pulso 60 ms; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

.....140

Figura 79: Voltamogramas de pulso diferencial para o eletrodo de grafite modificado com poli (3-HBA) após adição de 18 μL da Am1 ($0,055 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) + 18 μL 4-AAP a 10 mmol L^{-1} , com adição de 18 μL da mistura de soro de bovino com anaplasmosose (1:100) com soro positivo na diluição (1:100) para: *Brucelose*, *B. bovis*, *B. bigemina* e Mix (mistura de todos os soros interferentes). O soro negativo foi diluído (1:100). Em todas as medidas foi subtraído o sinal do branco. Eletrólito: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,3. Condições experimentais: Amplitude: 25 mV; duração do pulso 60 ms; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

.....142

Figura 80: Sensograma mostra a variação angular em função do tempo para a interação da Am1 (18 μL a $0,055 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) imobilizada em Au/poli (3-HBA), 10 ciclos de varredura (3-HBA a $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em H_2SO_4 a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$) após adição de 18 μL soro positivo, diluição 1:25 e adição de 18 μL soro negativo, diluição 1:25. Lavagem em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,3.

.....145

Figura 81: Representa a variação da corrente de pico de oxidação em função do tempo em dias de estocagem.

.....147

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros elétricos para o EG e EG/poli (3-HBA) polarizados a 0,21 V obtidos em solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mmol L⁻¹ contendo KCl 0,1 mol L⁻¹. Ajuste (Figura 40).

.....88

Tabela 2: Alguns dos sinais de infravermelhos atribuídos ao poli (3-HBA) e ao decâmero (3-HBA).

.....94

Tabela 3: Valores de rugosidade da superfície do EG antes e após a adição de biomoléculas.

.....130

Tabela 4: Parâmetros elétricos para EG/poli (3-HBA) com as seguintes imobilizações: Am1; interação da Am1 com soro positivo; interação da Am1 com soro negativo e interação da Am1 com soro positivo de Brucelose (interferente), polarizados a 0, 22 V obtidos em solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mmol L⁻¹ contendo KCl 0,1 mol L⁻¹. Ajuste (Figura 72).

.....136

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Principais sistemas de transdução aplicados no desenvolvimento de biossensor e técnicas de detecção.

.....16

RESUMO

FERREIRA, D.C., **Imunossensor para diagnóstico da anaplasmosse bovina a partir de plataforma de grafite funcionalizada com poli (ácido 3-hidroxibenzóico)**. Tese de Doutorado em Química, Instituto de Química-UFU, 2015.

Os biossensores constituem-se como dispositivos analíticos importantes para o diagnóstico clínico de inúmeras doenças, por permitirem uma análise em tempo real, além de suas altas especificidades e sensibilidades. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi desenvolver uma plataforma funcionalizada com o poli (ácido 3-hidroxibenzóico), para a detecção de bases nitrogenadas, oligonucleotídeos e anticorpos contra a proteína de superfície (Am1) da *Anaplasma marginale*. Esses elementos de reconhecimento biológico foram imobilizados na plataforma funcionalizada e o biossensor foi caracterizado por técnicas eletroquímicas e espectroscópicas. As detecções da interação antígeno-anticorpo foram realizadas através do sinal obtido da oxidação do intercalador de proteína, 4-aminoantipirina (4-AAP), utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial. Estudos de química teórica foram empregados para análise das interações da Am1 com a plataforma sensora e o modelo *web server RaptorX* para inferência da estrutura tridimensional das proteínas de membrana da *A. marginale*. A modelagem molecular foi realizada a partir de métodos semi-empíricos, DFT e mecânica molecular. As transições redoxes do polímero foram classificadas como quase reversíveis, com *band gap* de 1,2 V característico de materiais semicondutores. As detecções de poli CT e anticorpos da *A. marginale*, empregando o eletrodo de grafite funcionalizado com as sondas, poli GA e Am1 respectivamente, foram 66 % superior a do eletrodo de grafite não funcionalizado. A proteína de superfície Am1 apresentou uma estrutura estável em folha-beta e a Am2 uma estrutura instável em α -hélice. Na espectroscopia de impedância eletroquímica foi possível diferenciar qualitativamente a plataforma funcionalizada com: Am1, IgG+, IgG- e interferente. O tempo de estocagem do imunossensor mostrou-se satisfatório, com redução do pico de corrente em 35 %, após 90 dias. Esses resultados demonstraram a excelente aplicabilidade da plataforma funcionalizada para o desenvolvimento de imunossensor para diagnóstico da anaplasmosse bovina, restando apenas os estudos de viabilidade econômica para implantação comercial do referido imunossensor.

Palavras-Chave: Ácido 3-hidroxibenzóico. Eletropolimerização. Anaplasmosse bovina. Modelagem molecular. Imunossensor

ABSTRACT

FERREIRA, D.C., **Immunosensor for diagnosing bovine anaplasmosis in graphite platform functionalized with poly (3-hydroxybenzoic acid)**. Thesis in Chemistry, Institute of Chemistry - UFU, 2015.

The biosensors constitute analytical important devices for the clinical diagnosis of many diseases, enabling real-time analysis, with high specificity and sensitivity. Accordingly, the aim of this study was to develop a platform functionalized with the poly (3- hydroxybenzoic acid), to detection of nitrogenous bases, oligonucleotides and antibodies against the surface protein (Am1) of *Anaplasma marginale*. These biological recognition elements were immobilized on the functionalized platform and the biosensor was characterized by electrochemical and spectroscopic techniques. The detections of the antigen-antibody interaction were conducted using the signal obtained from the oxidation of protein interleaver, 4- aminoantipyrine (4 -AAP), using voltammetry technique of differential pulse. Theoretical chemistry studies were employed to analyze the Am1 interactions with the sensor platform and the web server model RaptorX to infer three-dimensional structure of the membrane proteins of *A. marginale*. The molecular modeling was conducted from methods semi-empirical, DFT and molecular mechanics. The transitions redoxes of polymer were classified as almost reversible, with band gap of 1.2 V, characteristic of semiconductor materials. The detections of poly CT and antibodies of *A. marginale*, using the graphite electrode functionalized with the probes, poly GA and Am1 respectivamente, were 66% higher than the graphite electrode not functionalized. The protein of superfice Am1 presented a structure stable in beta-sheet, while Am2 presented an unstable structure in α -helix. In electrochemical impedance spectroscopy was possible qualitatively differentiate the functionalized platform with: Am1, IgG+, IgG- and interfering. The time of storage of the immunosensor was satisfactory, with reduced peak current by 35%, after 90 days. These results demonstrate the excelent applicability of functionalized platform for the development of immunosensor for diagnosis of bovine anaplasmosis, leaving only the economic feasibility studies for commercial deployment of the said immunosensor.

Keywords: 3-hydroxybenzoic acid. Electropolymerization. Bovine anaplasmosis. Molecular modeling. Immunosensor.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho comercial de gado bovino (~180 milhões de cabeças), sendo o maior exportador mundial de carne. Apesar de ocupar uma posição de destaque, a pecuária de corte apresenta índices de produtividade baixos devido a diversos fatores intrínsecos: potencial genético, condições nutricionais, manejo e sanidade animal. Em relação às enfermidades, a anaplasmoze bovina possui grande importância econômica, com perdas por mortalidade, diminuição na produção de carne e leite e custos com medidas profiláticas e de tratamento dos animais¹. Essa doença é causada pela riquetsia intraeritrocítica *Anaplasma marginale*, um dos agentes da Tristeza Parasitária Bovina (TPB), juntamente com os hemoprotozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*².

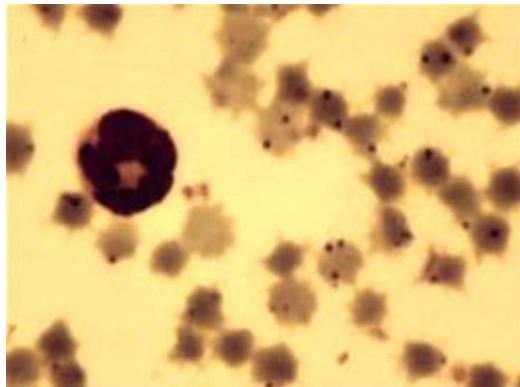
Para melhorar as provas sorológicas da anaplasmoze bovina, algumas pesquisas têm focado na identificação e caracterização de antígenos de membrana externa de *A. marginale*, pela clonagem dos genes e produção de proteínas principais de superfície (MSPs), as quais apresentam melhor potencial para desenvolvimento de testes diagnósticos³. Como resultado desses estudos, diversas MSPs foram descritas, destacando-se a MSP1 como antígeno para uso em diagnóstico, por estimular a produção de anticorpos por animais infectados, os quais podem ser detectados por meio de provas sorológicas como o Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA) indireto^{4, 5, 6}.

Apesar de apresentar inúmeras vantagens como alta sensibilidade e especificidade, ser relativamente simples de executar e permitir a análise de um grande número de amostras, o ELISA indireto é realizado em várias etapas, o que demanda um tempo longo e deve ser realizado necessariamente em laboratório. Uma nova estratégia é o uso de métodos alternativos para detecção da interação antígeno-anticorpo, como os biossensores.

2.1 ANAPLASMOSE BOVINA

Anaplasmosse bovina é uma doença com grande prevalência nas regiões tropicais e subtropicais por determinar perdas econômicas devido à mortalidade dos animais, redução da produção de carne e leite, emagrecimento dos rebanhos e custos com tratamentos⁷. É causada pela *Anaplasma marginale*, uma riquetsia intraeritrocítica, bactéria pertencente à ordem Rickettsiales. A *Anaplasma marginale* é uma bactéria gram-negativa, com morfologia arredonda, diâmetro de 0,3 a 1,0 μm . O nome marginale advém da sua localização periférica no interior do eritrócito⁸, como pode ser visualizado na Figura1.

Figura 1: Aspecto morfológico da *Anaplasma marginale*, 0,4 μm . A bactéria é caracterizada por um corpo arredondado, localizado marginalmente no interior do eritrócito.



Fonte: Gonçalves, 2000.

Anaplasma marginale está amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais da Europa, África, Ásia e Austrália⁹. Vale destacar que no estado de Minas Gerais, a anaplasmosse tem sido considerada uma das doenças de maior relevância, constituindo-se em fator limitante à criação de bezerros e bezerras de 4 a 12 meses de idade¹⁰.

2.1.1 Transmissão e ciclo de desenvolvimento



A transmissão da *A. marginale* nos rebanhos bovinos ocorre basicamente através de três mecanismos: mecanicamente pela picada de insetos hematófagos ou agulhas contaminadas, biologicamente por carrapatos¹¹ e transmitida da vaca para o bezerro através da placenta, durante a gestação ou na parição¹². O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é o principal responsável pela transmissão vetorial de *A. marginale* e *Babesia* sp.¹³. A Figura 2 apresenta parte do corpo de um bovino bastante infectada pelo carrapato (*Boophilus*).

Figura 2. Amostragem de vários carrapatos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, principais transmissores da *Anaplasma marginale* e *Babesia* sp, fixados na pele de um bovino em região de alta infestação por carrapato.



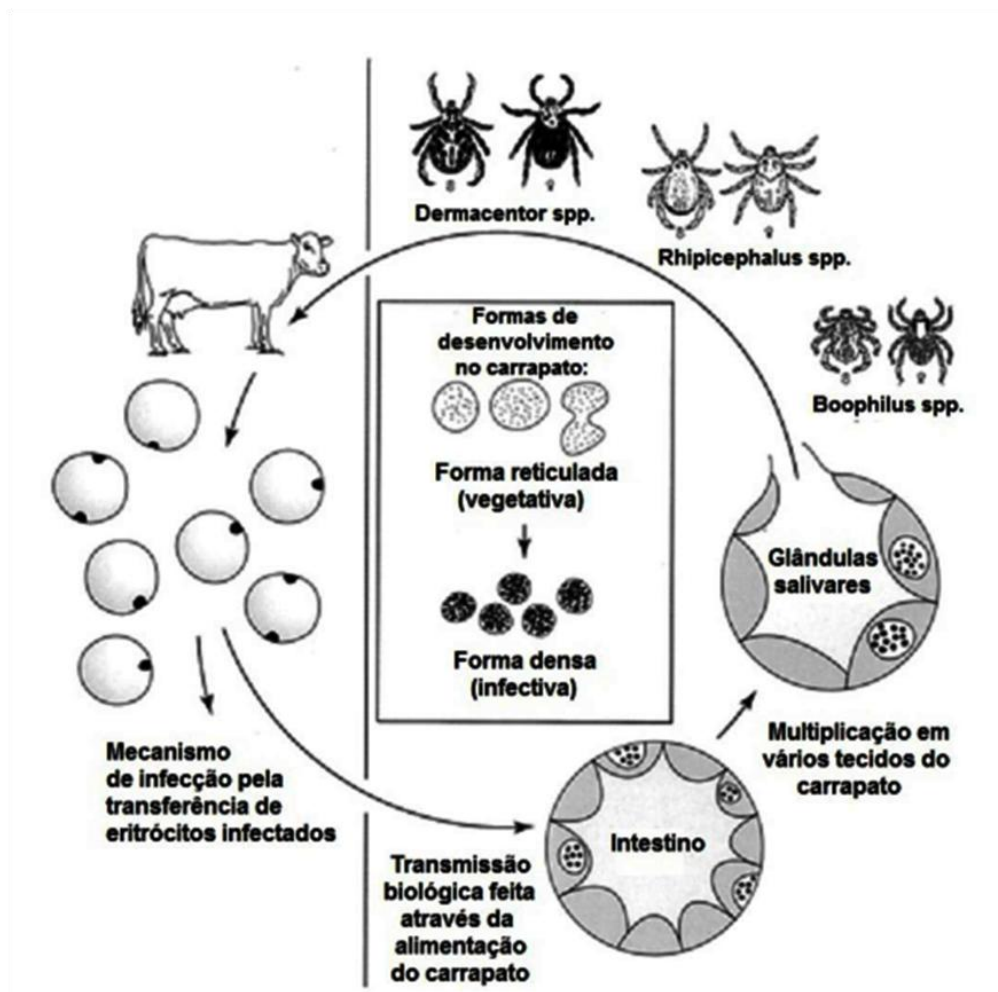
Fonte: Kocan, 2010.

O diagnóstico direto da anaplasmosse através da contagem de eritrócitos infectados examinados em microscópio revela que animais com níveis de parasitemia variando de 104 a 107 eritrócitos infectados por mL de sangue possuem alta capacidade de transmissão da bactéria, seja pelo processo biológico ou mecânico, facilitando assim a disseminação da anaplasmosse no rebanho¹⁴. Em algumas regiões onde é alta a infestação por carrapatos, a doença é considerada uma endemia. Esse fato não ocorre em regiões livres do carrapato (pastagens limpas, manejo intensivo dos animais, baixa temperatura

e baixa umidade do ar) ou naquelas marginais onde o carrapato não tem presença constante¹⁵.

A Figura 3 mostra o ciclo de desenvolvimento da *A. marginale* no bovino e no carrapato. Nesse ciclo é possível observar que os eritrócitos infectados pelo patógeno são ingeridos no repasto sanguíneo pelo carrapato, desenvolvendo em vários tecidos, em especial, nas células intestinais e células da glândula salivar. A bactéria então se multiplica, passando por uma forma reticulada e formando vacúolos ou colônias no citoplasma das referidas células. Essa forma reticulada se transforma posteriormente em uma forma densa que é a forma infectiva, a qual será transmitida, principalmente, ao hospedeiro bovino através do carrapato^{16, 17}.

Figura 3: Esquema do ciclo de desenvolvimento da *Anaplasma marginale* no bovino e no carrapato.



Fonte: Kocan, 2003.

Nos eritrócitos do bovino, o parasita se desenvolve dentro de corpos de inclusões também chamados de corpos iniciais. No interior do vacúolo, os corpos iniciais multiplicam por divisão binária, originando até oito corpos. Os corpos iniciais saem dos eritrócitos por um processo de rofecitose reversa, sem romper a membrana da hemácia, e iniciam novo ciclo ao penetrar em novos eritrócitos¹⁸. Como o organismo é raramente observado extracelularmente, tem-se postulado que a transmissão dos corpos iniciais possa ocorrer também através de pontes intercelulares entre eritrócitos. Os eritrócitos infectados são posteriormente fagocitados por células reticuloendoteliais, resultando em anemia e icterícia. A fase aguda da infecção é caracterizada pela perda de peso, febre, aborto, diminuição da produção de leite e morte¹².

2.1.2 Diagnóstico da *A. marginale*

O diagnóstico para a anaplasmoze bovina é usualmente baseado em sinais clínicos, evidentes em animais susceptíveis, no entanto, esses sinais não são específicos, sendo necessário o diagnóstico diferencial de outras enfermidades¹⁹. O diagnóstico anátomo-patológico é efetuado através de necropsia, para observação das alterações presentes no animal, sendo necessário um diagnóstico laboratorial mais detalhado, para identificação da riquetsia e pesquisa de anticorpos contra *A. marginale*²⁰.

O diagnóstico da anaplasmoze bovina pode ser feito através da detecção direta ou através da detecção indireta. No diagnóstico direto para detecção e identificação dos parasitos no bovino deve utilizar sangue venoso ou capilar (sobretudo quando houver suspeita de infecção por *Babesia bovis*) com o qual é feito um esfregaço delgado ou por gota espessa, corado por Giemsa ou May-Grünwald/Giemsa e examinado em microscópio ótico²¹. Para o diagnóstico direto do parasito em animal necropsiado, é recomendado o preparo de *claps* ou impressões, principalmente do cérebro, que devem ser fixados e corados da mesma forma que o esfregaço de sangue, por Giemsa ou May-Grünwald/Giemsa²⁵.

No diagnóstico indireto da anaplasmosose são usadas técnicas que permitem detectar e quantificar os anticorpos específicos contra a riquetsia intraeritrocítica²². Várias técnicas de diagnóstico sorológico foram desenvolvidas, como hemaglutinação indireta²³, reação da imunofluorescência indireta²⁴, aglutinação capilar²⁸, aglutinação em placa²⁵, aglutinação em cartão²⁶, aglutinação em látex²⁷, radioimunoensaio²⁸ e “Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay” (ELISA)²⁹.

A detecção de anticorpos através da prova de imunofluorescência indireta é bastante usada em levantamentos epidemiológicos, para avaliar a prevalência de infecção por *A. marginale*, uma vez que, em animais portadores, a parasitemia geralmente não é detectável no exame direto. Segundo WEILAND & REITER²⁶ o conhecimento da percentagem de animais portadores revela, por outro lado, os grupos de risco de um rebanho, sendo fundamental para a elaboração de programas de controle da doença, como, por exemplo, a necessidade ou não de vacinação.

2.1.3 Controle

As medidas de controle da *A. marginale* variam de acordo com o local de ocorrência da parasitose e incluem desde o controle do artrópode pela administração de carrapaticidas, até o uso de antibióticos e vacinas¹².

No Brasil, infelizmente, para uma grande parcela de pecuaristas, o fator determinante para a aplicação de carrapaticida é o número elevado de carrapatos no rebanho. Na verdade, o uso indiscriminado dessa prática poderá apenas selecionar as linhagens de carrapatos resistentes, facilitando ainda mais a disseminação do carrapato nas áreas de pastagens²¹. Nesse caso, é indispensável o controle estratégico, ou seja, aplicação do carrapaticida mais eficaz em dose mínima, no menor número de vezes possível no período desfavorável ao ciclo do carrapato¹⁹. A Figura 4 ilustra um banho de carrapaticida típico em um animal infectado pelo carrapato.

Figura 4: Banho de carrapaticida em animal para controlar a infestação por carrapato.



Fonte: Portal agropecuário, 2012.

A melhor maneira para se controlar a parasitose em áreas onde a infestação com o carrapato é endêmica, seria um manejo adequado dos bezerros com exposição gradual ao carrapato ainda na fase de proteção colostrar, mantendo-se um grau de infestação moderado em todo o rebanho, durante todo o ano³⁰.

A vacinação tem sido uma forma efetiva de controlar a anaplasmosse bovina. Essas vacinas se dividem em dois grandes grupos: as vacinas com organismos atenuados e vivos, que consistem no uso de eritrócitos infectados com a bactéria. A imunidade induzida pelas vacinas vivas previne a doença, mas não impede que o bovino manifeste uma infecção persistente, tornando o animal um reservatório para a transmissão mecânica da *A. marginale*²⁰.

Estudos demonstram que a membrana externa da *A. marginale* é formada por seis proteínas até então identificadas, estas são capazes de induzirem a resposta imune protetora nos bovinos, sendo alvo de estudos para o desenvolvimento de imunógenos contra a anaplasmosse³¹.

2.1.4 Sinais clínicos

Os sinais da anaplasmosse são amplamente variados desde uma doença aguda até uma infecção subclínica, refletindo a virulência da cepa do patógeno, idade e raça do hospedeiro. O período de incubação varia de 21 a 45 dias, com uma média de 30 dias dependendo do número de riquétsias e da susceptibilidade do animal. A Figura 5 mostra um animal com os principais

sinais característicos da anaplasmosse, apatia (cabeça e orelhas baixas) e inapetência (emagrecimento devido ao baixo consumo de alimentos).



Figura 5: Animal com alguns sintomas típicos da anaplasmosse bovina como a apatia e inapetência.



Fonte: Weiland, 1988.

A doença é muitas vezes leve em terneiros com idade entre 6-9 meses e cada vez mais severa em animais mais velhos. Infecção em terneiros jovens freqüentemente é assintomática e, ocasionalmente, pode ser observada letargia leve e anorexia parcial por 24-48 horas. Em contraste, os estágios iniciais de anaplasmosse em bovinos adultos são caracterizados por febre, com temperatura retal variando de 39,5 a 41°C, sendo que em 12 a 24 horas a mesma pode ceder, caindo para normal e haver hipotermia antes de o animal morrer. Também pode ser observada anorexia e, em vacas leiteiras, decréscimo acentuado na produção de leite, após a detecção de febre. Ao mesmo tempo, ocorre supressão de ruminação, focinho seco e certo grau de letargia³².

Alguns bovinos podem ficar agressivos, possivelmente como resultados de hipóxia cerebral associado com anemia³³. No período final da gestação pode ocorrer aborto, muito provavelmente em função da elevação de temperatura³⁶.

2.1.5 Importância e impacto econômico



Os orifícios no couro causados pelo carrapato, além de desvalorizar o produto, ainda favorecem a penetração de pequenas larvas de moscas, causadoras das bicheiras e do berne. Com isso, um considerável impacto econômico provocado pelo carrapato refere-se à deterioração da pele do animal. De cada três pares de calçados que saem do Brasil, mais de dois pares são fabricados com couro importado porque 70% dos couros produzidos no Brasil são de baixa qualidade devido à ação de carrapatos e bernes¹⁷.

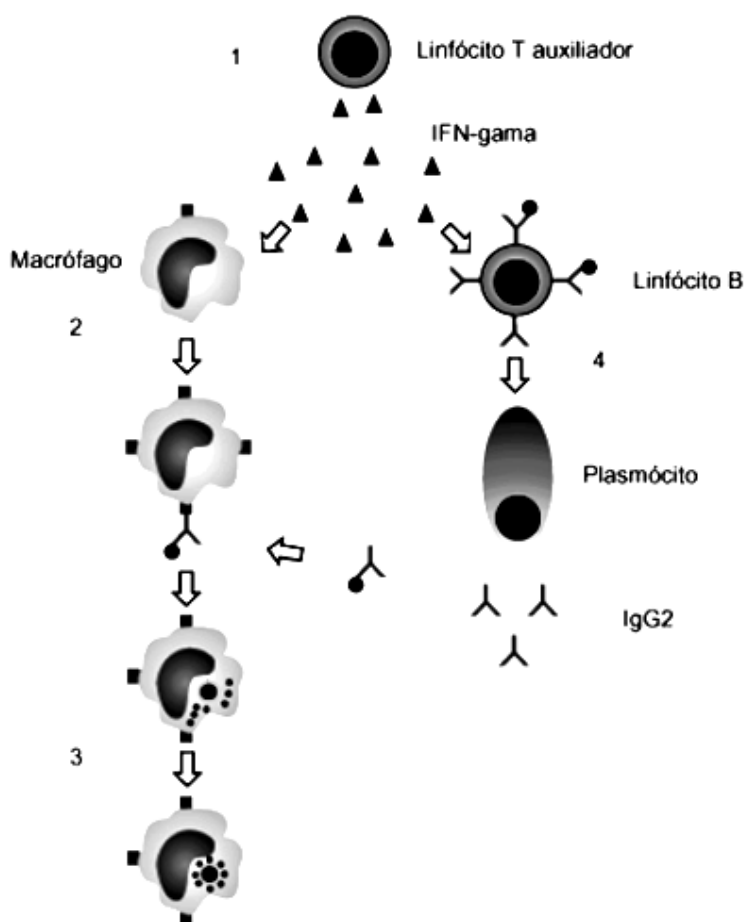
Segundo Horn & Arteché³⁴ citam que as perdas causadas pelo carrapato no Uruguai são de 9,5 Kg de carne/bovino/ano. Na Nicarágua as estimativas mostram que uma vaca leiteira infestada com 50 carrapatos diminui a produção de leite em 20% e, para o Brasil, citam que os prejuízos produzidos pelo carrapato situam-se próximos a 800 milhões de dólares ao ano na pecuária nacional, e que, só no Rio Grande do Sul, foi calculado que o carrapato mata 136.084 bovinos por ano e 154.843 bezerros deixam de nascer. Nos Estados Unidos a *American National Cattlemen's Association* tem considerado a anaplasmosose como a doença que causa maiores perdas econômicas com perdas estimadas por volta de 300 milhões de dólares anuais³⁵.

Os prejuízos causados pelo carrapato *Boophilus microplus* e pelo complexo da Tristeza Parasitária Bovina (TPB) no Brasil foram avaliados em 1 bilhão de dólares³⁶ sendo esse valor reavaliado por Grisi³⁷ estimando as perdas em cerca de 2 bilhões de dólares.

2.1.6 Resposta imune e proteínas principais de superfície de *Anaplasma marginale* com importância como imunógenos

O mecanismo de controle imune de bovinos contra a *A. marginale*, esquematizado na Figura 6, induz tanto a resposta do tipo celular quanto a resposta humoral³⁸.

Figura 6: Modelo de resposta imune celular e humoral contra *A. marginale*. 1 Linfócitos T auxiliares (CD4+), estimulados por antígenos de *A. marginale*, produzem interferon- γ (IFN- γ), o qual atua sobre macrófagos e linfócitos B. 2 sobre os macrófagos, o IFN- γ estimula a expressão de receptores de Fc, facilitando a fagocitose de *A. marginale*. 3 Atua também aumentando a fusão fagossomo lisossomo e a produção de óxido nítrico (NO), resultando na destruição intracelular de *A. marginale*. 4 O IFN- γ estimula a produção de IgG2 por linfócitos B. Esse isotipo tem importante função na opsonização de *A. marginale* para a fagocitose.



Fonte: Araújo, Madruga, Kessler, 2003.

Apesar da importância dos anticorpos na imunidade contra *A. marginale*, é pouco provável que, isoladamente, os mesmos sejam capazes de proteger os bovinos contra anaplasmoses³⁹, uma vez que, a inoculação do soro de animais imunes em bovinos susceptíveis não protege contra o desafio com *A. marginale*⁴⁰. Dessa forma, evidencia-se a importância das respostas celulares,

as quais envolvem a participação de linfócitos T auxiliares (CD4+), produtores de IFN- γ ⁴¹.



Em bovinos, a presença da *A. marginale*, linfócitos, linfócitos T auxiliares (CD4+) expressam IFN- γ , que em sinergia com a interleucina 2 (IL-2), induzem as células B a produzirem IgG2, implicando em uma resposta Th1 na regulação desse isotipo⁴². As IgG2 além de estarem envolvidas no processo de neutralização da infectividade dos corpúsculos iniciais da *A. marginale*^{43, 44}, estão relacionadas com o controle da riquetsemia aguda e anemia³⁵. Esse isotipo apresenta maior capacidade de promover fagocitose por meio de opsonização do que a IgG1⁴⁵.

O IFN- γ estimula ainda a expressão de receptores de Fc e a fusão de fagossomos e lisossomos⁴⁶, além de ativar os macrófagos a produzirem óxido nítrico (NO), que tem ação tóxica sobre a riquetsia, ajudando a eliminar a bactéria do meio intracelular⁴⁷.

Anticorpos direcionados contra corpúsculos iniciais bloqueiam a infectividade da bactéria⁴⁷. Na membrana desses corpúsculos foram identificadas proteínas principais de superfície (Major Surface Proteins – MSPs)^{35,47}, as quais induzem a produção de anticorpos que estão relacionados com o controle da riquetsemia aguda e anemia³⁵, além de gerar informações sobre as sequências dos genes, proteínas recombinantes, anticorpos monoclonais, variabilidade de isolados, e potenciais valores em ensaios de diagnósticos de vacinas²⁰. Possivelmente, anticorpos contra MSPs funcionam como opsoninas, facilitando a fagocitose e a eliminação de *A. marginale* por macrófagos. Outra possível função dos anticorpos seria o bloqueio da invasão de eritrócitos pela bactéria. Anticorpos contra MSP1 bloqueiam a aglutinação de eritrócitos de bovinos por corpúsculos iniciais de *A. marginale*⁴⁸.

O pequeno genoma da *A. marginale* é circular, com tamanho estimado entre 1,2 e 1,6 Mb⁴⁹. A membrana da *A. marginale* é composta por seis proteínas principais de superfície: MSP1a (105 kDa), MSP1b (100 kDa), MSP2 (36 kDa), MSP3 (86 kDa), MSP4 (31 kDa) e MSP5(19 kDa)⁵⁰.

O complexo MSP1 é formado pelas proteínas MSP1a e MSP1b. Uma única proteína MSP1a está ligada, covalentemente, por ligações de dissulfeto a proteína MSP1b⁶. Essas duas proteínas atuam como adesinas e estão

envolvidas no processo de invasão dos corpúsculos iniciais de *A. marginale* à membrana dos eritrócitos do hospedeiro⁵².

Vale ressaltar que a MSP1a é codificada pelo gene *mSP1a*, possui uma variação no peso molecular de 46 a 105 kDa mudando de acordo com os diferentes isolados geográficos de *A. marginale*, inclusive nas regiões brasileiras⁵¹. Isso se deve ao fato da porção amino terminal da proteína apresentar uma sequência repetida de 23 ou 31 aminoácidos, contendo várias serinas⁵². Essa proteína funciona como uma adesina entre os eritrócitos do bovino e as células do carrapato^{6,55}.

A MSP1b é codificada pelos genes *ms1b1* e *ms1b2*. Esses genes apresentaram uma similaridade entre isolados na sequência dos aminoácidos, o que sugere que as regiões altamente conservadas dessa proteína podem ter importância como imunógenos⁵³.

A MSP2 é uma proteína imunodominante de superfície, codificada por uma família de genes polimórficos⁵⁴. A inoculação de bovinos com membrana externa de *A. marginale* resultou em proteção de 70 %, a qual se correlacionou com os títulos de anticorpos contra MSP2³⁵.

A MSP3 é codificada por uma família multigênica, responsável por importantes variações antigênicas encontradas na superfície da *A. marginale*⁵⁵. Altos níveis de anticorpos contra essa proteína foram detectados em soros de bovinos cerca de 30 dias após a infecção por *A. marginale* e em animais portadores por pelo menos cinco anos⁵⁶. Bovinos imunizados com MSP3 nativa apresentaram um retardo no surgimento da riquetsemia após a aplicação⁵⁷.

A MSP4, codificada por gene de cópia única, é uma proteína conservada entre diferentes isolados geográficos de *A. marginale*, incluindo os vários estados brasileiros^{47,55} e está presente na membrana interna e externa dessa riquetsia⁴⁷. Os soros de bovinos imunizados com membrana externa de *A. marginale* e em seguida desafiados, reconheceram a MSP4⁵⁸.

A MSP5 é uma proteína que apresenta um epítipo altamente conservado entre diferentes isolados geográficos de *A. marginale*⁵⁹. Devido à essa conservação foi desenvolvido por Knowles (1996)⁶⁰ um método diagnóstico por ELISA competitivo que utiliza a MSP5 como antígeno, sendo capaz de detectar anticorpos específicos contra *A. marginale*.

2.1.7- Produção de moléculas sintéticas equivalentes às MSPs



Uma importante técnica da biologia molecular empregada para produzir moléculas sintéticas equivalentes às biomoléculas é o *phage display*. Com esta técnica é 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 *A. marginale*⁶¹.

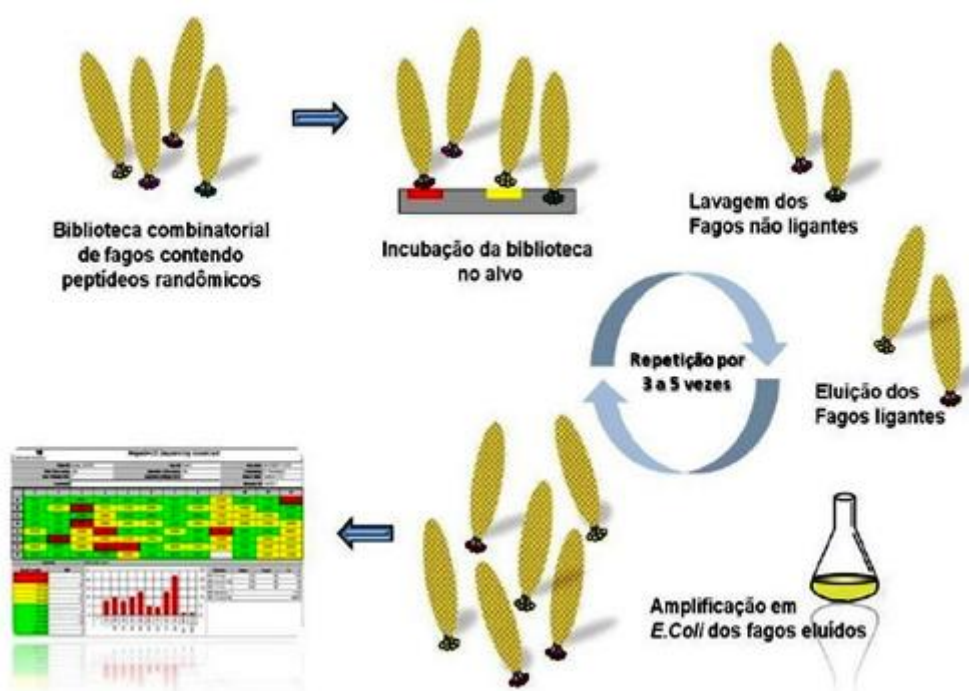
O peptídeo ou proteína expressa na superfície do fago possibilita a seleção de sequência baseada na afinidade de ligação a uma molécula alvo por um processo de seleção *in vitro* denominado *biopanning*, realizado pela incubação da biblioteca de peptídeos expostos em fagos contra o alvo.

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^{62,63}.

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. A Figura 7 ilustra a seleção de proteínas ligantes a partir de uma biblioteca de *phage display*. Uma das grandes vantagens apresentadas pela técnica de *phage display* pode ser resumida na capacidade de

mapeamento de epítomos 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^{64,65}.

Figura 7: Esquema ilustrativo de seleção de proteínas por *phage display*⁶⁶.



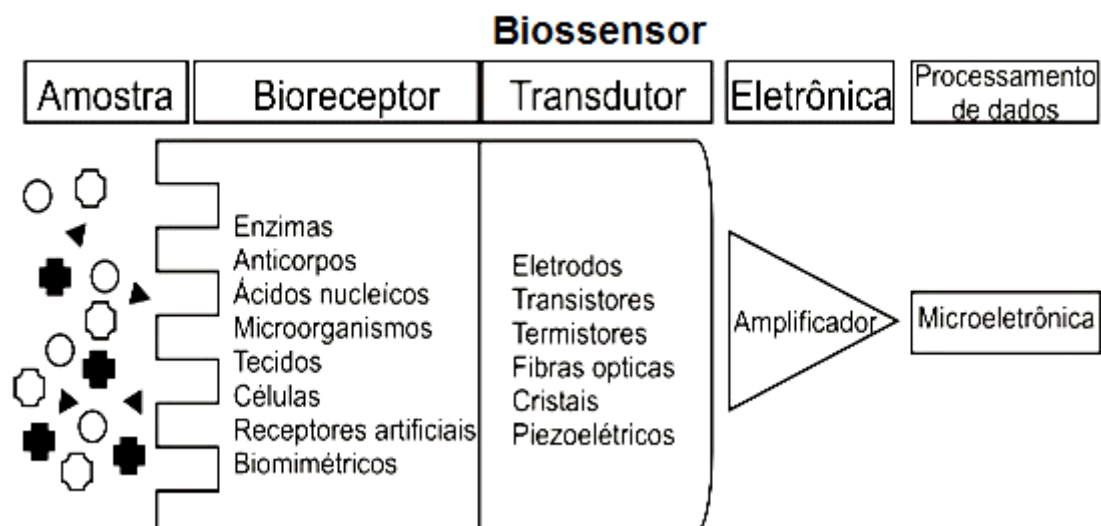
Fonte: Santos, 2011.

2.2 BIOSSENSORES

Os biossensores são dispositivos analíticos compostos por uma camada de reconhecimento biológico imobilizada sobre um transdutor⁶⁷. Uma definição mais elaborada, proposta pela IUPAC⁶⁸, um biossensor é um dispositivo integrado que é capaz de fornecer quantidade específica de informação analítica usando um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) em contato espacial direto com o transdutor. Um biossensor deve

ser claramente distinguível de um processo bioanalítico, o qual requer etapas de processamento adicional tal como adição de reagente. Um esquema de um biossensor pode ser visto na Figura 8⁶⁹.

Figura 8: Esquema de um biossensor.



Fonte: Yanaga, 2006.

As principais características destes dispositivos, que os convertem em opções altamente atrativas no mercado, capazes de competir com outros tipos de tecnologia são: sua especificidade, alta sensibilidade, curto tempo de análise, capacidade de inclusão em sistemas integrados, facilidade de automatização, análise em tempo real, versatilidade e baixo custo.

O transdutor é o elemento que recebe os sinais físico-químicos do processo biocatalítico, geradas pela interação biorreceptor-analito e as converte em um sinal que pode ser eletronicamente visualizado, amplificado e armazenado⁷⁰. O sistema de transdução deve ser adequado ao sensor de acordo com a natureza da interação bioquímica com as espécies de interesse⁷¹. O tipo de transdução de sinal está diretamente relacionado à característica física ou química do produto gerado pelo componente biológico^{71, 72}. Os tipos de transdução mais comumente utilizados são apresentados no Quadro 1.

Quadro 1: Principais sistemas de transdução aplicados no desenvolvimento de biossensor e técnicas de detecção.

| Sistemas de transdução | Técnicas |
|------------------------|---|
| Eletroquímico | Amperometria Potenciometria Espectroscopia de impedância eletroquímica Voltametria cíclica Voltametria de pulso diferencial Voltametria de onda quadrada |
| Elétrico | Condutividade |
| Óptico | Luminescência Interferometria Elipsometria Fluorescência Índice de refração Ressonância plasmônica de superfície (SPR) |
| Térmico | Calorimetria Termístores |
| Piezelétrico | Microbalança de cristal de quartzo Ondas acústicas de superfície |
| Mecânico | Microscopia de força atômica (AFM) |

Fonte: Autor, 2015.

Os transdutores eletroquímicos, piezoelétricos e ópticos têm sido os mais empregados na construção de biossensores por apresentarem maior sensibilidade⁷³.

Dentre outras vantagens dos biossensores amperométricos e potenciométricos, quando comparados a outros sistemas de transdução, podem citar a facilidade de construção, baixo custo e estabilidade.

Admitindo que as biomoléculas sejam amplamente utilizadas para o reconhecimento molecular de substâncias, os biossensores podem ser

aplicados nas mais diversas áreas: em diagnósticos clínicos, incluindo os testes rápidos para dosagens bioquímicas, no controle ambiental para o monitoramento de substâncias como fenóis, pesticidas e metais pesados, no controle de qualidade de matéria prima e produto processado da indústria de alimentos, avaliação de contaminação microbiana, concentração de nutrientes e corantes, e na indústria de fermentações, no monitoramento e controle contínuo da composição de biomassa, substrato, produtos e subprodutos presentes no meio^{74, 75}.

As características de reconhecimento dos biossensores são geralmente determinadas por elementos seletivos presentes na membrana de reconhecimento⁷⁴. A composição do analito de interesse quanto do elemento de reconhecimento biológico são de grande importância para garantir o desempenho do sensor, e podem ser relacionados a parâmetros como seletividade, sensibilidade, estabilidade, tempo de resposta e possibilidade de reutilização do mesmo⁷⁶.

Uma das características mais importantes de um biossensor está relacionada à elevada especificidade conferida pelo bioelemento seletivo a que está associado⁷⁷. Desta forma, para um bom desempenho, é necessária uma concentração adequada do bioelemento, além de baixas interações não específicas e estabilidade do biocomponente imobilizado. A capacidade seletiva do biossensor está diretamente relacionada com a estrutura, a função do bioelemento e sua interação com o analito. Fatores interferentes, mesmo em concentrações significativamente superiores às moléculas a serem detectadas na amostra biológica, não devem exercer influência na resposta analítica⁷⁴.

Outra característica indispensável no desenvolvimento de um biossensor está no fato dele apresentar um reduzido tempo de resposta, o que possibilita a sua aplicação no monitoramento e detecção em tempo real da presença ou atividade de uma determinada substância⁷⁸. Processos analíticos que apresentem um longo tempo de resposta devido a um processo cinético lento, por exemplo, podem limitar suas possíveis aplicações e impedem que as respostas sejam obtidas em tempo real. Adicionalmente deve possuir elevada estabilidade, tanto operacional como de armazenamento, o que depende significativamente do método de imobilização escolhido para o bioelemento. A

possibilidade de reutilização é outra característica relevante para os biossensores, que, além de diminuir os gastos com reagentes, e conseqüentemente, o custo de cada ensaio, geralmente assegura maior reprodutibilidade aos resultados⁷⁹.

O biorreceptor ou camada de reconhecimento pode ser definido como sendo o elemento biologicamente ativo, o qual interage de forma específica com o analito, gerando uma alteração em um ou mais parâmetros físico-químicos associados com esta interação⁷⁰. O biorreceptor é responsável pelo reconhecimento do analito e também pela especificidade do sensor^{71, 74}.

O tipo de biomolécula imobilizada sobre o transdutor ocasiona distinção entre 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 metileno⁸⁰.

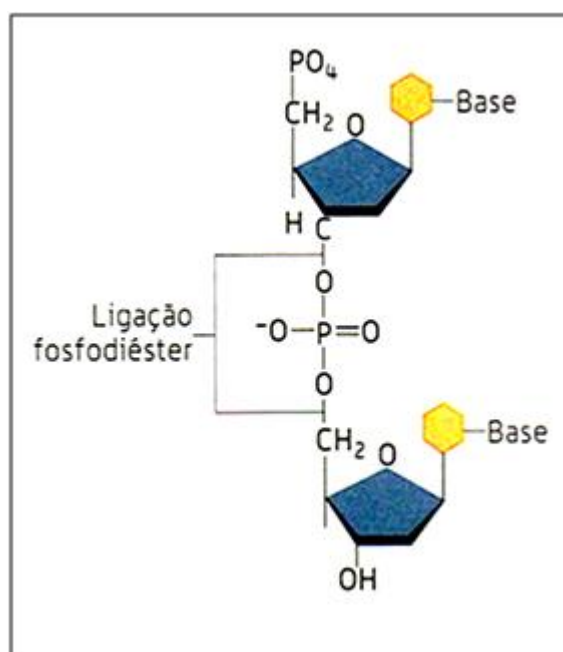
Já os imunossensores baseiam-se no uso de um anticorpo que interage especificamente com o antígeno a ser testado ou detectado. A especificidade da interação antígeno-anticorpo permite o desenvolvimento de imunossensores para diagnósticos clínicos, monitoramento ambiental, dentre outros⁸⁰.

2.2.1 Camada de reconhecimento para o desenvolvimento de genossensor

No caso dos genossensores, a molécula de reconhecimento imobilizada na superfície do transdutor pode ser uma simples fita DNA, oligonucleotídeos ou simplesmente bases nitrogenadas.

Do ponto de vista químico, o DNA é uma biomolécula, formada por unidades de nucleotídeos. Cada nucleotídeo é formado por uma pentose (desoxirribose) ligado em uma das extremidades a um grupo fosfato e na outra extremidade a uma base nitrogenada. Os nucleotídeos estão ligados entre si por ligações fosfodiéster, conforme apresentado na Figura 9. Nas moléculas de açúcar sempre encontramos ligado covalentemente às bases nitrogenadas purínicas (adenina e guanina) e as pirimidínicas (citosina e timina) conforme apresentado na Figura 10 ⁷⁸.

Figura 9: Ligação fosfodiéster entre nucleotídeos.



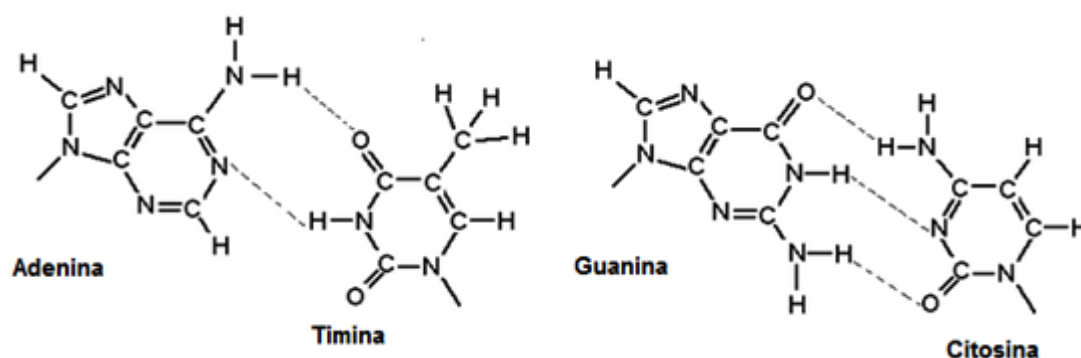
Fonte: Vinícius, 2012.

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, ou seja, a cadeia de DNA fica com uma direção bem definida, na direção de 5' para 3'.

Na hibridização do DNA o pareamento das bases de cada fita se dá de maneira ordenada, sempre uma purínica com uma pirimidínica, 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 10 também mostra as duas ligações de hidrogênio entre a adenina e a timina e as três ligações de hidrogênio entre a guanina e a citosina⁷⁹.

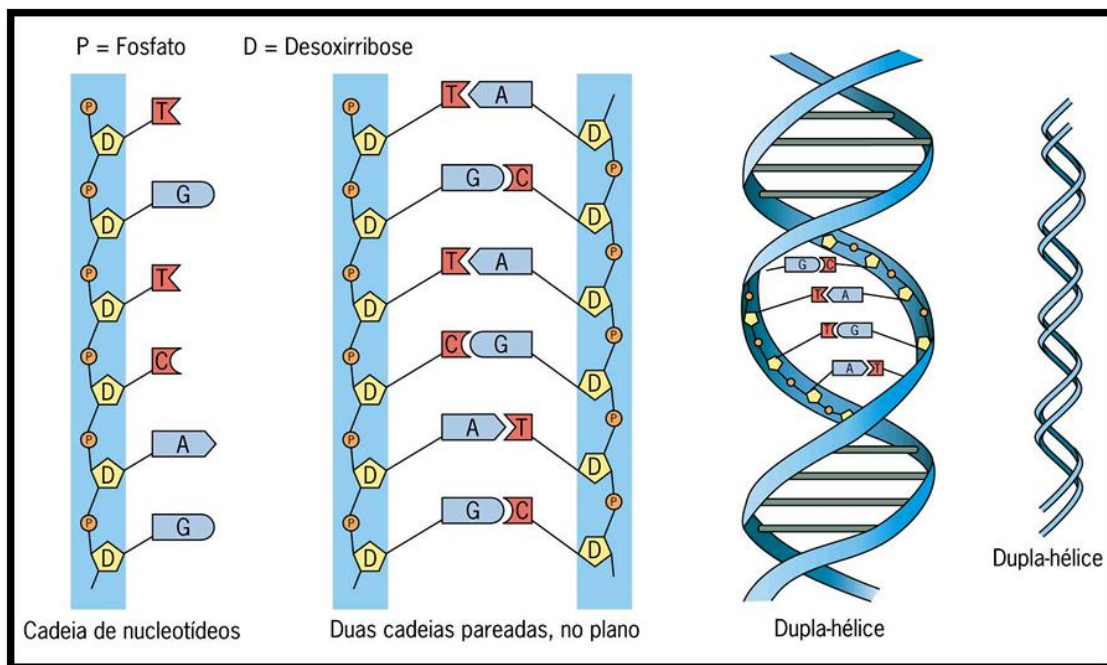
Figura 10: Formação das ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas purínicas e pirimidínicas.



Fonte: Alberts et al., 2002.

Esse tipo de pareamento de bases ocorre no DNA de dupla fita. James Watson e Francis Crick em 1953⁸⁰ postularam um modelo tridimensional que consistia de duas cadeias em forma de hélice de DNA em torno do próprio eixo para formar uma dupla hélice. A estrutura hidrofílica de desoxirribose alternada e grupos fosfato está na parte externa da hélice, em frente à água circundante. As bases purinas e pirimidinas de ambas as fitas estão voltadas para dentro da hélice, com sua estrutura hidrofóbica e quase planar próximas e perpendiculares ao longo eixo. Cada base de nucleotídeo de uma fita está pareada no mesmo plano com a base da outra fita⁸¹. Uma ilustração das ligações entre os pares de base e a forma da dupla hélice é mostrada na Figura 11⁸².

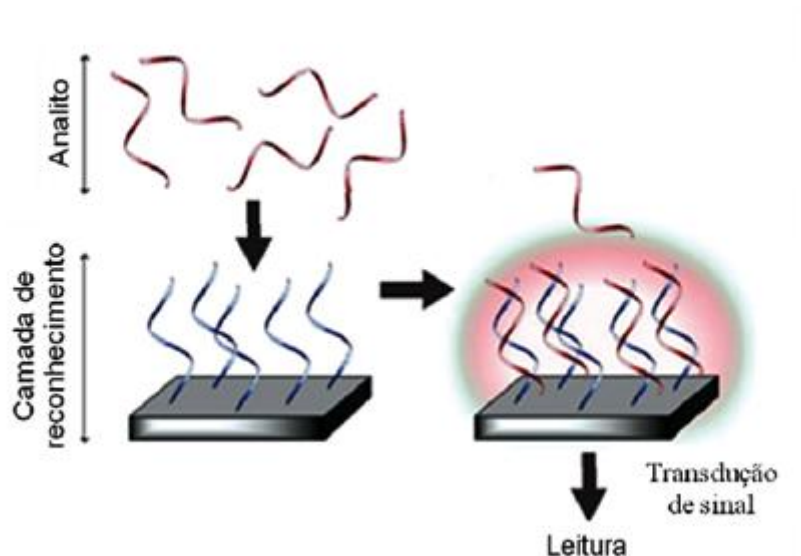
Figura 11: Modelo de estrutura do DNA proposto por Watson e Crick.



Fonte: Silva; Sasson, 2002.

Um genossensor básico é desenvolvido pela imobilização de um oligonucleotídeo⁸³ de simples fita, produtos de PCR (*Polymerase Chain Reaction*)⁸⁴ sobre a superfície de um transdutor para reconhecer a sequência de DNA complementar através de hibridização. Métodos diretos e indiretos são usados para detecção da imobilização de sonda e alvo sobre a matriz. Um esquema de um possível genossensor pode ser visto na Figura 12⁸⁵.

Figura 12: Esquema de um Genossensor



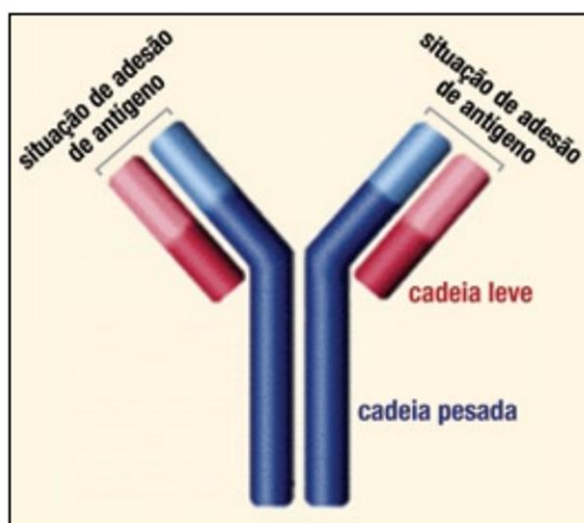
Fonte: Drummond; Hills; Barthon, 2003.

2.2.2 Camada de reconhecimento para o desenvolvimento de imunossensor

Conforme já mencionado anteriormente, os biossensores baseados na interação imunológica de um antígeno (Ag) com um anticorpo (Ac) específico são denominados de imunossensores, esses são capazes de monitorar o complexo formado entre antígeno-anticorpo^{86, 87}.

Anticorpos são glicoproteínas de formato globular secretadas por linfócitos B que conferem a característica de especificidade da resposta imune humoral adquirida. Eles são produzidos pelos animais em resposta à presença de substâncias estranhas denominadas de imunógenos ou antígenos. Os anticorpos são formados por duas cadeias polipeptídicas: duas cadeias idênticas entre si denominadas cadeias pesadas e duas cadeias idênticas entre si chamadas cadeias leves. As cadeias leves se ligam as cadeias pesadas por ligações dissulfeto, S-S. Distribuídos pelas cadeias encontram-se estruturas denominadas domínios, sequências repetitivas de aminoácidos que assumem conformação particular, podendo ser constantes ou variáveis. A Figura 13 ilustra a estrutura geral das cadeias de um anticorpo⁸⁸.

Figura13: Estrutura de um anticorpo com destaque para as cadeias leves e pesadas e para o sítio de ligação do antígeno.



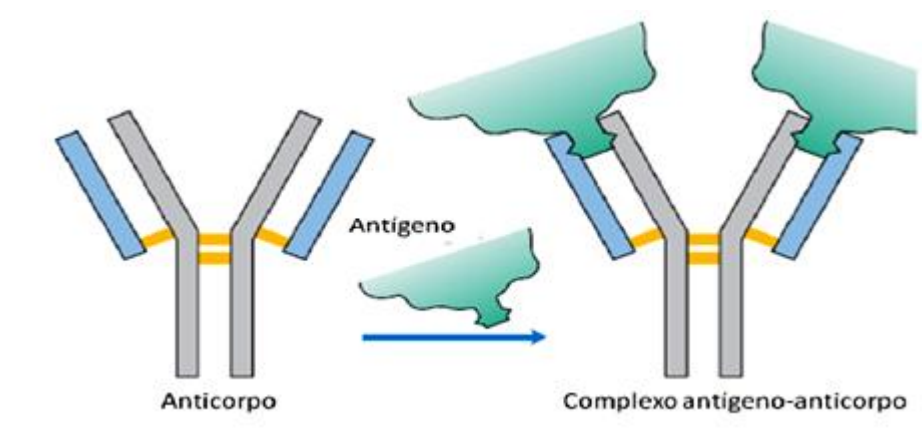
Fonte: Disponível em: [http:// www.mielomamultiplo.org/tag/o-que-sao-cadeias-leves](http://www.mielomamultiplo.org/tag/o-que-sao-cadeias-leves). Acesso em: 05 out. 2014.

Os anticorpos são classificados de acordo com o tipo de cadeia pesada que apresentem [isotipos gama (γ), mu (μ), épsilon (ϵ), delta (δ) e alfa (α): γ – IgG (subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), δ – IgD, ϵ – IgE, μ - IgM e α – IgA (subclasses IgA1 e IgA2). As cadeias pesadas de uma molécula de IgG interagem até o fim e, então, se ramificam separadamente com as duas cadeias leves formando uma molécula na forma de um Y ⁹⁰.

Um antígeno é qualquer molécula ou patógeno capaz de provocar uma resposta imunológica. Pode ser um vírus, uma parede celular bacteriana, uma proteína individual ou outra macromolécula. A maneira mais simples e direta dos Ac protegerem o hospedeiro contra agentes patogênicos ou seus produtos tóxicos é através da neutralização. Nesse mecanismo o Ac se liga ao patógeno (ou toxina) bloqueando o acesso destes as células que poderiam ser infectadas ou destruídas. Em seguida, o patógeno neutralizado é fagocitado por macrófagos. Esse mecanismo é importante, por exemplo, contra patógenos como os vírus que ao serem neutralizados pelos Ac são impedidos de penetrar nas células e replicarem ⁸⁹.

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 têm elevada complementaridade com os antígenos correspondentes e vice-versa. A ligação entre antígeno e anticorpo pode ser vista na Figura 14 ⁸⁴.

Figura 14: Ligação do anticorpo IgG ao antígeno específico.

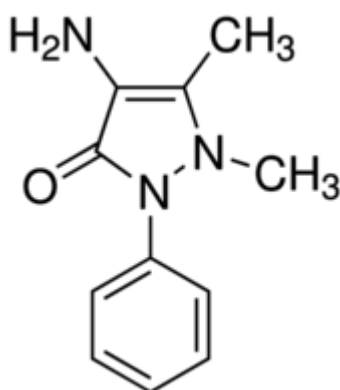


Fonte: Lehninger, 2004.

O desenvolvimento de biossensores paltados nas interações antígeno e anticorpos tornaram-se importantes, em várias áreas da medicina que estudam o diagnóstico das doenças infectocontagiosas no homem. Também são excepcionais as aplicações dos imunossensores na pecuária, principalmente, no diagnóstico de doenças como a anaplasmoze bovina, que por sua vez, possui grande importância econômica, com perdas por mortalidade, diminuição na produção de carne, leite e derivados¹. Devido à dificuldade de antígenos e anticorpos apresentarem respostas eletroquímicas, isto é, variações em corrente e carga, os primeiros imunossensores utilizaram-se de técnicas ópticas e condutimétricas⁹⁰. Além dessas técnicas de detecção, também vale ressaltar que o estudo da interação antígeno-anticorpo pode ser realizado através da detecção indireta, para isso, basta adicionar um intercalador de proteína que seja eletroativo, 4-aminoantipirina, e monitorar o sinal de corrente desse intercalador ao interagir com o complexo antígeno-anticorpo em estudo.

A Figura 15 representa a estrutura química da 4-aminoantipirina (4-AAP).

Figura 15: Estrutura química da 4-AAP



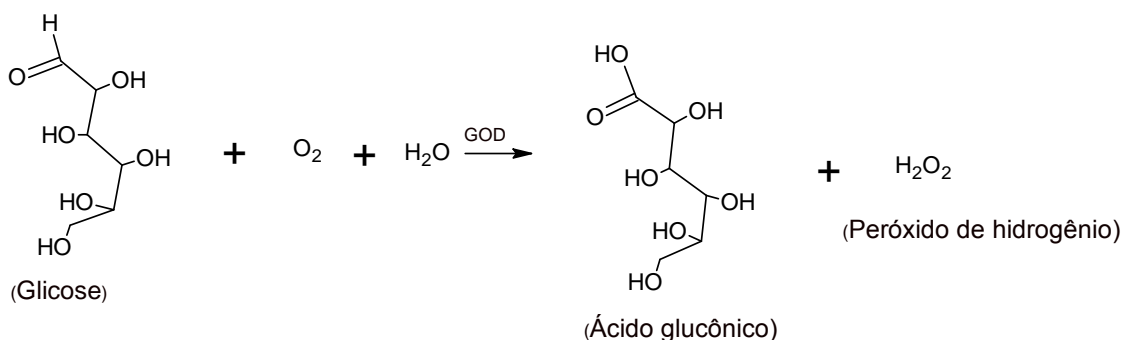
Fonte: Autor, 2015.

A 4-aminoantipirina é uma base orgânica de sabor ligeiramente amargo, utilizada na síntese de fármacos como os antipiréticos (antitérmicos), analgésicos e anti-reumáticos. Essa substância também é comercializada como fenazona, dimetiloxichinizina ou 1-fenil-2,3-dimetil-5-piazolona. A respeito de suas principais propriedades podemos mencionar que a referida substância apresenta-se como um sólido branco e cristalino nas condições ambiente, bastante estável, com temperatura de fusão e ebulição por volta de 111,5°C e 319°C respectivamente e densidade igual a 1,19 g/ cm³. A dose letal (DL50) em ratazana é de 1, 705 mg kg⁻¹, como isso, verifica se que a 4-AAP pode ser classificada como uma substância relativamente tóxica para ratos, em virtude do seu baixo valor para a DL50⁹¹.

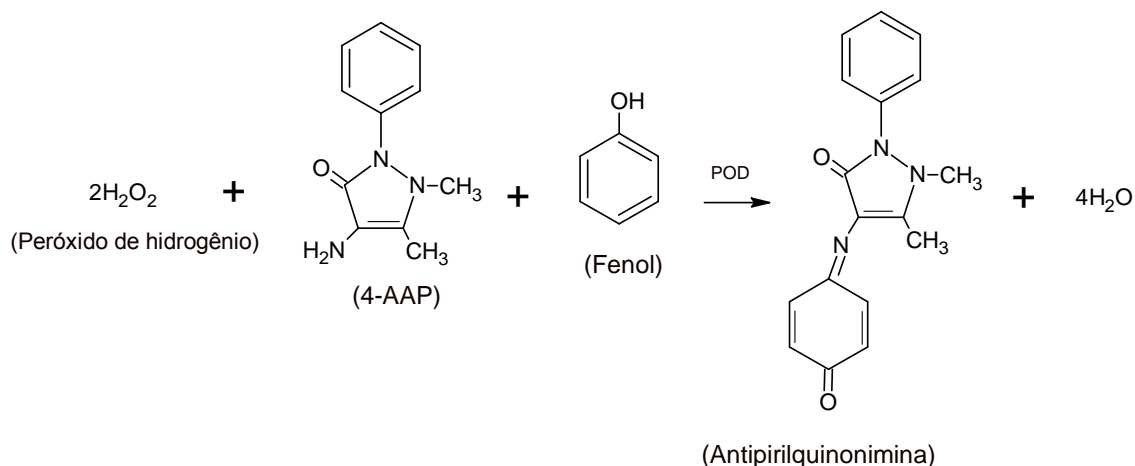
A 4-aminoantipirina é uma substância eletroativa, com isso, ela é bastante empregada em reações de oxirredução para quantificar substância redox presentes em uma determinada amostra. Uma prática que emprega essa metodologia é a quantificação de glicose no sangue. A glicose na presença da enzima glicose oxidase (GOD) forma o ácido glucônico e o peróxido de

hidrogênio, conforme a reação representada na equação química 1. O peróxido ao ser catalisado pela peroxidase (POD) irá reagir com a 4-AAP em presença de fenol para formar uma substância de coloração vermelha denominada de 4-antipirilquinonimina, conforme a reação representada na equação química 2. A 4-antipirilquinonimina apresenta absorvidade máxima em 500 nm ⁹².

Equação química 1:



Equação química 2:



Com isso, a intensidade da coloração do produto formado pela oxidação da 4-AAP e do fenol é diretamente proporcional à concentração de glicose no sangue (lei de Lambert-Beer).

Devido a essa propriedade redox da 4-AAP associada a sua capacidade de interagir com proteínas ou peptídeos, essa substância também é muito utilizada como intercalador de proteína para o desenvolvimento de biossensor ^{92, 93}.

2.2.4 Técnicas de imobilização

O princípio básico de qualquer metodologia de imobilização é manter a máxima atividade da biomolécula na superfície do transdutor evitando ao máximo a perda do componente biológico por processos de lixiviação. Analisando os fatores que influenciam os biocomponentes, como as condições do meio ou o procedimento de imobilização, é possível definir a técnica que possui as condições mais adequadas ao sistema em estudo⁹⁴.

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 freqüentemente 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. A desvantagem está associada à dependência das forças de interação às condições do experimento, pH, temperatura e força iônica^{95, 96}.

No caso de se empregar a imobilização por ligação covalente as principais vantagens estão associadas ao fato de apresentar baixa resistência difusional e ser estável sob condições adversas, isso é essencial para o desenvolvimento de um biossensor com maior robustez. A principal desvantagem desse tipo de imobilização é que a matriz não é regenerada⁷⁹.

As técnicas de imobilização são estudadas de diferentes maneiras na área de desenvolvimento dos biossensores. Na verdade, quanto melhor ou mais fáceis forem as imobilizações, maior a probabilidade de sucesso no funcionamento dos dispositivos. Uma alternativa para o melhoramento é a modificação da superfície do transdutor com polímeros condutores ou semicondutores que apresentem em suas estruturas grupos funcionais que possam interagir com grupamentos específicos das biomoléculas.

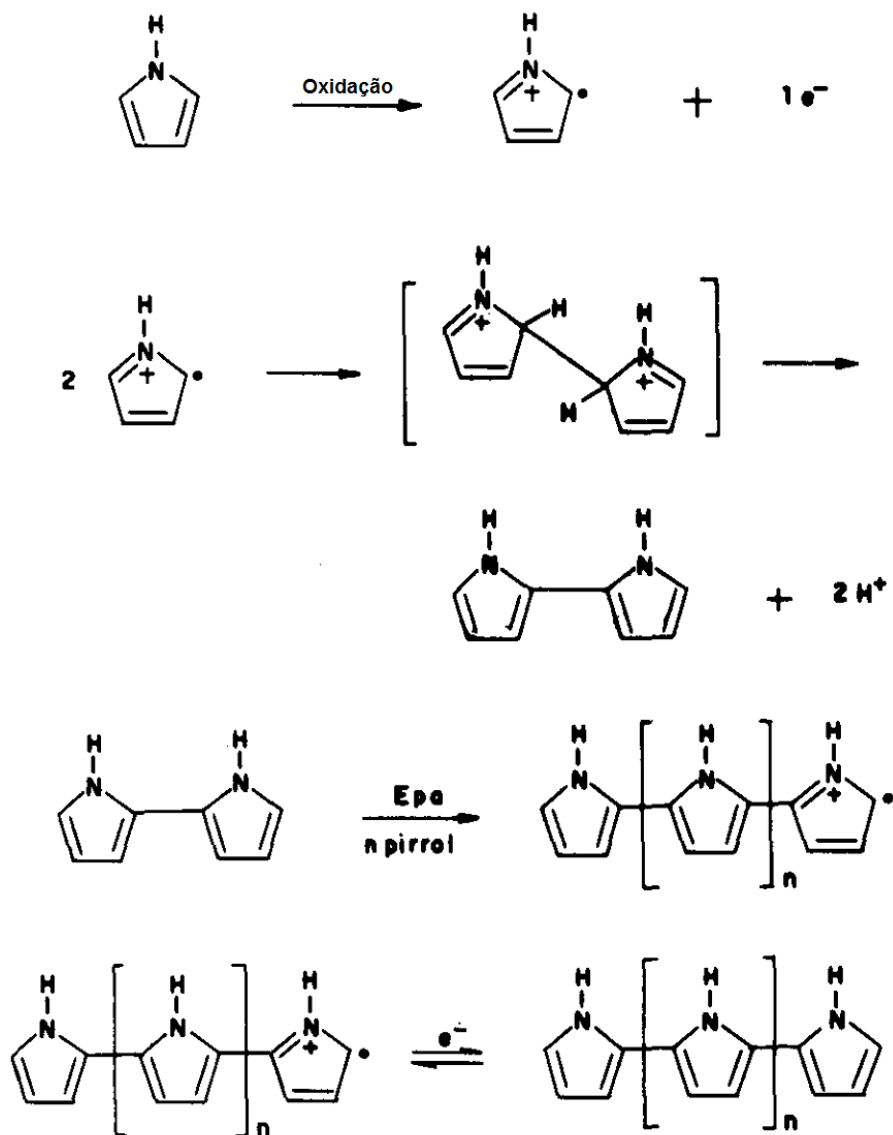
2.2.5 Eletrodos modificados com filmes poliméricos

A fim de melhorar a reatividade e seletividade dos eletrodos tradicionais (carbono, platina, ouro, entre outros), foram desenvolvidos métodos para imobilizar espécies com diferentes atividades catalíticas na superfície destes eletrodos^{97,98,99}. Murray (1975)¹⁰⁰ denominou esses eletrodos de quimicamente modificados. Essa modificação da superfície objetiva pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução, como forma de alterar sua reatividade e seletividade, ampliando o desenvolvimento de eletrodos para vários fins e aplicações, como o desenvolvimento de um imunossensor para diagnóstico da anaplasmosse bovina em amostras de soro bovino oriundas da região Sul do Brasil, conforme descrito posteriormente na metodologia do presente trabalho.

Uma nova classe de polímeros conhecida como polímeros intrinsecamente condutores (PIC)^{101, 102} ou polímeros conjugados, está sendo estudada devido às interessantes propriedades elétricas e ópticas¹⁰³ que vêm suprir diversas demandas das áreas de microeletrônica, química analítica e biotecnologia.

A obtenção dos polímeros condutores é bastante simples, sendo o método eletroquímico o mais relatado¹⁰⁴. Como exemplo de reação de eletropolimerização, temos o mecanismo proposto para o polipirrol, heterociclo de cinco membros, em que primeiro ocorre a oxidação do monômero com a formação do cátion-radical, seguida do acoplamento de dois cátions radicais, com desprotonação e reconstituição do sistema aromático (Figura 16)¹⁰⁵.

Figura 16: Mecanismo de eletropolimerização para heterociclos de cinco membros.



Fonte: Adaptado de Zoppi, 1993.

Nas reações de eletropolimerização, a estabilidade do cátion radical é o fator determinante para obtenção de um polímero com elevado grau de conjugação. Vale ressaltar que um cátion radical muito estável pode difundir do substrato para o meio reacional dando origem a oligômeros solúveis, enquanto que um cátion radical mais reativo pode propiciar o surgimento de várias reações colaterais. As propriedades elétricas e físico-químicas do material eletrossintetizado dependem fortemente das condições experimentais da eletrossíntese, tais como: concentração do monômero, natureza do meio

eletrolítico, temperatura, uma vez que, essas condições interferem nas características estruturais do polímero formado^{103, 104, 106}.

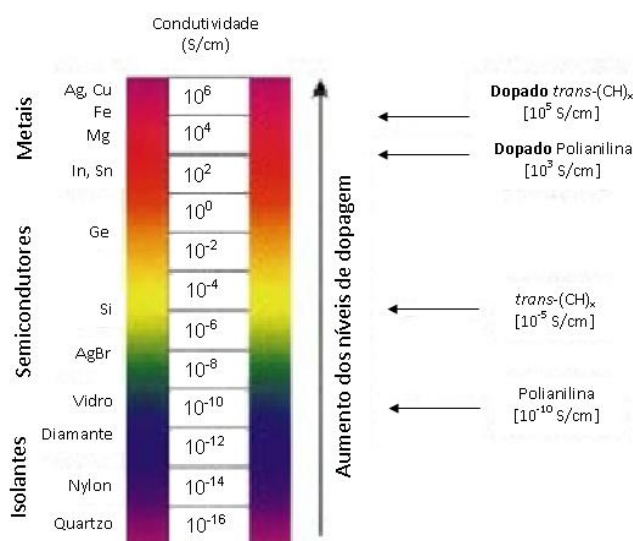


As propriedades dos polímeros condutores dependem de suas características estruturais. Em geral, os PIC's apresentam uma configuração de ligações conjugadas, ou seja, ligações simples e duplas alternadas ao longo das cadeias são responsáveis pelo processo de condução eletrônica. Além da condutividade elétrica, esses elétrons deslocalizados são responsáveis por outras propriedades, como as baixas energias de transição ótica e o baixo potencial de ionização¹⁰⁷.

A condutividade dos polímeros vem dos estados de oxidação e redução, nestes estados há perda ou ganho de elétrons nas estruturas dos polímeros. Quando os polímeros estão eletricamente carregados, os contra-íons da solução eletrolítica entram na cadeia polimérica produzindo uma eletroneutralidade. Nos polímeros condutores, os transportadores de carga são gerados dentro da cadeia do polímero e os contra-íons são denominados dopantes¹⁰⁸.

A condutividade elétrica de vários polímeros condutores pode ser comparada aos metais convencionais, aos semicondutores e aos isolantes, por estarem na mesma faixa de grandeza da maioria desses materiais¹⁰⁹, conforme apresentado na Figura 17¹¹⁰

Figura 17: Escala de condutividade dos polímeros, segundo o aumento dos níveis de dopagem.



Fonte: Adaptado de MacDiarmid, 2001.

Os principais tipos de dopagem utilizados são denominados: tipo-p e tipo-n. A dopagem tipo-p dos polímeros conjugados é realizada pela oxidação da estrutura conjugada, como o tiofeno, o pirrol e o furano; enquanto na dopagem tipo-n ocorre a redução da estrutura conjugada, como no caso da piridina, quinolina e quinoxalina. Ambos os tipos de dopagem ocorrem por meio de métodos químicos ou eletroquímicos¹¹¹.

Esse processo de intercalação de íons oriundos do eletrólito nos interstícios da malha polimérica é descrito como uma inserção reversível de espécies, favorecendo as interações eletrônicas entre cadeias adjacentes, flexíveis, sem que ocorram modificações drásticas¹¹².

Entretanto, a oxirredução do polímero provoca significantes transformações na geometria e na estrutura eletrônica da cadeia polimérica. A deficiência ou o excesso de elétrons gera uma alteração na densidade eletrônica da cadeia. No caso de uma oxidação, gera um cátion radical (polaron), que afeta a energia de banda proibida (gap) provocando o aparecimento de um estado eletrônico localizado entre as bandas de valência e condução¹¹³. O polaron pode mover-se livremente ao longo da cadeia e associar-se com outros contra-íons oriundos do eletrólito. A presença do dopante permite que níveis de energia intermediários sejam introduzidos na região da banda proibida, possibilitando que a transferência de elétrons da banda de valência para a banda de condução seja favorecida com o aumento do nível de dopagem¹¹².

O interesse em monômeros que na eletrossíntese geram polímeros condutores ou semicondutores está voltado principalmente para a aplicação em sensores biológicos, uma vez que, quando eletropolimerizados, geralmente os grupos funcionais são preservados, o que facilita a interação com o material biológico a ser imobilizado sobre os eletrodos modificados com esses filmes poliméricos. Os filmes poliméricos derivados de éteres alquil-arílicos e fenóis têm sido extensamente estudados pelo grupo LAFIP/NANOTEC^{114,115,116,117,118,119,120,121}.

2.2.6 Caracterização eletroquímica do imunossensor para diagnóstico da anaplasmosse bovina

Conforme já abordado no item 2.1, a anaplasmosse bovina é uma doença que ocorre nos seis continentes¹²², em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, causando severos prejuízos na comercialização dos animais infectados, ou até mesmo dos animais sem imunidade, oriundos de zonas livres de carrapato para áreas de zonas enzoóticas¹²³. Em se tratando de uma doença como a anaplasmosse bovina, um diagnóstico em tempo real, com análise rápida e uso de pequenos volumes de amostras biológicas se faz necessário. Para tal, é indispensável o desenvolvimento de um imunossensor que possibilite a detecção do anticorpo no soro do animal infectado ou sensibilizado (vacina) ao interagir especificamente com o antígeno imobilizado no transdutor. Vale ressaltar que esse antígeno (peptídeo) pode ser obtido pela tecnologia *Phage display* (Figura 7, página 14). Esses dispositivos analíticos apresentam tamanho reduzido (miniaturizado), baixo custo e uma elevada sensibilidade.

Os imunossensores eletroquímicos formam um tipo especial de sensor em que a resposta de reconhecimento da interação Ag-Ac é traduzida por meio de uma técnica eletroquímica, tal como voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial, voltametria de onda quadrada ou espectroscopia de impedância eletroquímica.

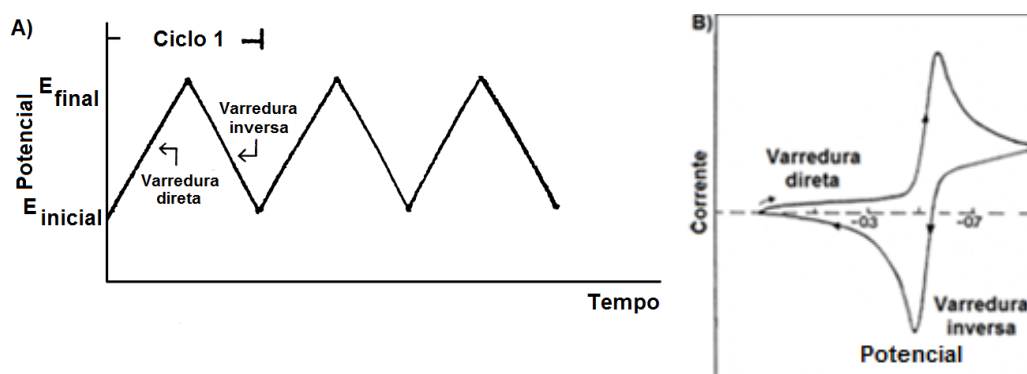
A) Voltametria cíclica

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 potencial¹²⁴. 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 (Figura 18 A).

Obtém-se, como resposta a essa perturbação, por exemplo, um par de picos (catódicos e anódicos), cujos parâmetros eletroquímicos mais importantes são os potenciais de pico catódico e anódico (E_{pc} e E_{pa}), as correntes de pico catódico e anódico (I_{pc} e I_{pa}) e o potencial de meia altura ($E_{p/2}$) ou potencial de meia onda ($E_{1/2}$), essenciais para caracterizar o processo eletródico ocorrido¹²⁵. O voltamograma é a corrente versus o potencial (Figura 18B). Na prática utilizam-se velocidades de varredura que variam desde 10 mV s^{-1} até 10 kVs^{-1} , sendo que a maioria dos trabalhos está entre 20 e 200 mV s^{-1} ¹²⁶.



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



Fonte: Guo et al., 2004.

A voltametria cíclica proporciona uma visão global da interface eletroquímica, sendo, portanto, uma técnica muito usada para estudos eletroquímicos iniciais, cuja principal utilização tem sido para diagnosticar mecanismos de reação, para a identificação de espécies presentes em solução e para a análise semiquantitativa de velocidades de reações¹²⁷.

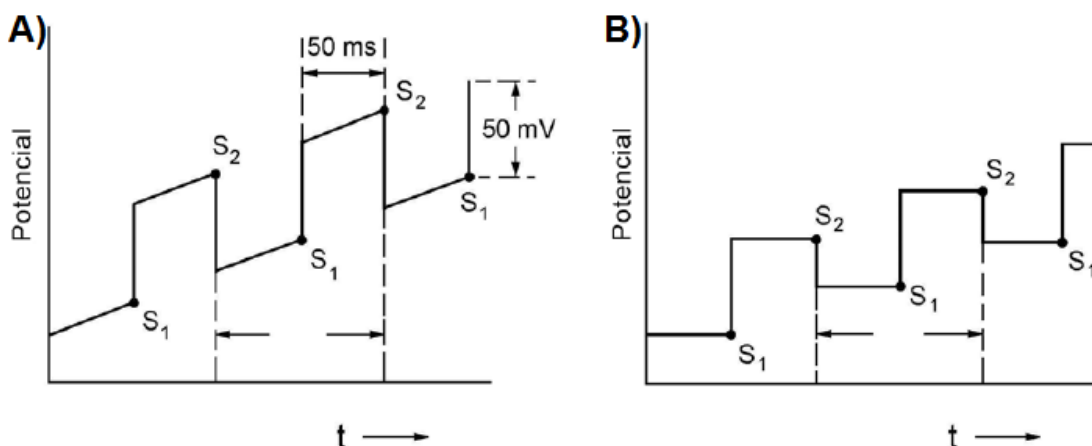
B) Voltametria de pulso diferencial

Esta modalidade de medição voltamétrica foi introduzida por Barker e Jenkin em 1952¹²⁸. Uma melhoria instrumental considerável na discriminação entre a corrente faradaica, originada pela difusão das espécies do seio da

solução até a superfície do eletrodo e a corrente capacitiva, originada na formação da dupla camada elétrica na superfície do eletrodo, viria a ser conquistada com o desenvolvimento das técnicas de pulso. 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.

O objetivo principal foi diminuir o limite de detecção das medidas voltamétricas pelo substancial aumento da discriminação entre a corrente faradaica e capacitiva, atingindo-se limites de detecção da ordem de 10^{-7} a $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.¹²⁹ A Figura 19 mostra o desenvolvimento instrumental que possibilitou a voltametria de pulso diferencial (VPD) a fazer medidas de correntes e aplicações de potencial e pulso de potencial em intervalos de tempo pequenos.

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



Fonte: Aleixo, 2014.

C) Voltametria de onda quadrada

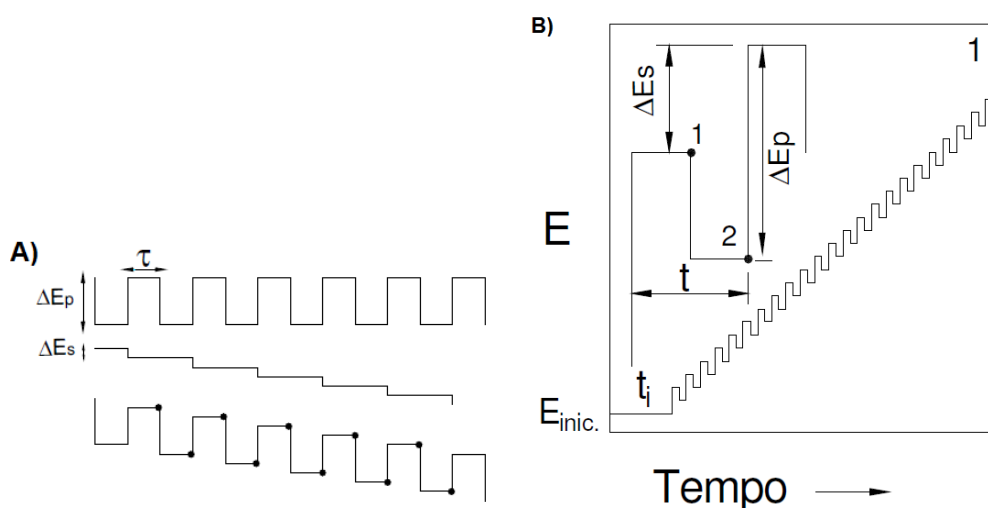
Esta técnica consiste de uma onda quadrada simétrica, superposta por uma base potencial em forma de escada, quando aplicadas no eletrodo de

trabalho. Os resultados das formas de pico dos voltamogramas são simétricos aos potenciais de meia-onda, e os picos de corrente são proporcionais às concentrações, apresentando uma sensibilidade analítica maior do que a voltametria de pulso diferencial, em caso de sistemas totalmente reversíveis alcança-se o dobro do sinal analítico¹³⁰.



A voltametria de pulso diferencial é a técnica mais usada presentemente para fins analíticos, devido às vantagens apresentadas em relação à detecção 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), com sensibilidade semelhante ou um pouco melhor, atingindo-se limites de detecção da ordem de 10^{-8} a 10^{-9} mol L⁻¹. Nessa técnica também ocorrem compensações da corrente capacitiva, uma vez que, as medidas de correntes são realizadas apenas ao final do pulso de potencial, onde a magnitude da corrente já está minimizada¹³¹. A Figura 20 mostra uma programação de potencial usada na voltametria de onda quadrada.

Figura 20: (A) Escada de potencial de largura ΔE_p , altura ΔE_s e período τ e (B) sequência de potencial vs. tempo usada em voltametria de onda quadrada.



Fonte: Plambeck, 1982.

A Figura 20 (A) mostra a aplicação de potenciais de altura ΔE_s , variando de acordo com uma escada de potencial com largura ΔE_p num período 2τ . As

correntes elétricas são medidas no final dos pulsos diretos (1) e reversos (2) e o sinal é dado como uma intensidade da corrente resultante (ΔI) já que é um sinal obtido diferencialmente Figura (20B). A 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 podem-se estudar os mecanismos de oxidação, redução e processos adsorptivos ainda que os mesmos sejam totalmente irreversíveis.

D) Espectroscopia de impedância eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) fornece informações importantes relativas às características eletroquímicas de um sistema, como capacitância da dupla camada (C_{dl}), resistência de transferência de carga (R_{ct}), impedância de difusão (Z_w) e resistência da solução (R_s). Também consiste num método eficiente para avaliar a velocidade de transferência eletrônica no eletrodo de trabalho quando na presença de espécies redox em solução, normalmente, em faixa de frequência entre 1 MHz a 1 mHz. A EIE é uma ferramenta que pode prever a maneira como o revestimento dos eletrodos se comportará com o tempo, em relação a processos corrosivos ou outros processos¹³¹.

Essa técnica 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 (deslocamento de fase) com respeito à onda de perturbação (voltagem) e a razão $V(t)/I(t)$ é definida 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 íons¹³². 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.

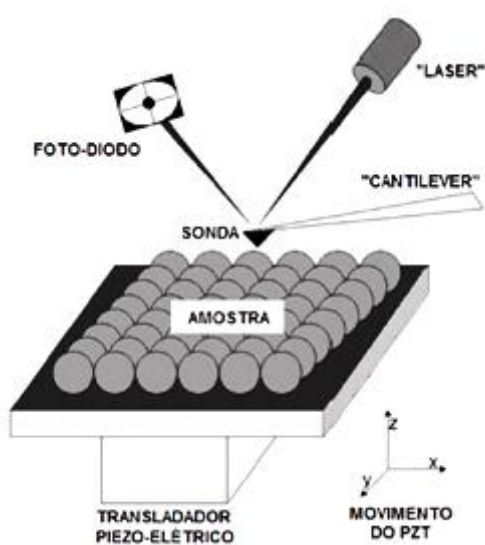
2.2.7 Caracterização morfológica do imunossensor por microscopia de força atômica

A microscopia de força atômica é uma técnica de caracterização de superfície por varredura. Essa técnica utiliza uma sonda de varredura de altíssima resolução vertical, da ordem de frações de um nanômetro. O microscópio de força atômica é uma das ferramentas mais importantes para geração de imagens e manipulação da matéria em escala nanométrica¹³³.

Sabe-se que um microscópio de força atômica possibilita a medição de força de contato mecânico, forças de Van der Waals, forças capilares, força de ligação química, forças eletrostáticas e forças magnéticas. A construção da imagem através do microscópio de força atômica é feita a partir do mapeamento das deflexões do cantilever, uma vez que, o sinal do feixe laser reflete na parte superior do mesmo e este é capturado por uma matriz de fotodiodos. A Figura 21 representa o esquema de um microscópio de força atômica.

As informações são obtidas pela varredura de um cantilever, o qual possui uma sonda em sua extremidade constituída tipicamente de silício ou nitreto de silício. A sonda possui uma ponta de raio de curvatura da ordem de 10 nm. Quando esta é colocada próximo à superfície da amostra, forças entre a ponta e a amostra levam a um desvio do cantilever¹³⁴.

Figura 21: Esquema de um microscópio de força atômica



Fonte: Disponível em: www.nanoscience.com/product. Acessado em: 06 de out. 2014.

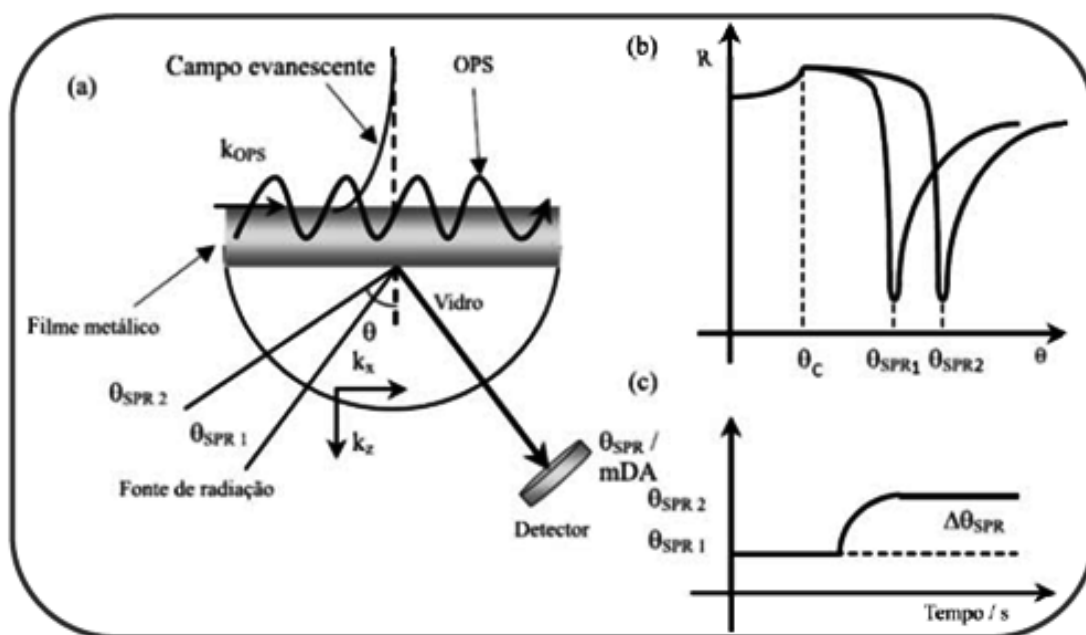
2.2.8 Caracterização do imunossensor por Ressonância de Plásmons de Superfície (SPR)



Kretschmann e Raether (1968) ¹³⁵ observaram que quando um feixe de luz monocromática incide sobre um fino filme metálico em uma configuração de reflexão total atenuada, observa-se diminuição da intensidade de luz refletida. Este fenômeno foi associado à excitação de plásmons na superfície metálica, mostrando um método conveniente para excitação de plásmons em filmes finos. O princípio de construção dos chamados sensores de SPR baseados na configuração de Kretschmann ¹³⁶ envolve um feixe luminoso que atravessa um prisma e alcança uma superfície metálica, geralmente de ouro, de forma a excitar os plásmons de superfície.

Em certos ângulos de incidência, os elétrons livres do metal (eletrodo de ouro) oscilam e absorvem energia da radiação incidente dando origem a um campo eletromagnético evanescente devido à formação de ondas de plásmons de superfície (OPS). A Figura 22 mostra uma representação esquemática da configuração de Kretschmann para SPR ¹³⁶.

Figura 22: (a) Representação esquemática da configuração de Kretschmann para SPR. O dielétrico em contato com o metal possibilita a transferência ressonante de energia da onda incidente para OPS; (b) Curvas de refletância na ausência (θ_{SPR1}) e presença (θ_{SPR2}) de espécies na superfície do filme metálico; (c) Sensograma esquemático representativo da relação entre o θ_{SPR} (dado em mDA-miligrados de ângulo-) e tempo durante a interação de espécies com a superfície do filme metálico¹³⁷.



Fonte: Damos; Mendes; Kubota, 2004.

Essas ondas evanescentes se propagam paralelamente à interface do metal com o meio dielétrico (FIGURA 22(a)). Quando a radiação incidente transfere energia para a OPS ocorre o fenômeno da ressonância entre as mesmas, sendo detectado pela grande atenuação da intensidade de radiação refletida (FIGURA 22(b)). Sob condições de máximo acoplamento entre a radiação incidente e a OPS o ângulo de incidência é denominado ângulo de ressonância de plásmons de superfície (θ_{SPR}) ou ângulo de SPR crítico, condições máximas de ressonância da OPS são acompanhadas por um mínimo da reflexão interna total (FIGURA 22(b))¹³⁸. Dessa forma, alterações nas proximidades da interface metal/ambiente (eletrodo/superfície) promovem

uma alteração nas condições de ressonância do sistema, como resultado, ocorre um deslocamento no θ_{SPR} (FIGURAS 22(a) e 22(b)).



Sabe-se que para a OPS entrar em ressonância com a radiação incidente é necessário que ambas tenham vetores de onda de igual magnitude. Uma vez que se o vetor de propagação da OPS é superior ao da onda incidente, não ocorre excitação da OPS mediante o contato direto destas ondas eletromagnéticas. Portanto, foram desenvolvidos diversos sistemas para elevar o vetor de onda da luz incidente, de forma que a OPS possa receber energia da onda incidente através de uma transferência ressonante de energia. Segundo Homola e Koudela (1999)¹³⁸ a boa sensibilidade e resolução de sensores de SPR usando um prisma como sistema óptico para elevar o momento da onda incidente tem resultado em grande uso dessa configuração.

As propriedades ópticas do sistema, como as constantes dielétricas do metal, do prisma e da matriz, provocam mudanças no ângulo de ressonância, tornando possível aplicar o fenômeno de SPR ao monitoramento de alterações na superfície do sensor, mediante um acompanhamento do ângulo de ressonância com o tempo (FIGURA 22(c)). Assim, mediante o monitoramento do índice de refração nas proximidades da superfície do disco sensor é possível aplicar a técnica de SPR para obter informações em tempo real e sem a necessidade de marcadores biológicos e/ou químicos sobre velocidade e extensão da adsorção, determinação de propriedades dielétricas, cinética de associação e dissociação, bem como constantes de afinidades em interações específicas¹³⁹.

2.3 MODELAGEM MOLECULAR

A modelagem molecular é uma ferramenta de predição do comportamento de sistemas moleculares, por investigação de parâmetros geométricos e eletrônicos. Essa técnica é indispensável para o desenvolvimento de novos materiais, como no estudo da estrutura espacial e das interações de polímeros condutores ao funcionalizar a superfície do transdutor no desenvolvimento de novos biossensores. Na modelagem, emprega-se um conjunto de ferramentas para a construção, edição, visualização, análise e armazenamento de sistemas moleculares associada a

técnicas computacionais, que possibilitam o cálculo de sistemas mais complexos e, também, a representação tridimensional dos sistemas analisados^{140, 141}.



A análise conformacional é o estudo dos diferentes arranjos espaciais em busca de uma conformação mais estável, a que determina o comportamento estereoeletrônico de uma molécula. Ela pode ser realizada por diferentes estratégias, como: busca sistemática; busca randômica; simulação por dinâmica molecular ou Monte Carlo; construção da conformação molecular a partir de fragmentos moleculares, com estruturas tridimensionais previamente conhecidas ou sobreposição molecular¹⁴².

Para determinada estratégia de modelagem utiliza-se a química computacional que engloba a mecânica molecular e a mecânica quântica¹⁴².

2.3.1 Mecânica Molecular

Métodos de mecânica molecular (MM), também conhecidos como métodos de campo de força, calculam a energia do sistema em função das posições nucleares. Considerando a aproximação de Born-Oppenheimer, em que os movimentos dos núcleos e dos elétrons podem ser tratados separadamente. Na MM, a energia da molécula é descrita pela superfície de energia potencial em termos das posições nucleares. O cálculo da superfície de energia potencial, em função de coordenadas geométricas, usando um determinado campo de força¹⁴³.

Os campos de força possibilitam calcular a energia relacionada com determinada conformação de uma molécula, e para isso se baseiam em parâmetros referentes a interações ligantes, como comprimento e ângulo de ligações, ângulos de torção (diedros), interações não-ligantes, como eletrostáticas e de van der Waals. Um campo de força adequado a uma investigação em particular deve ser cuidadosamente selecionado¹⁴⁴. Os cálculos utilizam uma série de equações derivadas empiricamente para a superfície de energia potencial, cujo formalismo matemático está baseado num modelo de mecânica clássica de estrutura molecular¹⁴⁵.

Atualmente, os computadores de alta velocidade e as linguagens especiais de programação tornaram a simulação uma poderosa técnica para

obter soluções aproximadas de muitos problemas complexos, ou analiticamente insolúveis. No método de Monte Carlo os dados são formulados a partir de um gerador de números aleatórios e das distribuições de freqüências de interesse, as quais caracterizam os processos estocásticos considerados pelo modelo de simulação utilizado. Esta simulação é um processo que projeta o comportamento de um sistema real e conduz experimentos de amostragem, com o propósito de entender o comportamento do sistema em estudo¹⁴⁶.

A execução do método de Monte Carlo envolve, basicamente, três passos: Estabelecimento das populações de interesse, a obtenção de amostras aleatórias dessas populações para calcular as estatísticas de interesse e a criação da distribuição de freqüência da estatística de interesse. Em se tratando de sistemas mais complexos uma das principais aplicações do Método de Monte Carlo é através das Cadeias de Markov e suas duas principais ferramentas: o algoritmo de Metropolis-Hastings e o Amostrador de Gibbs, técnicas de simulação interativa¹⁴⁷.

O algoritmo de Metropolis-Hastings permite gerar uma amostra da distribuição conjunta a partir das distribuições condicionais completas, que podem possuir forma fechada ou não fechada¹⁴⁸.

O amostrador de Gibbs é um caso especial do Metropolis-Hastings em que o valor aleatório é sempre aceito. Nesse caso é indispensável especificar como construir uma cadeia de Markov em que valores convergem para a distribuição de interesse. A chave para o amostrador de Gibbs é se considerar a distribuição condicional univariada, quando todas as variáveis aleatórias são mais fáceis de simular do que distribuições conjuntas complexas¹⁴⁹.

2.3.2 Mecânica quântica

Os métodos de mecânica quântica descrevem as moléculas em termos de interações entre o núcleo e os elétrons, e o ponto de partida para o estudo desses métodos é a equação de Schrödinger¹⁵⁰. Em um sistema multieletrônico e multinuclear, o número de termos aumenta e a função de onda fica com mais variáveis, com isso, a dificuldade de se resolver a equação cresce exponencialmente.

Há métodos quânticos como, os ab initio, semi-empíricos, Teoria do Funcional da Densidade (DFT) que fornecem parâmetros quânticos e possuem várias aplicações em química computacional. Com esses métodos é possível definir um grande número de propriedades atômicas e moleculares, caracterizando propriedades relacionadas à reatividade, forma e modo de ligação de fragmentos e substituintes moleculares. Através desses métodos, uma série de descritores moleculares é obtida, possibilitando a identificação de muitas propriedades geométricas e eletrônicas das moléculas e suas interações relacionadas à estrutura eletrônica (interações π , espectroscopia de infravermelho, mapa do potencial eletrostático, ordem de ligação, energia dos orbitais de fronteira, além de outras) ¹⁵¹.



3 JUSTIFICATIVA



A detecção de doenças tais como a anaplasnose, nos estágios iniciais, é de extrema importância, visto que as plataformas diagnósticas existentes não apresentam especificidade e sensibilidade elevadas, podendo haver reações cruzadas com outros tipos de doenças e respostas positivas em animais sensibilizados. Além disso, os testes são realizados em laboratório, com a necessidade de profissionais especializados e instrumentação de alto custo. Dentro deste contexto, há a necessidade de um método que seja rápido, seletivo, específico, sensível e de fácil manuseio, características essas encontradas nos biossensores.

4 OBJETIVOS



4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desse estudo foi desenvolver uma plataforma funcionalizada com o poli (ácido 3-hidroxibenzóico), para a detecção de bases nitrogenadas, oligonucleotídeos e anticorpos contra a proteína de superfície (Am1) da *A. marginale*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar os eletrodos modificados com o filme polimérico.
- ✓ Verificar a ocorrência de interação entre os eletrodos modificados com os oligonucleotídeos e com as bases nitrogenadas (púricas e pirimídicas).
- ✓ Identificar a estrutura mais estável do bisdecâmero derivado do 3-HBA a partir de modelagem molecular.
- ✓ Caracterizar a estrutura tridimensional das proteínas Am1 e Am2.
- ✓ Identificar as interações do poli (3-HBA) com a proteína principal de superfície (MSP1) da *A. marginale* a partir da modelagem molecular.
- ✓ Verificar a interação do elemento de reconhecimento biológico (Am1) com a superfície sensora.
- ✓ Analisar a distribuição parcial de carga da 4-AAP e do cr (4-AAP) e a densidade de spin do cr (4-AAP).
- ✓ Detectar os alvos complementares às biomoléculas imobilizadas sobre a superfície dos eletrodos de grafite.
- ✓ Caracterizar o biossensor produzido, antes e após a interação com alvos complementares e não complementares, utilizando técnicas eletroquímicas e de análise morfológica de superfície.
- ✓ Analisar o desempenho do biossensor (sensibilidade, estabilidade, e seletividade) frente aos analitos alvo.

5.1 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 preparo para cada solução utilizada no presente trabalho é descrito abaixo:

- ❖ **Solução de Ácido Perclórico ($0,50\text{ mol L}^{-1}$):** Em um balão volumétrico de 1,0 L adicionou-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 0,16460 g de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Reagen, 99%) ; 0,21120 g de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Vetec, 99%) e 0,74560 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 0,74560 g de KCl (Vetec, 99%) e completou-se o volume total com água deionizada.

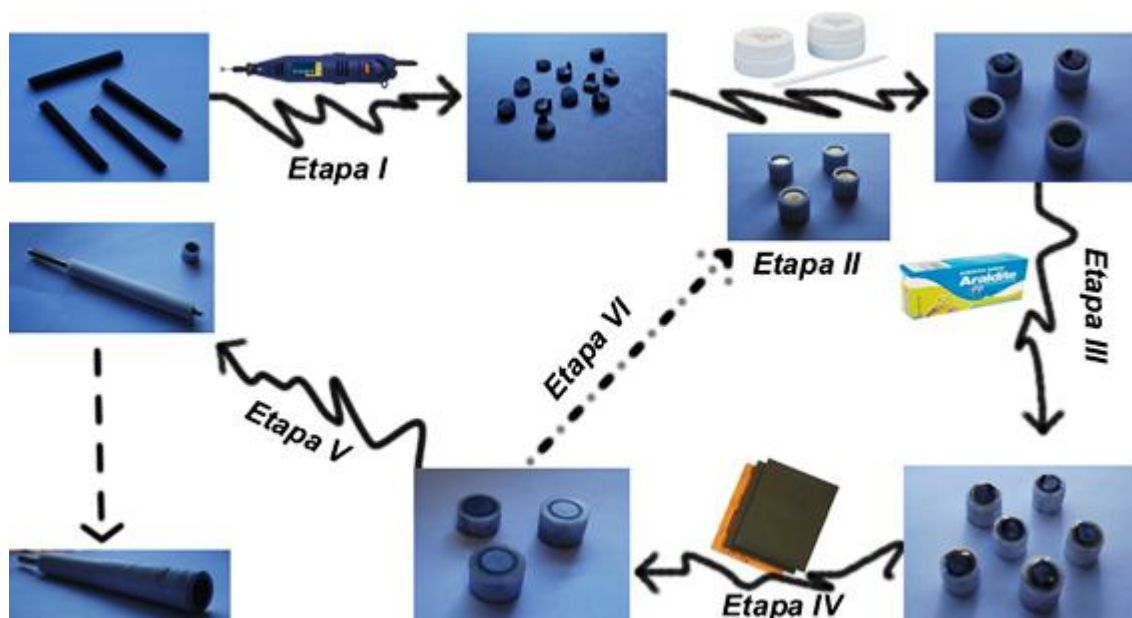
- ❖ **Solução de 3-HBA (2,50 mmol L⁻¹):** Em um balão volumétrico de 100 mL adicionou-se 0,03450 g do monômero (Acros Organics, 99%) e completou-se o volume total com solução aquosa de HClO₄ 0,50 mol L⁻¹.
- ❖ **Solução de hidróxido de sódio (0,10 mol L⁻¹):** Em um balão volumétrico de 100 mL adicionou-se 0,40000 g de NaOH (Vetec, 99%) e completou-se o volume total com água deionizada.
- ❖ **Solução Tampão Acetato (0,1 mol L⁻¹; pH 4,3):** Em um balão volumétrico de 500 mL adicionou-se 1,49800 g de CH₃COONa (Dinâmica, 99%) e 1,82 mL de ácido acético glacial (CH₃COOH) (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 mol L⁻¹.
- ❖ **Solução Tampão Fosfato Salino (PBS) (0,10 mol L⁻¹ pH 7,3):** Em um balão volumétrico de 500 mL adicionou-se 0,72000 g de fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄) (Synth, 99%), 0,12000 g de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), 4,00000 g de NaCl e 0,10000 g de KCl e completou-se o volume total com água deionizada ajustando o pH para o valor de 7,3 com solução de NaOH 0,10 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 0,44150 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 mol L⁻¹.
- ❖ **Solução Tampão Fosfato (0,10 mol L⁻¹; pH 7,3):** Em um balão volumétrico de 500 mL adicionou-se 4,35000 g de Na₂HPO₄ (Vetec, 99%) e 2,32000 g de NaH₂PO₄ (Vetec, 99%) e completou-se o volume total com água deionizada ajustando o pH da solução para 7,3 com solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹.

- ❖ **Solução de bases nitrogenadas:** Guanina e Adenina 10 mmol L⁻¹; Citosina e Timina 10 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 de peptídeo Am1:** as amostras de peptídeos foram preparadas a partir de diluições da solução estoque (9 µg µL⁻¹) fornecidas pelo INGEB-UFU. A partir da solução estoque efetuou-se a diluição em tampão acetato pH 4,3 para que em 18 µL da amostra contivesse 1 µg de peptídeo (0,055 µg µL⁻¹).
- ❖ **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 (IgG⁻) foram diluídas a partir das soluções estoques fornecidas pelo INGEB-UFU em várias proporções v/v (1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1000) em tampão PBS pH 7,3. As legendas das Figuras apresentadas nos resultados e discussão desse trabalho contêm a proporção da diluição realizada no experimento.
- ❖ **Soluções dos interferentes: *Bigemina bovis*, *Bigemina marginale* e *Brucelose*:** as amostras de soros sanguíneos de animais contaminados com essas doenças contendo os anticorpos específicos para cada uma delas foram diluídas a partir das soluções estoques fornecidas pelo INGEB-UFU na proporção 1:50 v/v em tampão PBS pH 7,3.
- ❖ **Solução de 4-aminoantipirina (4-AAP) a 10 mmol L⁻¹** Em um eppendorf de 1 mL adicionou-se 0,00203 g de 4-AAP (Synth, 99%) e completou-se o volume final do eppendorf com água deionizada.

5.2.1 Preparação e construção dos eletrodos de grafite

Os eletrodos de grafite (EG) foram preparados conforme fluxograma apresentado na Figura 23, a partir de barras de grafite (100 x 0,6 mm) obtidas da Alfa Aesar (99,9999%)¹⁵². Na etapa I as barras foram cortadas em tamanhos menores, gerando discos de grafite com espessura entre 1 a 2 mm.

Figura 23: Fluxograma de preparação dos eletrodos de grafite.



Fonte: Ferreira, 2009.

A etapa II mostra o grafite sendo unido a uma base de latão, revestida de teflon, por cola condutora (cola de prata, 90% de prata e 10% de araldite). 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 isso, o EG foi limpo em água com ultrassom por 10

minutos e enxaguado com água destilada em abundância e seco com N₂ 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.

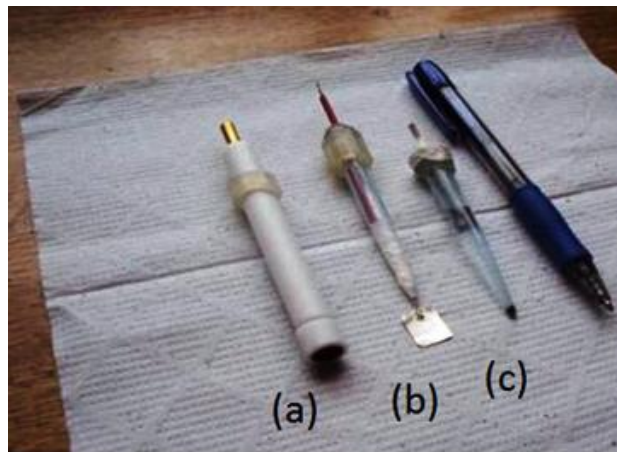


5.2.2 Seleção dos eletrodos de grafite

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 HClO₄ (aq), divididos em duas 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 N₂ e analisados agora em solução de K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆, cobrindo a faixa de potencial de – 0,20 a + 0,70 V. Os voltamogramas cíclicos foram registrados para posterior análise e seleção. Os potenciostatos utilizados foram CH Instruments modelo 760C, e Ecochemie modelo 302N com módulo FRA2.

O eletrodo de trabalho conectado a base (Figura 24 (a)), eletrodo auxiliar placa de platina (área geométrica 2,0 cm²) (Figura 24 (b)) e o eletrodo de referência de Ag/AgCl, KCl (3,00 mol L⁻¹) (Figura 24 (c)) utilizados em todas as análises realizadas neste trabalho estão ao lado de uma caneta esferográfica, ideia de dimensão (Figura 24).

Figura 24: Eletrodo de grafite conectado à base (a), eletrodo auxiliar de platina (b) e eletrodo de referência Ag/AgCl (c), comparados a uma caneta esferográfica.



Fonte: Autor, 2015.

5.2.3 Eletropolimerização do ácido 3-hidroxibenzóico

Para a eletropolimerização do monômero (3-HBA) foi utilizada uma célula eletroquímica de três compartimentos, com volume total de trabalho de 25 mL. O eletrodo de trabalho utilizado foi um disco de grafite (Figura 24 a), com área geométrica de $29,7 \text{ mm}^2$.

O crescimento dos filmes poliméricos foi realizado através de voltametria cíclica. Foram realizados 10 ciclos de potencial com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , na janela de potencial de 0,00 a + 1,20 V em solução aquosa de ácido perclórico contendo 3-HBA a $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Após a eletropolimerização, os eletrodos contendo os filmes poliméricos foram lavados com água deionizada, em abundância, e secos sob fluxo de N_2 . Posteriormente, esses eletrodos foram mergulhados em solução contendo somente $\text{HClO}_4 \text{ (aq)}$, na ausência do monômero, e 5 ciclos de potencial foram aplicados na mesma janela de potencial da 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 .

5.2.4 Transporte iônico nos estudos de reversibilidade

Os eletrodos de grafite modificados com o poli (ácido 3-hidroxibenzóico) foram caracterizados por voltametria cíclica em função da velocidade de varredura cobrindo o intervalo de 10 a 100 mV s⁻¹. Neste procedimento os voltamogramas cíclicos foram obtidos em solução aquosa HClO₄ (aq), na ausência do monômero (3-HBA). Os processos eletroquímicos das transições redoxes do poli (3-HBA) foram caracterizados por 6 diagnósticos, sendo eles: 1) Velocidade de varredura (v) em função da variação de potencial de pico anódico e catódico (ΔE_p); 2) v em função da variação de potencial de pico e meia onda ($E_p - E_p/2$); 3) v 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 ($v^{1/2}$); 5) E_p em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) e 6) I_p em função da raiz quadrada do tempo ($t^{1/2}$).

5.2.5 Determinação da massa do polímero

Três eletrodos de grafite (análise em triplicata) após os procedimentos de condicionamentos (Figura 23) foram lavados em água deionizada e secos em dessecador sob vácuo, até obter uma massa constante (m_1).

Na sequência os três eletrodos de grafite foram submetidos ao procedimento de eletropolimerização (descrito no item 5.2.3). Posteriormente, esses eletrodos foram mergulhados em solução contendo somente HClO₄ (aq), na ausência do monômero, sendo submetidos a 5 ciclos de potencial na mesma janela de potencial da 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 do polímero (m) foi determinada pela diferença entre as massas ($m = m_2 - m_1$).

Todas as massas foram mensuradas em balança analítica Shimadzu série AUW220D, precisão 0,00001 g, $d=0,1$ mg / 0,01 mg.

5.2.6 Extração do poli (3-HBA) para análise espectroscópica no infravermelho



O procedimento para eletrogeração do poli (3-HBA) em quantidade suficiente para que se pudesse realizar análises químicas foi análogo ao descrito no item 5.2.3. Contudo, neste procedimento, a eletropolimerização foi conduzida utilizando eletrodos de cilindro de grafite (30 x 0,6 mm), com área geométrica de aproximadamente 6,21 cm². Eletrodos cilíndricos de grafite e Ag/AgCl, KCl (3,00 mol L⁻¹) foram utilizados como trabalho e referência, respectivamente. Um espiral de aço inox foi utilizado como eletrodo auxiliar nesse experimento. Após eletropolimerização os eletrodos de grafite foram lavados em água deionizada e secos em fluxo de N₂ ultra puro. Após esse procedimento os eletrodos de trabalho foram imersos em acetonitrila (Vetec, UV/HPLC Espectroscópico 99,8 %) e levados a ultrassom por cerca de 1 hora. Após esse período essa solução foi tratada com sulfato de sódio anidro (Vetec, 99,0%) para remoção de água. A solução foi filtrada em algodão e a extração do poli (3-HBA) foi conduzida a partir da solução resultante por rotoevaporação do solvente a vácuo e temperatura controlada de 35 °C. O material sólido coletado foi então utilizado para as análises no infravermelho. O material foi mantido protegido da luz e umidade em dessecador a vácuo durante o período de utilização para as análises. Os espectros de infravermelho foram obtidos para o polímero em pastilhas de KBr, em faixa de número de onda de 500 a 4500 cm⁻¹, utilizando-se 20 ciclos e resolução de 4 cm⁻¹. O equipamento utilizado foi o IR Prestige-21 da Shimadzu.

5.2.7 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 (3-HBA), assim como nas detecções da *Anaplasma marginale* foram obtidos em solução aquosa de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] 5 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹, em potenciostato Autolab (PGSTAT302N e módulo NOVA (1.10), Eco Chemie, Utrecht). A solução de análise foi deaerada com N₂ ultra puro por cerca de 40 minutos. Os

eletrodos modificados contendo ou não as biomoléculas imobilizadas, permaneceram em contato com a solução eletrolítica por cerca de 30 minutos, antes de sua utilização, evitando a entrada de ar nos poros do EG. O intervalo de frequência investigado foi de 10 kHz a 10 mHz. A amplitude de excitação senoidal de potencial foi de 5 mV (escolhida em função da faixa de linearidade). As respostas em frequência foram medidas sob condições potencioestáticas em potenciais d.c de equilíbrio. Vale ressaltar que para cada uma das medidas realizadas, os potenciais foram obtidos por voltametria cíclica a 50 mV s^{-1} em solução aquosa de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5 mmol L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Todos esses parâmetros descritos foram previamente otimizados. O ajuste dos resultados experimentais a um circuito equivalente apropriado foi realizado com software NOVA (1.10), interface do Autolab.

Os voltamogramas de voltametria de pulso diferencial e de voltametria de onda quadrada foram obtidos num potencioestado Autolab Electrochemical System (PGSTAT302N e módulo GPES, Eco Chemie, Utrecht), utilizando célula eletroquímica de três compartimentos. Os parâmetros e os eletrólitos suportes usados nestas técnicas, estão explicitados nas legendas respectivas de cada espectro ou voltamograma discutido nos resultados e discussão deste trabalho.

5.2.8 Medidas de estabilidade eletroquímica

As análises de estabilidade eletroquímica os eletrodos de grafite modificados com poli (3-HBA) foram realizadas em solução aquosa de ácido perclórico por meio de sucessivos ciclos de potencial na região de atividade eletroquímica do filme obtido, ou seja, + 0,0 a + 1,2 V. Foram realizados 100 ciclos na mesma velocidade de varredura da eletropolimerização 50 mV. s^{-1} .

5.2.9 Microscopia de força atômica

As Morfologias para o eletrodo de grafite e os eletrodos de grafite modificados com poli (3-HBA), assim como o eletrodo de grafite após imobilização do antígeno (Am1), soro positivo (IgG+) e soro negativo (IgG-) foram investigadas 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”. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas.

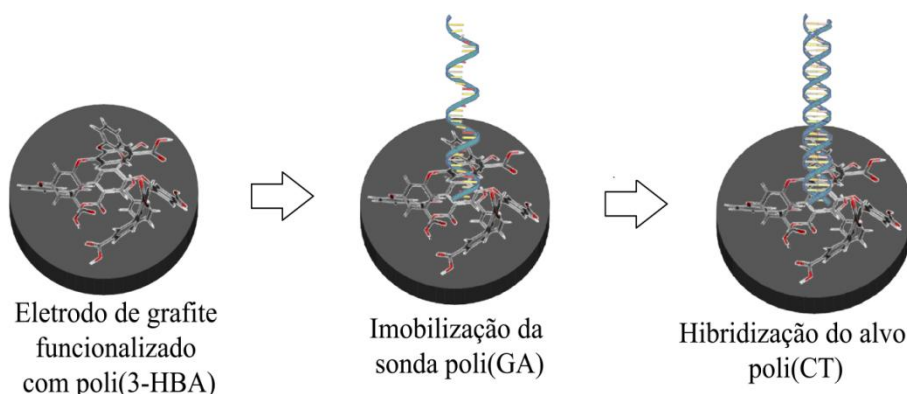


5.2.10 Estudos de imobilização das bases nitrogenadas e de oligonucleotídeos em EG/poli (3-HBA)

A respeito dos experimentos com as bases nitrogenadas púricas e pirimídicas, foram gotejados 18 μ L nos eletrodos de grafite modificados com poli (3-HBA) contendo guanina, G, (10 mmol L⁻¹), adenina, A, (10 mmol L⁻¹), timina, T, (10 mmol L⁻¹) e citosina, C, (10 mmol L⁻¹). Eletrólito: tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,3. As detecções foram realizadas utilizando a técnica de pulso diferencial com os seguintes parâmetros: $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$; amplitude = 25 mV, duração do pulso = 60 ms.

Em relação aos experimentos envolvendo os oligonucleotídeos, destaca-se que sobre os eletrodos de grafite modificados com poli (3-HBA) foram gotejados 18 μ L de solução aquosa de poli (GA) (6,3 μ mol L⁻¹) deixando os eletrodos para imobilização a 37°C em estufa por 15 minutos. Na sequência, foi realizada a lavagem dos eletrodos com tampão acetato, pH 4,3, para remover o excesso de poli GA. Após essa etapa, foram adicionados 18 μ L da solução aquosa do alvo complementar poli (CT) nas concentrações de 5,86 μ mol L⁻¹, 29 μ mol L⁻¹, 58,1 μ mol L⁻¹, deixando os eletrodos modificados secar na temperatura de 37 °C em estufa por 15 minutos (hibridização). Na sequência, foi realizada a lavagem dos eletrodos com tampão acetato, pH 4,3, para remover o excesso de poli CT. A Figura 25 mostra uma sinopse desses procedimentos descritos para os oligonucleotídeos.

Figura 25: Apresenta um esquema da imobilização da sonda poli (GA) no EG/poli (3-HBA) e a hibridização com o alvo poli (CT).



Fonte: Autor, 2015.

Após a lavagem dos eletrodos modificados a imobilização das bases nitrogenadas foi observada através dos sinais de VPD realizadas em célula de três compartimentos em tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,3) como solução eletrolítica.

5.2.11 Procedimento de construção do sistema polimérico para desenvolvimento do imunossensor para diagnóstico da anaplasmosse bovina

Os eletrodos de grafite modificados com poli (3-HBA) conforme descrito no item 5.2.3 foram pré-condicionados através de cronoamperometria (- 0,2 V por 120 s). Em seguida, esses eletrodos foram lavados, em jato suave, com água deionizada para remover o excesso de ácido perclórico da superfície do eletrodo funcionalizado. Na sequência, foi feita a linha base por voltametria de pulso diferencial, $v=10 \text{ mV s}^{-1}$, dos eletrodos funcionalizados em solução de tampão fosfato pH 7,4, em janela de potencial de 0,0 a 1,2 V. Essa janela de potencial foi escolhida em função de conter a faixa eletroativa de potencial do poli (3-HBA) e do intercalador, 4-AAP, utilizado na detecção indireta do imunossensor desenvolvido para diagnóstico da anaplasmosse bovina. Vale ressaltar que neste trabalho todas as detecções foram feitas em triplicata.

Após esta etapa foram adicionados por gotejamento em cada eletrodo funcionalizado 18 μL de Am1, 1 μg do peptídeo ($0,055 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$), diluído em tampão acetato $\text{pH} = 4,3$, colocado em estufa a 37°C por 15 minutos. Nesse valor de pH o peptídeo apresenta carga residual positiva ($\text{PI}=5,8$), com isso, a imobilização do peptídeo no poli (3-HBA) é facilitada, pois, como os eletrodos após eletropolimerização foram pré-condicionados por cronoamperometria ($-0,2 \text{ V}$ por 120 s), esse aumento na densidade eletrônica do filme favorece a sua interação com o peptídeo (positivo em $\text{pH } 4,3$).

Vale ressaltar que a Am1 empregada no presente trabalho consiste em uma sequência STSSQLGGGSSTSSQLGGGSSTSSQL que foi desenhada e sintetizada quimicamente por GenScript EUA Inc acoplado a albumina de soro bovino (BSA) para aumentar a imunogenicidade. Esse peptídeo (Am1) foi construído com 26 resíduos de aminoácidos (aa) contendo repetições da sequência motivo MSP1a (sublinhado) separados por um espaçador de 4 aa, GGGG.

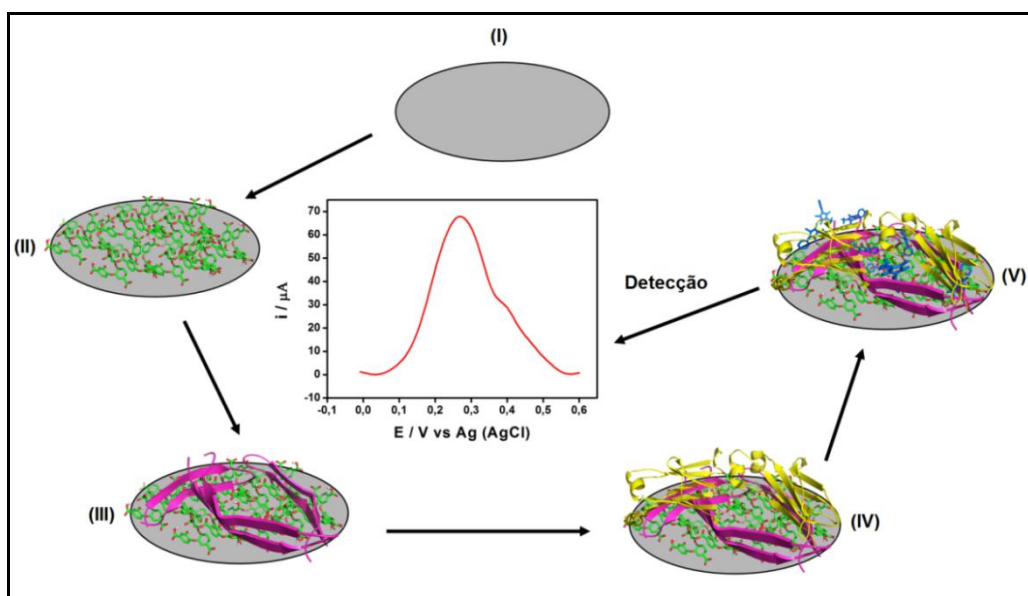
Na sequência, uma lavagem em tampão fosfato, $\text{pH } 7,3$, foi realizada para remoção dos peptídeos que não interagiram com os eletrodos funcionalizados. Após essa etapa, foram adicionados por gotejamento 18 μL do soro positivo (IgG+) previamente diluído em tampão fosfato em cada um dos três eletrodos (triplicata), e 18 μL do soro negativo (IgG-), previamente diluído, em cada um dos outros três eletrodos (triplicata). Esses eletrodos foram colocados em estufa a 37°C por 25 minutos. Após esse tempo foi realizada uma lavagem em tampão fosfato para remoção do soro que não interagiu com a Am1. Os soros sanguíneos de animais saudáveis (IgG-) e contaminados com *A. marginale* (IgG+) foram cedidos pelo Centro de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Eldorado do Sul, RS. Vale ressaltar que no presente trabalho o soro positivo de animais infectados com a *A. marginale* foi diluído em tampão fosfato (1:1000, 1:800, 1:400, 1:200, 1:100, 1:50, 1:25). As diluições empregadas em cada experimento estão explicitadas nas legendas respectivas de cada Figura apresentadas nos resultados e discussão deste trabalho.

Na próxima etapa, adicionam-se, por gotejamento, 18 μL do intercalador 4-aminoantipirina (4-AAP) a 10 mmol L^{-1} , colocando em estufa a 37°C por 15 minutos (secagem completa). Após esse período, foi realizada uma lavagem em tampão fosfato para remoção da 4-AAP em excesso. Na sequência, foram

realizadas as detecções por voltametria de pulso diferencial, espectroscopia de impedância eletroquímica e ressonância de plásmons de superfície. Os parâmetros e os eletrólitos suportes usados nestas técnicas, estão explicitados nas legendas respectivas de cada espectro ou voltamograma discutido nos resultados e discussão deste trabalho.

Vale ressaltar também que em todas as detecções (Ag-Ac) foi subtraído o sinal de corrente da linha base, EG/ poli (3-HBA) em tampão fosfato. A Figura 26 mostra uma sinopse desse procedimento experimental empregado no desenvolvimento do imunossensor para diagnóstico da anaplasmosse bovina.

Figura 26: Etapas do procedimento experimental do desenvolvimento do imunossensor para diagnóstico da anaplasmosse bovina, em que: (I) eletrodo de grafite; (II) eletrodo de grafite funcionalizado com o poli(3-HBA); (III) imobilização da proteína de membrana Am1 no eletrodo funcionalizado; (IV) interação da Am1 com o seu anticorpo específico (amostras de soro de bovinos contaminados com a *A. marginale*); (V) detecção do sinal de corrente da 4-AAP após intercalar com as proteínas do complexo antígeno-anticorpo (Am1 + soro positivo).



Fonte: Autor, 2015.

5.2.12 Procedimento de detecção por Ressonância de Plásmons de Superfície (SPR)



As medidas ópticas do ângulo de SPR foram obtidas para analisar as interações biomoleculares usando um Autolab Springle (Eco Chemie), no qual a parte óptica do sistema é composta de um prisma e de um disco de vidro recoberto com um fino filme de ouro adquiridos da Metrohm-Autolab. O equipamento contém uma célula com capacidade de 300 μ L. Como fonte de radiação foi empregado um laser de He-Ne (com emissão em 670 nm) e a intensidade da luz refletida foi medida através de um detector de fotodiodo. A configuração utilizada é baseada na reflexão interna total atenuada (configuração de Kretschmann) que é a mais usada em espectroscopia de SPR. A vazão e a temperatura foram mantidas a 48 μ L/min. e $37 \pm 1^\circ\text{C}$, respectivamente, durante todas as medidas. Os parâmetros e os eletrólitos suportes usados nesta técnica, estão explicitados nas legendas respectivas de cada Figura apresentadas nos resultados e discussão deste trabalho.

5.2.13 Metodologia empregada na modelagem molecular

A modelagem molecular foi realizada a partir de métodos semi-empíricos, DFT e mecânica molecular.

5.2.13.1 Caracterização do polímero obtido por espectroscopia UV-vis e espectroscopia de infravermelho

Os confôrmeros com o mínimo de energia global do dec (3-HBA) foram submetidos a cálculos quânticos utilizando-se o modelo semi-empírico RM1¹⁵³ com vistas à uma pré-otimização da estrutura para o cálculo de frequência de vibração. Estas estruturas foram reotimizadas e os espectros de infravermelho foram simulados, utilizando o funcional híbrido B3LYP com as funções de bases atômicas 6-31G (d) e 6-31G (d, p). O espectro de infravermelho (IR) também foi simulado, para fins de comparação, segundo os modelos semi-empírico RM1 e PM6, com base no MOPAC 2009. Em ambos os casos os

modos de vibração mais intensos foram comparados com os espectros de infravermelho experimentais do poli (3-HBA).



O espectro de absorção da estrutura eletrônica otimizada do dec (3 – HBA), considerando a presença da acetonitrila, implicitamente, como solvente e usando a abordagem do Formalismo da Equação Integral do Modelo Contínuo Polarizado (FEIMCP)¹⁵⁴ foi simulado usando M06 (6-311++G(2d, 2p) e 6-311G (d, p)), considerando-se as 60 menores excitações singlete-singlete, tomando o primeiro estado excitado (root=1) como referência.

O traçado de contorno do espectro foi construído encaixando (fitando) o pico de meia largura e meia altura do UV-vis em 4400 cm⁻¹. As representações dos espectros eletrônicos singlete-singlete e dos espectros DOS e os orbitais moleculares foram feitos usando o software Gaussian¹⁵⁵.

5.2.13.2 Modelagem molecular do polímero

Após a elucidação da estrutura mais provável para o poli (3-HBA) modelos com um ou dois decâmeros, polimerizados a partir do ataque de um cátion radical fenólico sobre o carbono 4 do anel, foram desenhados com a interface gráfica do Maestro e submetidos a análises conformacionais usando o método estocástico de múltiplos mínimos de Monte Carlo¹⁵⁶. Todos os ângulos de torção livres foram utilizados como variáveis em 50000 passos de busca com o campo de força OPLS¹⁵⁷, devidamente parametrizado no programa Macromodel da Schrodinger¹⁵⁸. As estruturas de mínima energia obtidas foram exportadas para a otimização da estrutura com cálculos DFT, utilizando-se o Funcional M06¹⁵⁹ e funções de base 6-31G(d), convenientes para reproduzir interações pi, esperadas para estes oligômeros¹⁶⁰. O espectro de infravermelho obtido para o decâmero certificou que a estrutura realmente corresponde ao mínimo de energia, devido à ausência de frequências negativas, na sequência, foi comparado com o resultado experimental equivalente, como forma de validar o modelo estrutural obtido.

5.2.13.3 Modelagem molecular da proteína de membrana Am1

Após buscas frustradas de modelagem comparativa, a estrutura tridimensional da proteína foi elucidada por modelagem baseada em modelo *web server RaptorX*¹⁶¹. Esse é um servidor de predição de estruturas de proteínas, empregado para prever estruturas tridimensionais para sequências de proteínas sem homólogos no "*Protein Data Bank*" (PDB). Com isso, a partir de uma sequência de entrada, RaptorX prevê as estruturas secundárias e terciárias das proteínas, além das interações com solvente e sítios de ligação.

As cadeias laterais de proteínas pequenas (polipeptídeos) e a minimização de energia da cadeia principal foram realizadas utilizando o campo de força FoldX da versão 3,0b6¹⁶². A estabilidade da estrutura protéica foi analisada por 10000 passos da dinâmica de Monte Carlo, utilizando o campo de força OPLS¹⁶³. Durante a simulação, a estrutura da proteína Am1 permaneceu na conformação inicialmente otimizada com um pequeno desvio quadrático médio (RMSD= 3,3 Å).

5.2.13.4 Modelagem molecular da 4-AAP e suas interações com a proteína de membrana Am1

As estruturas da 4-AAP neutra e parcialmente protonada foram desenhadas e submetidas a cálculos DFT utilizando-se o funcional B3LYP¹⁶⁴ com o conjunto de funções de base gaussianas, 6-311G (2d,p). Cálculos irrestritos equivalentes (UB3LYP/6-311G (2d,p) foram efetuados com os respectivos cátions radicais (espécies oxidadas), alterando-se carga e multiplicidade de spin. Foram observadas as variações de energia, de ordens de ligação, de cargas parciais e densidades de spin dos radicais otimizados.

As interações intermoleculares entre a 4-AAP e o antígeno Am1 foram previstas a partir da técnica de atracamento molecular,¹⁶⁵ geralmente utilizada para prever as interações de fármacos em sítios ativos, com mecânica molecular.¹⁶⁶ Em nosso procedimento, uma caixa tridimensional envolvendo toda a proteína foi considerada para o espaço de busca pelas interações mais favoráveis com o ligante. Foi empregado o método de grid com tamanho de

0,375 Å, onde em cada ponto do grid é calculado a interação da proteína. Com os mapas de interação, realizou-se 100 simulações de atracamento molecular empregando o método de Algoritmo Genético Lamarckiano¹⁶⁷ onde a população de cada simulação era formada por 200 complexos. O algoritmo genético introduz variações aleatórias em cada uma das 100 conformações do complexo proteína-ligante (mutações nos seres vivos) e associa a cada conformação a sua energia de complexação (fitness ou adaptação). A probabilidade da conformação se reproduzir e estar presente na próxima geração é proporcional à sua energia de complexação. Um procedimento de minimização de energia de cada conformação foi realizado entre cada geração, correspondendo à parte lamarckiana do processo. As conformações finais foram agrupadas pelo método de clustering, onde o RMSD entre as conformações do mesmo cluster foram de 2 Å.

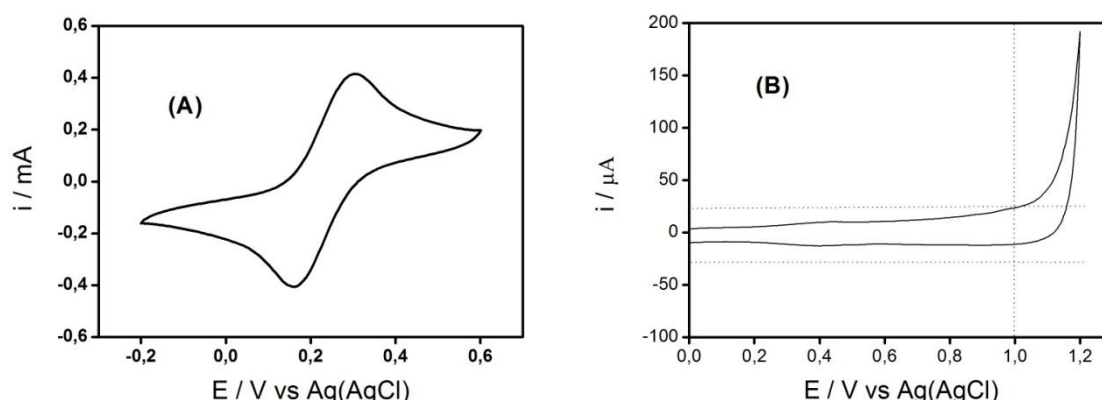
Inicialmente, serão apresentados os resultados experimentais sobre a eletropolimerização do 3-HBA e as principais propriedades eletroquímicas do filme eletrogerado [poli (3-HBA)]. Com base nesses resultados experimentais, foram propostos os estudos teóricos do 3-HBA e do poli (3-HBA) cujos resultados e o mecanismo de eletropolimerização do filme serão apresentados na sequência.

Vale ressaltar que esses estudos são imprescindíveis para o desenvolvimento da plataforma funcionalizada (superfície transdutora) para a incorporação de peptídeos (Am1) que serão utilizados no desenvolvimento de um imunossensor para o diagnóstico da *A. marginale*. Posteriormente, estão os resultados referentes à detecção do alvo complementar à biomolécula imobilizada (Am1) e a caracterização do imunossensor desenvolvido.

6.1 ESTUDO DA FORMAÇÃO E DAS PROPRIEDADES DO POLI (3-HBA) EM ELETRODO DE GRAFITE

As condições experimentais necessárias para se obter os resultados confiáveis dependem da reprodutibilidade dos sistemas. Para isso, os eletrodos de carbono grafite devem apresentar respostas semelhantes para serem utilizados nos experimentos. A Figura 27 mostra o perfil eletroquímico dos EG em duas soluções específicas.

Figura 27: Voltamogramas do último ciclo de varredura dos eletrodos de grafite: (A) $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ / $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5,0 mmol L^{-1}) em KCl (0,1 mol L^{-1}), 50 mV s^{-1} . (B) HClO_4 (0,5 mol L^{-1}), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2015.

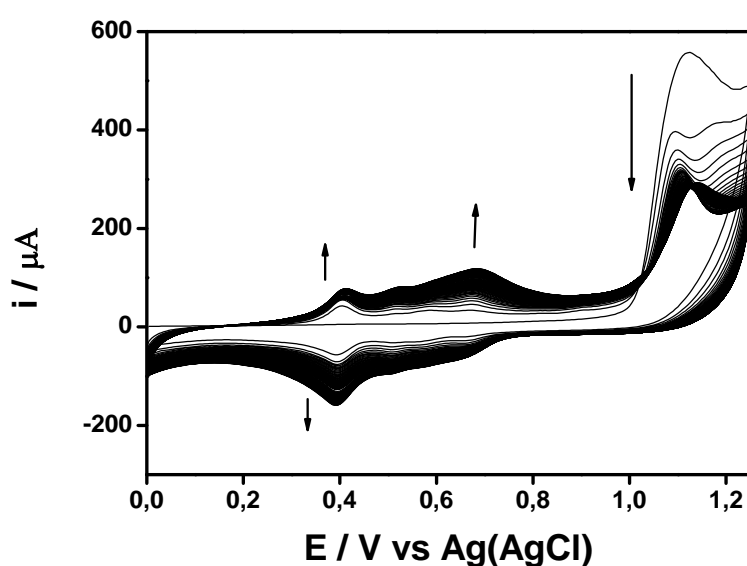
As análises feitas em solução contendo o par redox ferro/ferricianeto (Figura 27 A) foram utilizadas como um indicativo da qualidade de resposta eletroquímica do eletrodo. Nesse tipo experimento os perfis dos voltamogramas cíclicos (VC) dos EG foram avaliados em relação a dois parâmetros: A relação das correntes de pico (I_{pa}/I_{pc}) deve ser aproximadamente igual a 1 e a separação dos potenciais de pico ($E_{pa} - E_{pc}$) deve ser inferior a 100 mV. Os eletrodos que estão em consonância com esses dois parâmetros apresentam reprodutibilidade de suas superfícies para realização dos experimentos eletroquímicos. Em todos os experimentos os eletrodos com variações superiores a 10 % nesses quesitos foram rejeitados.

A análise realizada em ácido perclórico (Figura 27 B) permitiu observar a presença ou ausência de interferentes na solução eletrolítica e na superfície do eletrodo, na mesma janela de potencial utilizada para a polimerização (0,00 a + 1,20 V). Os EG foram condicionados através de 4 ciclos de varredura de potencial (0,00 a + 1,20 V) promovendo assim uma limpeza eletroquímica de suas superfícies eletroativas. O parâmetro adotado para a seleção dos EG após os 4 ciclos de varredura de potencial foi escolher somente os EG com correntes 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. Caso os EG não estivessem dentro dessas especificações também eram descartados. A

resposta anódica que começou a surgir acima do potencial + 1,0 V com potencial de pico em + 1,2 V é uma descarga do solvente (oxidação da água).

Em todos os experimentos, borbulhamento de gás nitrogênio (N_2) foi realizado nas células eletroquímicas para remoção de oxigênio. A Figura 28 mostra os VC referentes aos sucessivos ciclos de potencial do 3-HBA.

Figura 28: VC consecutivos do eletrodo de grafite em solução de $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de 3-HBA. Eletrólito suporte: solução aquosa de HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Número de ciclos = 100; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

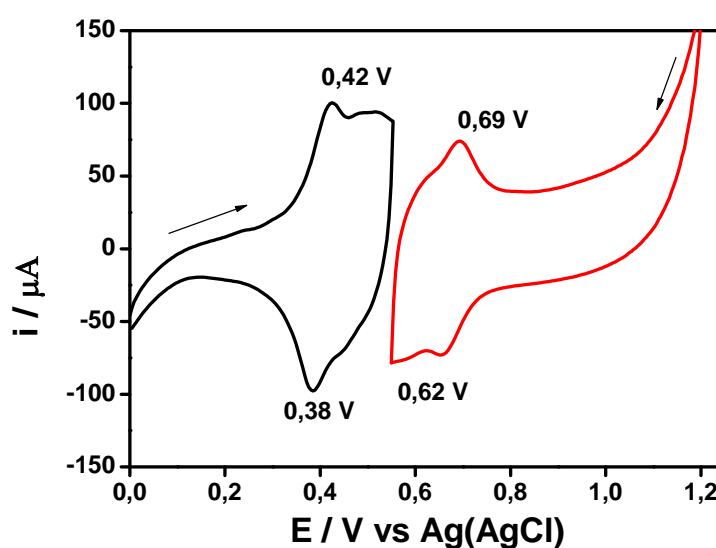


Fonte: Autor, 2015.

A partir dos VC (Figura 28) observa-se que no primeiro ciclo (varredura direta) a oxidação do monômero (3-HBA) ocorre em potencial de +1,12 V, que se refere à formação do cátion radical. Na varredura inversa desse mesmo ciclo é possível identificar o aparecimento de um pico de redução em + 0,38 V e outro discreto pico de redução em + 0,62 V referente ao material polimérico já depositado na superfície do EG. À medida que se realiza os sucessivos ciclos de potencial os respectivos processos de oxidação correspondentes, aparecem em forma de um pico alongado com dois picos localizados em + 0,42 V (1º pico de oxidação) e + 0,69 V (2º pico de oxidação) além de um discreto pico por volta de + 0,50 V. Os picos de oxidação nos potenciais de 0,42 V e 0,69 V são correspondentes aos picos de redução em potenciais de 0,38 V e 0,62 V,

respectivamente. Pode-se afirmar isto, pois estudos para identificação da complementaridade foram realizados, após a eletropolimerização do poli (3-HBA) nos potenciais de 0 a 0,5 V e 1,2 a 0,5 V (Figura 29). Com isso, percebe-se que o aparecimento dos picos de redução está condicionado, concomitantemente, aos de oxidação e vice-versa nos dois respectivos picos, configurando-os assim como par redox.

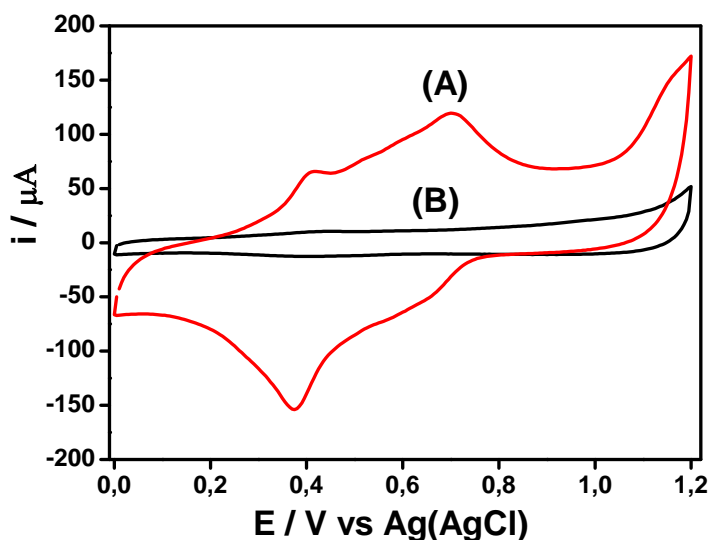
Figura 29: Voltametria cíclica do EG/poli (3-HBA) em solução aquosa de HClO_4 0,5 mol L^{-1} . Número de ciclo = 1; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2015.

A medida em ácido perclórico após a formação do material é necessária para a retirada (oxidação) de monômero residual presente na malha polimérica, além de analisar a presença de uma resposta redox relativa ao polímero. A Figura 30 mostra a região de atividade eletroquímica do eletrodo modificado com poli (3-HBA) comparado com o eletrodo não modificado em solução de ácido perclórico.

Figura 30: VC obtidos após eletropolimerização, somente em solução de ácido perclórico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, na ausência do monômero, para os eletrodos de grafite: (A) modificado com poli (3-HBA) e (B) não-modificado, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2015.

Pode-se observar que há modificação na superfície do eletrodo de grafite após o procedimento de eletropolimerização. Os valores de corrente para o eletrodo modificado, Figura 30(A), são similares aos valores de corrente dos VC da eletropolimerização do 3-HBA (Figura 28), o que implica que o material eletropolimerizado fica adsorvido sobre a superfície do eletrodo de grafite.

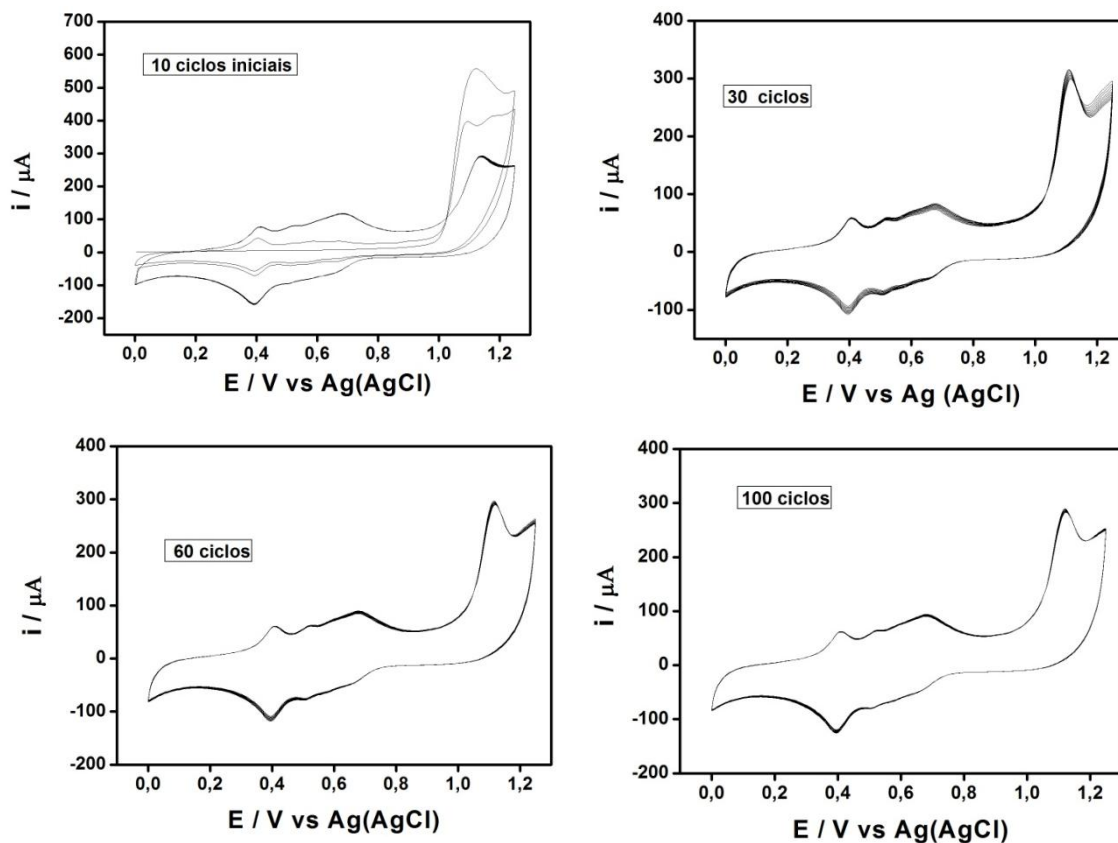
6.1.1 Otimização do número de ciclos de varredura para a funcionalização dos eletrodos de grafite

Inicialmente, a eletropolimerização do 3-HBA foi realizada aplicando 100 ciclos de varredura de potencial (0,00 a +1,20 V), velocidade de 50 mV s^{-1} (Figura 28). A fim de compreender melhor o perfil dos VC do poli (3-HBA) em função do número de ciclos de varredura de potencial, foram feitas eletropolimerizações empregando 10, 30, 60 e 100 ciclos de varredura de potencial, na mesma janela de potencial da eletropolimerização e na mesma velocidade de varredura (Figura 31).

O tempo para cada ciclagem foi 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, sendo que 24 s são gastos na varredura total da oxidação e 24 s na varredura total de redução do material eletrossintetizado na superfície do EG. Com isso, o tempo total gasto para funcionalizar cada EG é de aproximadamente 1h e 20 minutos (100 ciclos de varredura).

Levando-se em relevância esse tempo para funcionalizar cada EG utilizado no desenvolvimento do imunossensor para diagnóstico da anaplasmosse bovina e do custo computacional envolvido no processo, foi realizado uma otimização desse tempo a partir do cálculo das cargas elétricas totais dos picos anódicos e das cargas elétricas totais dos picos catódicos em função do número de ciclos de varredura de potencial (Figura 32). Essas cargas foram calculadas a partir da integração dos picos anódicos para 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 ciclos de varredura de potencial do VC disponível na Figura 28, [corrente (μA) versus potencial (V) dividido pela velocidade de varredura (V s^{-1})]. O mesmo procedimento, separadamente, foi feito para os picos catódicos.

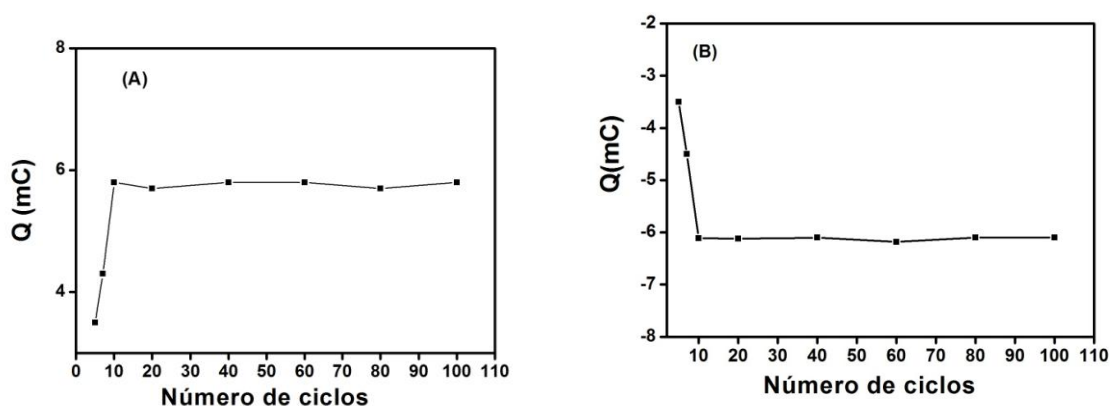
Figura 31: Mostra da esquerda para a direita os VC consecutivos (10, 30, 60, 100 ciclos) do eletrodo de grafite em solução de $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de 3-HBA. Eletrólito suporte: HClO_4 $0,50 \text{ mol L}^{-1}$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2015.

A análise conjunta dos VC (Figura 31) mostra que, a partir do 10º ciclo de varredura de potencial, os picos de corrente anódicos e catódicos são semelhantes independentemente do número de ciclos.

Figura 32: (A) carga elétrica total dos picos anódicos; (B) carga elétrica total dos picos catódicos em função do número de ciclos, obtidas a partir de 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 cíclicos de varredura de potencial consecutivos em solução de 2,5 mmol L⁻¹ de 3-HBA. Eletrólito suporte: solução aquosa de HClO₄ 0,5 mol L⁻¹, janela de potencial entre 0,0 e + 1, 2 V, 50 mV s⁻¹.



Fonte: Autor, 2015.

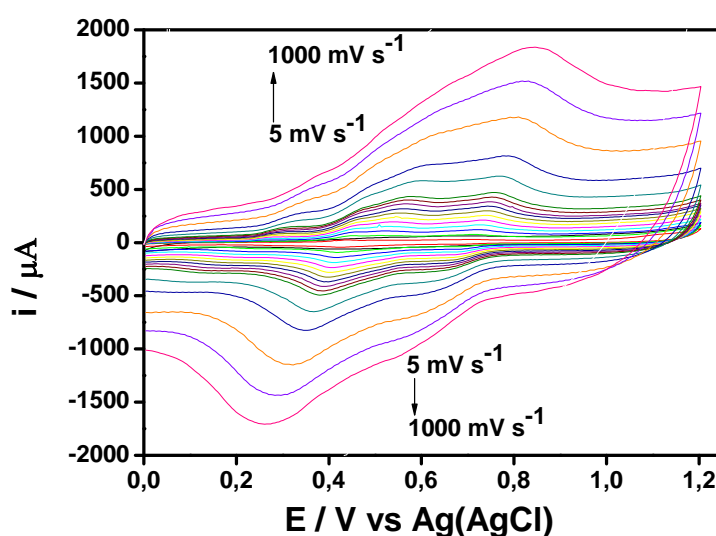
Verifica-se que a partir do 10º ciclo de varredura de potencial as cargas elétricas totais dos picos anódicos e as cargas elétricas totais dos picos catódicos ficam praticamente constante, em módulo por volta de 6,0 mC. Com isso, todos os eletrodos de grafite, no presente trabalho, foram funcionalizados empregando 10 ciclos de varredura de potencial. As pequenas oscilações da quantidade de carga em função do número de ciclos em relação aos picos anódicos e catódicos se devem, provavelmente, as irregularidades na superfície do EG e as imprecisões ao traçar a linha base para calcular as integrais dos picos anódicos e catódicos.

6.1.2 Estudo da atividade eletroquímica e da estabilidade do poli (3-HBA)

Inicialmente, com o intuito de compreender melhor a atividade eletroquímica do poli (3-HBA), o eletrodo modificado foi colocado em solução contendo ácido perclórico 0,5 mol L⁻¹, aplicando 10 ciclos de varredura de potencial variando a velocidade de varredura de 5 mV s⁻¹ a 1000 mV s⁻¹. Esses experimentos também corroboram para o melhor entendimento do tipo de

transporte de massa que ocorre ao longo da malha polimérica. A Figura 33 apresenta o último ciclo dos voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura para o poli (3-HBA) em solução de ácido perclórico a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 33: Último ciclo de varredura do EG/poli (3-HBA), em ácido perclórico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, nas seguintes velocidades / mV s^{-1} (5; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100; 110; 150; 200; 300; 400; 500; 1000).



Fonte: Autor, 2015.

Com base nos VC apresentados na Figura 33 podemos observar que em altas velocidades de varredura há uma considerável alteração nas correntes dos pico anódicos e catódicos, uma vez que, essas correntes são diretamente proporcionais a raiz quadrada da velocidade de varredura, relação de Randles-Sevcik¹⁶⁸. Em altos valores de velocidade (Figura 33), é notório que para o pico 1 [$E_{pa} = +0,42\text{V}$ e $E_{pc} = +0,38\text{V}$ (Figura 29)] as correntes dos picos anódicos praticamente desaparecem, enquanto que para o pico 2 ($E_{pa} = +0,69\text{V}$ e $E_{pc} = +0,62\text{V}$ (Figura 29) as correntes dos picos catódicos também praticamente desaparecem. Isso se deve, provavelmente, a cinética da reação e o comprometimento no tempo de difusão dos contra-íons H_3O^+ e ClO_4^- , provenientes do HClO_4 , na malha polimérica. Vale ressaltar que os polímeros formados por eletropolimerização são auto-dopados com os contra-íons

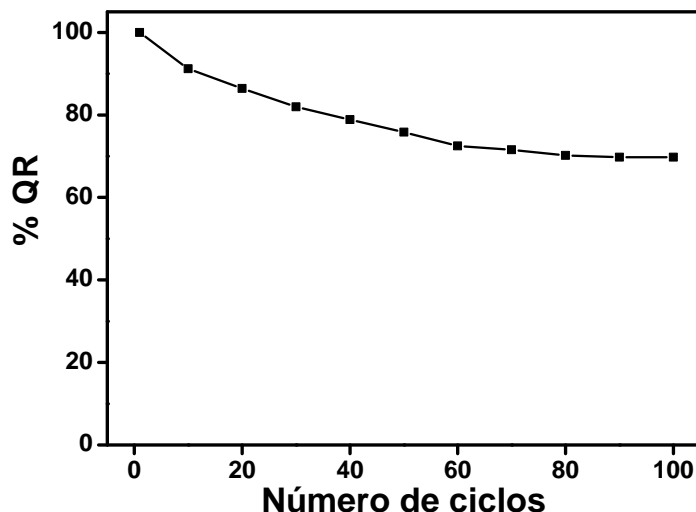
presentes na solução. Outro item que merece ser destacado nesse contexto é que o processo eletroquímico realizado a velocidade mais baixa contribui para maior transporte iônico ao longo da cadeia polimérica. Por outro lado, observa-se uma menor resposta eletroquímica, ocasionando assim queda nos valores de corrente .

Na sequência, a estabilidade eletroquímica do poli (3-HBA) foi verificada por 100 ciclos consecutivos de varredura de potencial entre 0 a + 1,2 V (abrange toda a região redox do polímero) a 50 mV s⁻¹ utilizando o mesmo eletrólito suporte da eletropolimerização. Os valores de carga foram calculados pela integral da região anódica, que por sua vez, são muito semelhantes à da catódica e, por isso, somente a primeira será visualizada, Figura 34. Nessa Figura também é possível observar a diminuição da carga relativa (Q_r) em função do aumento dos ciclos de potencial realizados. Esta perda relativa foi determinada a partir da carga obtida pela integração dos VC dos picos anódicos, dada pela relação apresentada na Equação 1:

Equação 1: $Q_r = 100 - [(Q_1 - Q_n)/Q_1].100$

Onde: Q_r é a carga voltamétrica relativa obtida do filme eletrogerado em %, Q₁ é a carga obtida após a eletropolimerização e Q_n é a carga obtida após n ciclos de potencial.

Figura 34: Porcentagem de carga relativa dos eletrodos de grafite modificados com poli (3-HBA) a 50 mV s^{-1} . Janela de potencial entre 0,0 a + 1,2 V. Eletrólito suporte HClO_4 $0,50 \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2015.

A estabilidade eletroquímica feita com 100 ciclos de potencial (Figura 34) mostra que há uma queda nos valores de carga nos primeiros ciclos e a tendência a se estabilizar com ciclos subseqüentes até alcançar um valor de 70%. Essa porcentagem de degradação (30%) no final dos 100 ciclos de potencial foi semelhante a do polipirrol em fibra de carbono, 25% após 100 ciclos de varredura¹⁶⁹. Em trabalho desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa com o poli (4-HBA) a porcentagem de deterioração, no final de 100 ciclos de varredura em ácido perclórico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ a 50 mV s^{-1} , foi de 28%¹⁵⁶. Vale ressaltar que essa estabilidade eletroquímica do poli (3-HBA) exerce um importante papel no desenvolvimento de um imunossensor para diagnóstico da anaplasmosse cuja superfície transdutora foi funcionalizada com esse filme polimérico.

Conforme já mencionado anteriormente, durante a eletropolimerização do poli (3-HBA) ocorre uma dopagem com os íons da solução. Durante a oxidação do material eletrogerado na superfície do EG, há a formação de cargas positivas no polímero, o que pode ser acompanhado da expulsão dos cátions (H_3O^+) para a solução e a entrada dos ânions (ClO_4^-) na malha

polimérica. Na redução, há o retorno dos mesmos para o polímero, porém, não na mesma quantidade que foi retirada, além da expulsão de ânions (ClO_4^-). Por isso, ocorre a queda em porcentagem de carga nos primeiros ciclos de varredura do potencial. Com os ciclos subseqüentes, a taxa de expulsão continua maior do que a taxa de inserção e a resposta de carga decresce até tender a uma estabilização ao final de 100 ciclos.

Vale destacar também que essa diminuição da resposta eletroquímica pode estar relacionada com a diminuição da extensão de conjugação da nuvem π de elétrons do polímero em virtude do stress eletroquímico da malha polimérica ao longo das sucessivas ciclagens de potencial.

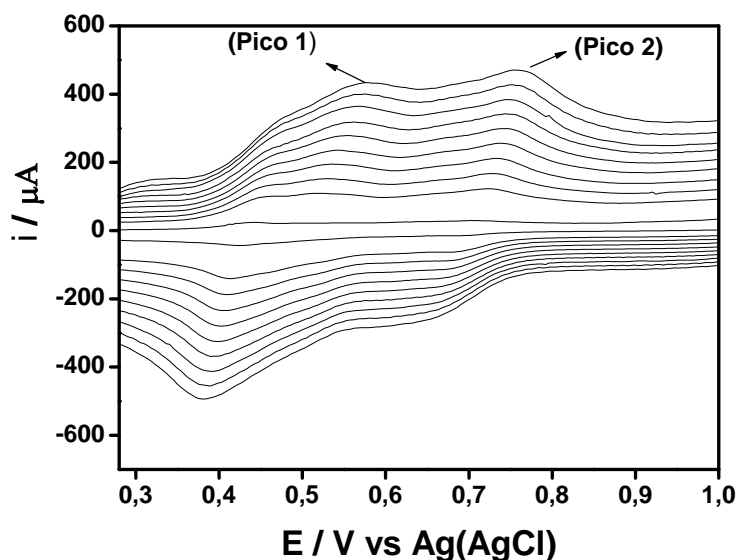
6.1.3 Estudo dos diagnósticos de reversibilidade do poli (3-HBA)

Nesse tópico serão discutidos os diagnósticos de reversibilidade referentes à eletrossíntese do poli (3-HBA) em EG. Esse estudo também auxilia na melhor compreensão dos processos de transferência de massa (difusão dos eletrólitos da solução, H_3O^+ e ClO_4^-) na interface compreendida entre a malha polimérica e a solução eletrolítica.

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 Nerstiano 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 redoxes. 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 processos¹⁷⁰. A Figura 35 mostra os VC do EG modificado com poli (3-HBA) em solução de ácido perclórico 0,5 mol L⁻¹ sendo submetido a sucessivas varreduras de potencial variando a velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹ a 100 mV s⁻¹. Essa variação de velocidade foi definida em função da faixa de linearidade do poli (3-HBA) em relação aos incrementos de velocidade (Figura

33), uma vez que, fora da faixa de linearidade conclusões errôneas relacionadas aos diagnósticos de reversibilidade podem ser obtidas.

Figura 35: Voltametrias cíclicas consecutivas para o EG/poli (3-HBA) em solução de HClO_4 0,5 mol L^{-1} ; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ a 100 mV s^{-1} .



Fonte: Autor, 2015.

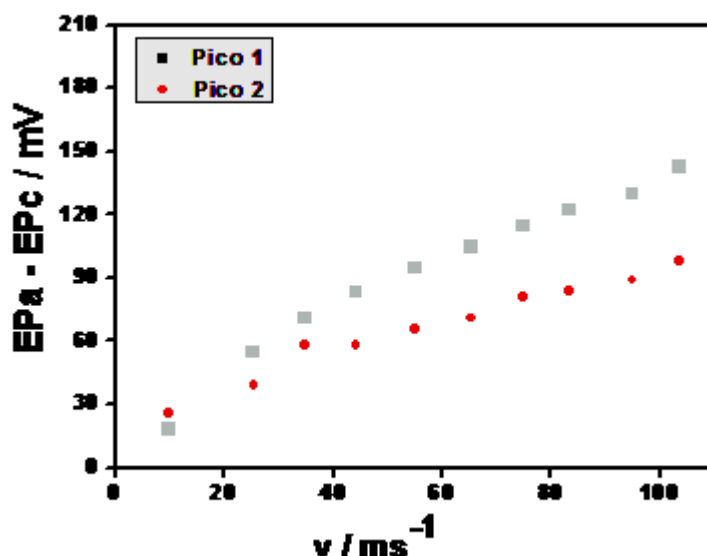
Na sequência, serão discutidos 6 diagnósticos de reversibilidade tomando como referência os picos 1 e 2 (Figura 35) que retratam as regiões eletroativas do poli (3-HBA) em solução de HClO_4 a 0,5 mol L^{-1} .

O diagnóstico 1 mostra a diferença entre os potenciais de picos anódicos (E_{pa}) e catódicos (E_{pc}), em mV, conforme representado na equação 2:

Equação 2: $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$

A Figura 36 mostra os valores de ΔE_p obtidos para o poli (3-HBA) em função do incremento da velocidade de varredura.

Figura 36: ΔE_p vs. velocidade de varredura (10 mV s^{-1} a 100 mV s^{-1}) em solução de HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para EG/polí (3-HBA).



Fonte: Autor, 2015.

A Figura 36 mostra que o pico 2 apresenta menor variação dos potenciais de pico ($E_{pa} - E_{pc}$) em relação ao pico 1. Com isso, podemos inferir que a formação do polaron tem uma TTE menor em relação à formação do seu respectivo bipolaron que apresenta alta TTE, em concordância ao reportado na literatura¹⁷¹. Vale ressaltar que o aumento de ΔE_p ocasionado pelo aumento da velocidade de varredura é uma característica pertinente a sistema quase-reversível.

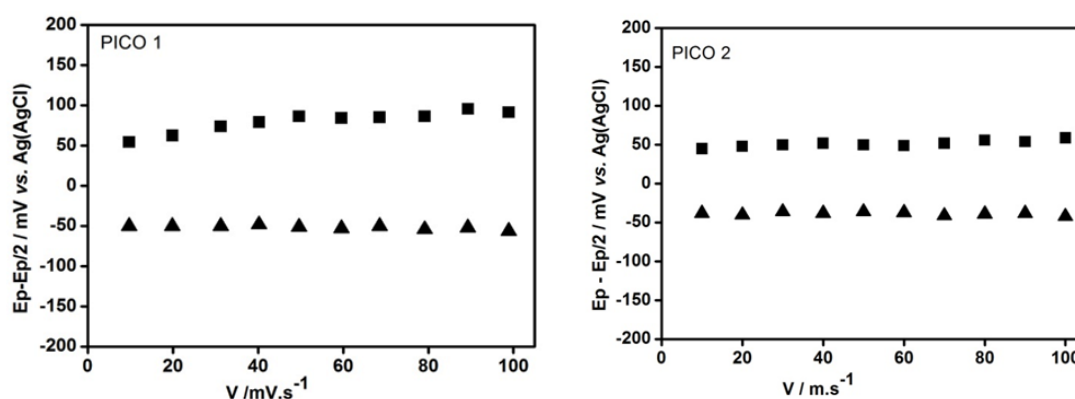
O diagnóstico 2 mostra a diferença entre os potenciais de picos anódicos (E_{pa}) e catódicos (E_{pc}) e os seus respectivos potenciais de meia onda ($E_{p/2}$), em mV, conforme representado na equação 3:

Equação 3: $E = |E_p - E_{p/2}|$

A Figura 37 mostra os valores de E ($E_p - E_{p/2}$) obtidos para o poli (3-HBA) em função do incremento da velocidade de varredura. Destaca-se que na Figura 36 a amostragem dos potenciais foi realizada no instante em que a oxidação e a redução foram máximas, potenciais de pico, entretanto, o instante

mais adequado para qualquer tipo de estudo em termos de equilíbrio químico seria no potencial de meia onda.

Figura 37: $E_p - E_{P/2}$ vs. velocidade de varredura do (■) pico anódico e (▲) pico catódico em solução de HClO_4 $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ para eletrodos de grafite modificados com poli (3-HBA).

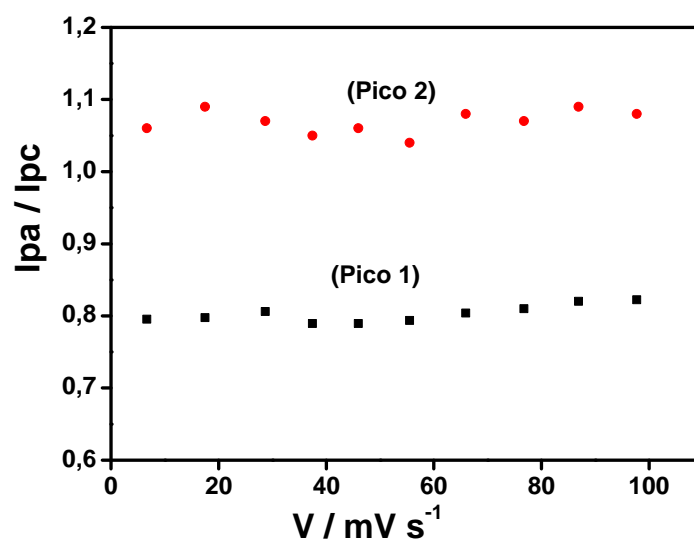


Fonte: Autor, 2015.

A análise conjunta dos dados da Figura 37 permite inferir que o pico 2 apresenta uma maior reversibilidade em relação ao pico 1, já que este apresenta uma sensibilidade maior de incremento de potencial em função do aumento da velocidade de varredura, visto que o pico 2 apresenta patamares constantes de potencial em função do aumento da velocidade de varredura.

A Figura 38 mostra o diagnóstico 3 que retrata a relação entre as correntes de pico anódico (I_{pa}) e catódico (I_{pc}) em função do incremento das velocidades de varredura do EG/poli (3-HBA) em solução de HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 38: I_{pa} / I_{pc} vs velocidade de varredura em solução de HClO_4 0,5 mol L^{-1} para EG/poli (3-HBA).



Fonte: Autor, 2015.

Nesse tipo de análise, os valores de I_{pa}/I_{pc} iguais a 1 são pertinentes a sistemas reversíveis. Com isso, novamente, o pico 2 apresenta uma reversibilidade maior em relação ao pico 1.

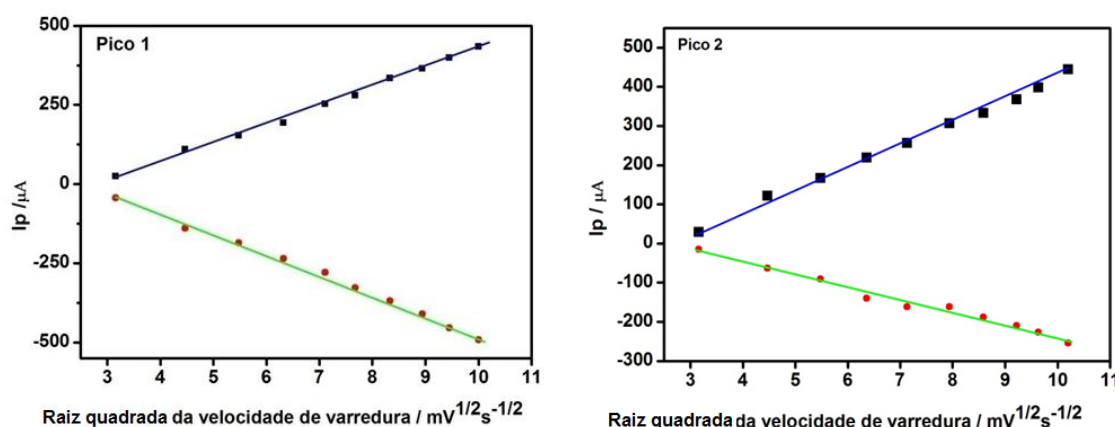
O diagnóstico 4 mostra as relações de Randles-Sevcik¹³¹, em que a corrente de pico não depende apenas da área eletroativa do eletrodo de trabalho da concentração e das propriedades de difusão das espécies eletroativas, mas também da raiz quadrada da velocidade de varredura (equação 4). Vale ressaltar que nesse diagnóstico a equação de Randles foi mencionada apenas para comparação dos resultados, uma que vez, essa equação não se aplica para filmes finos, como é o caso do poli (3-HBA) eletrossintetizado na superfície do EG.

Equação 4: $I_p = 2,686 \cdot 10^5 \cdot C \cdot A \cdot n^{3/2} \cdot D^{1/2} \cdot V^{1/2}$ (equação de Randles-Sevcic)¹³¹

Onde: n é o número de elétrons envolvidos no processo, A é a área do eletrodo (cm^2), D é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) e C é a concentração da espécie em solução (mol L^{-1}) e v é a velocidade de varredura (V s^{-1}).

O diagnóstico 4 mostra uma relação linear que deve passar pela origem no gráfico de I_p vs. $v^{1/2}$ para sistemas totalmente reversíveis. A Figura 39 mostra esse diagnóstico para o EG/poli (3-HBA).

Figura 39: I_p vs. $v^{1/2}$ do (■) pico anódico e (●) pico catódico em solução de HClO_4 0,50 mol L^{-1} para EG/poli (3-HBA).

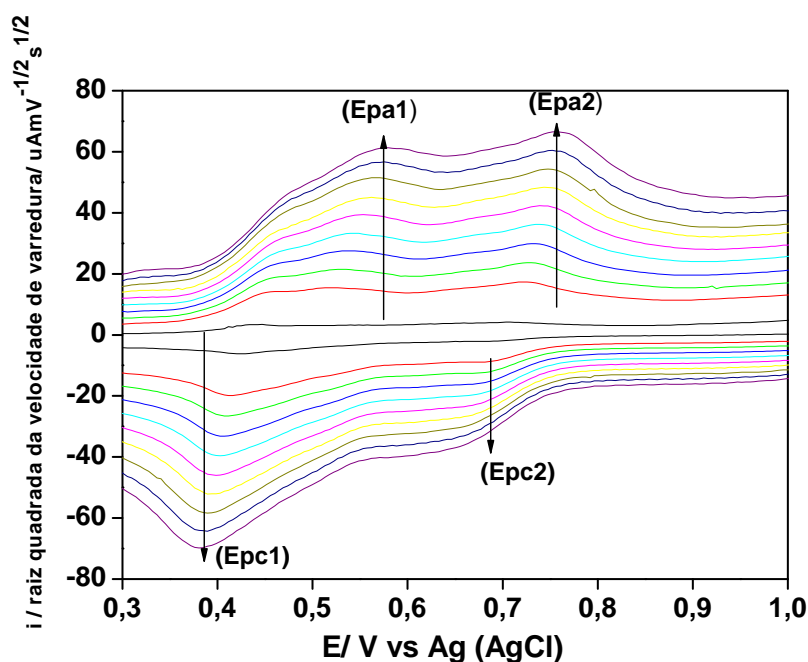


Fonte: Autor, 2015.

Nessa Figura 39 é possível observar que a corrente de pico de oxidação e também a corrente de pico de redução respondem linearmente ($R > 0,99$) com a raiz quadrada da velocidade de varredura. Esse resultado permite dizer que o transporte de massa dos íons perclorato (ClO_4^-) e hidrônio (H_3O^+) no interior do filme polimérico pode ser regido por difusão. Outro ponto que vale destacar é que as correntes de pico são proporcionais a raiz quadrada das velocidades de varredura. Além disso, é notório (Figura 39) que as retas passam bem próximo da origem (extrapolação) como característica de sistemas reversíveis, por isso, tem-se mais um diagnóstico que corrobora com a ideia de que o poli (3-HBA) constitui um material quase reversível.

O diagnóstico 5 é complementar ao diagnóstico 4, já que, aquele mostra que o quociente entre as correntes de pico pela raiz quadrada da velocidade de varredura em função do potencial é uma constante, ou seja, o E_p independe da velocidade de varredura. Em se tratando de sistemas totalmente reversíveis não há distorção dos VC em função do incremento das velocidades de varredura no mesmo eletrólito suporte. A Figura 40 mostra a relação dos E_p com as velocidades de varredura.

Figura 40: $i_p / v^{1/2}$ vs. E_p em solução de HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para EG/poli (3-HBA).



Fonte: Autor, 2015.

A análise conjunta dos gráficos (Figura 40) mostra que os potenciais de pico para o poli (3-HBA) apresentam um pequeno deslocamento (E_{pc} do pico 1, E_{pa} do pico 2 e E_{pc} do pico 2). Para sistemas irreversíveis o E_p depende da velocidade de varredura, sendo assim, podemos inferir de acordo com esse diagnóstico que o referido polímero apresenta característica de material quase reversível.

O diagnóstico 6 refere-se a uma aplicação direta das relações estabelecidas por Frederick Cottrell¹⁷² 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 de trabalho planar. Essa relação está representada de forma resumida na equação 5:

Equação 5: $i_p = K \cdot (1/t)^{1/2}$

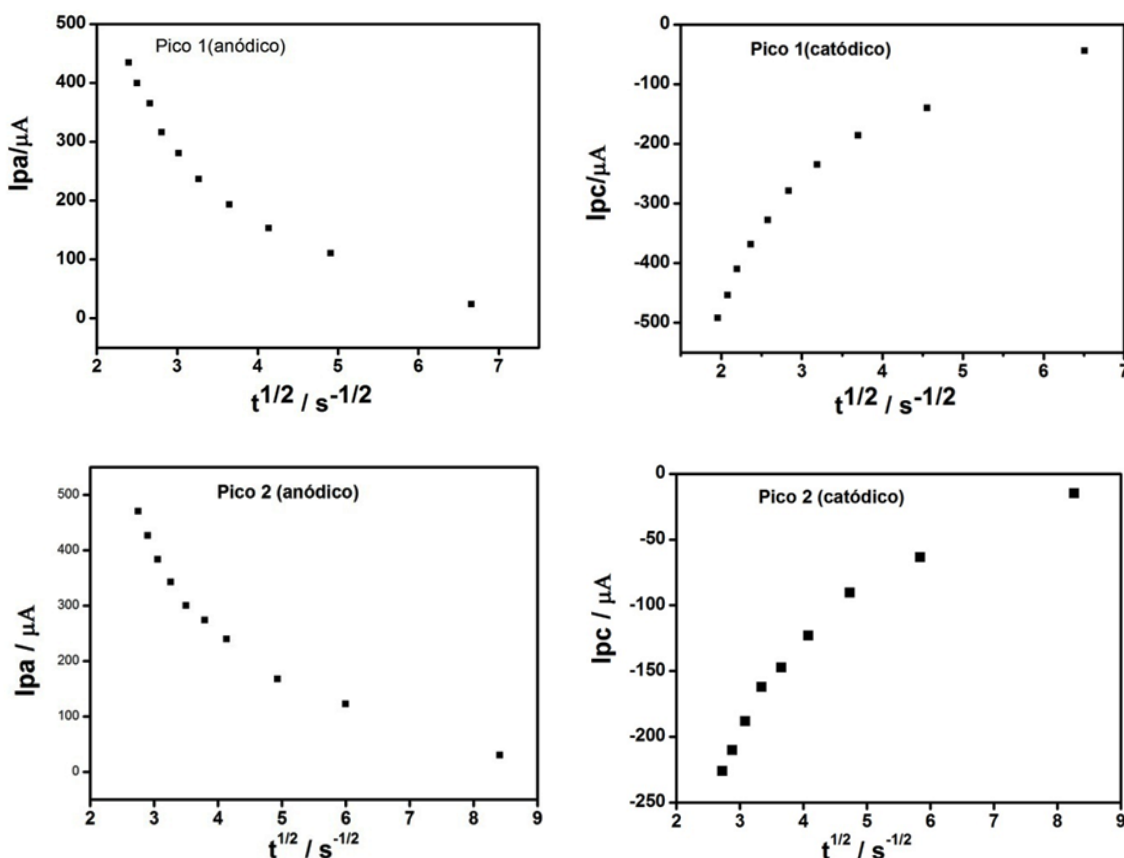
Em que;

K é a constante de proporcionalidade, que por sua vez, depende da área do eletrodo, da concentração da espécie eletroativa, do número de elétrons transferido na reação redox e da raiz quadrada do coeficiente de difusão.

t é o tempo em segundos.

A Figura 41 mostra o diagnóstico 6 para o EG/poli (3-HBA) em HClO_4 0,5 mol L^{-1} .

Figura 41: I_p vs. $t^{1/2}$ em solução de HClO_4 0,50 mol L^{-1} para EG/poli (3-HBA).



Fonte: Autor, 2015.

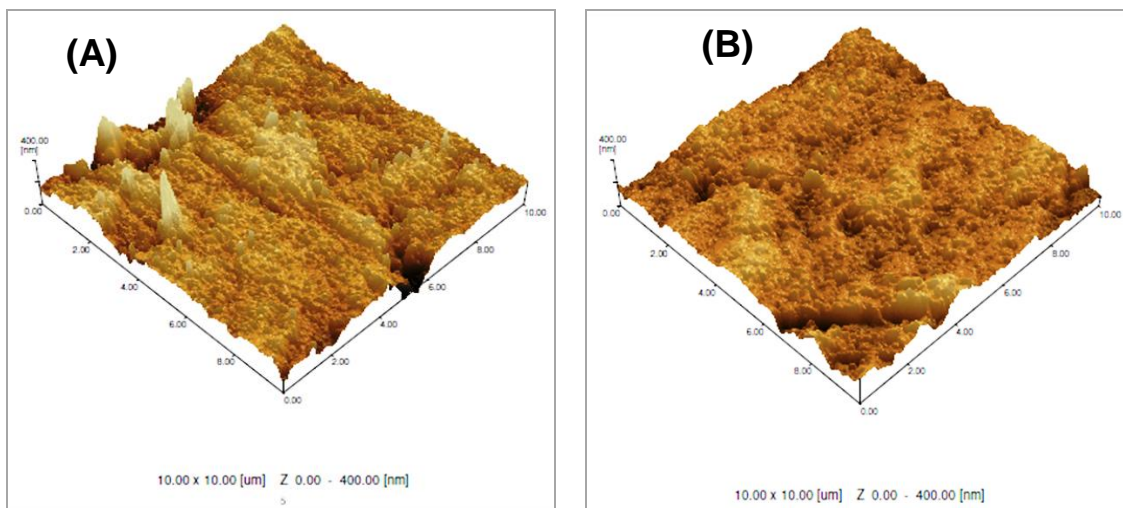
Vale destacar que o tempo (t) de cada varredura foi obtido dividindo os potenciais pela velocidade de varredura. As relações matemáticas de função potência apresentadas na Figura 41 são características de processos controlados por difusão conforme verificado também no diagnóstico 4 (Figura 39). Sendo assim, os diagnósticos de reversibilidade aplicados mostram a possibilidade de que as transições redoxes do poli (3-HBA) serem classificadas como quase reversíveis. Enquanto que o transporte de massa dos íons H_3O^+ e

ClO_4^- no interior do filme polimérico foi regido por um processo difusional. Esse tipo de transporte de massa também deve predominar durante a eletropolimerização do poli (3-HBA), uma vez que, a concentração do eletrólito suporte ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) é cerca de 200 vezes superior a concentração do monômero ($2,5 \text{ mmol L}^{-1}$), isso minimiza o transporte por migração, além de a temperatura ficar praticamente constante durante o experimento e a pequena perturbação externa minimiza o transporte de massa por convecção.

6.1.4 Estudos morfológicos e de superfície do EG e EG/poli (3-HBA)

A Figura 42 apresenta as imagens de microscopia de força atômica (MFA) do EG e EG/poli (3-HBA).

Figura 42: Imagens de microscopia de força atômica. (A) eletrodo de grafite; (B) eletrodo de grafite modificado com poli (3-HBA), número de ciclos= 10, eletrólito suporte: HClO_4 a $0,5 \text{ mol. L}^{-1}$; Janela de potencial: $0,0$ a $+ 1,2 \text{ V}$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2015.

Visualmente, pode-se notar que a superfície do EG (Figura 42A) apresenta um maior número de vales e picos (superfície mais irregular e porosa) em relação à superfície modificada do EG após a eletropolimerização em 10 ciclos de varredura de potencial (Figura 42 B). Os valores de rugosidade determinados por MFA para o eletrodo de grafite foi de $98,66 \pm 5,6 \text{ nm}$ e

modificado com poli (3-HBA) foi de $24,5 \pm 1,87$ nm. Os valores de rugosidade mostram que o filme reduziu em aproximadamente 75 % a rugosidade da superfície do EG.



Essa redução considerável da rugosidade do eletrodo de grafite modificado com um filme polimérico delgado, eletropolimerizado apenas com 10 ciclos de potencial, se deve à estrutura tridimensional do poli (3-HBA), uma vez que, a massa do polímero eletrossintetizada na superfície do EG foi de aproximadamente $0,11 \pm 0,01$ mg. Esse valor foi semelhante ao valor encontrado na eletrossíntese do poli (4-HBA) em outro trabalho desenvolvido pelo grupo de pesquisa do LAFIP¹⁵⁶.

6.1.5 Estudo de espectroscopia de impedância eletroquímica aplicado ao eletrodo de grafite funcionalizado com o poli (3-HBA)

Os fenômenos de transporte em eletrodos funcionalizados com sistemas poliméricos começaram a ser efetivamente estudados por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) a partir da década de 90¹⁷³. Nesse tipo de sistema, eletrodo modificado, a configuração de célula (eletrodo / filme polimérico / eletrólito) é a mais adotada para a análise das interfaces envolvidas. Experimentalmente é o sistema mais fácil de ser estudado, entretanto, corresponde à situação física mais complicada, uma vez que, duas ou mais interfaces diferentes (sistema assimétrico) estão envolvidas e, portanto, requer um maior número de parâmetros para ser descrito.

Como os eletrodos de grafite apresentam aspecto poroso (Figura (42 A)), mesmo após funcionalização com o polímero (Figura 42 (B)) as seguintes regiões são esperadas para a representação no diagrama de Nyquist para o EG/poli (3-HBA): região de controle cinético (altas frequências) e região de controle por transporte de massa (frequências intermediárias). Vale destacar que na região de controle cinético temos os semicírculos (componentes resistivos e capacitivos em paralelos) devidos a efeitos de interface (polímero / eletrólito, polímero / eletrodo), já na região de controle por transporte de massa, há o aparecimento de uma região de Warburg devida à difusão semi-infinita de espécies no poli (3-HBA) que é definida por uma linha reta com ângulo de inclinação de 45° . Em baixas frequências ainda podemos esperar um

comportamento puramente capacitivo devido à limitação do transporte de massa pelo acúmulo de carga.



Frequentemente, os resultados de EIE são associados a um circuito elétrico. Os elementos mais utilizados para a interpretação de dados de impedância em eletrodos modificados com filmes poliméricos estão listados a seguir:

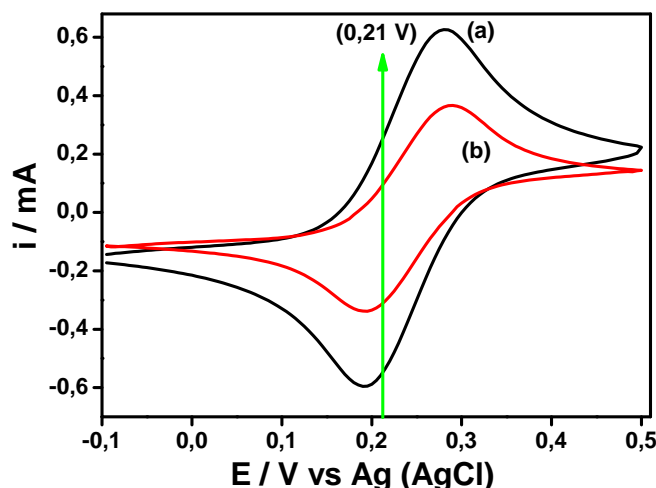
a) Resistores: simulam o comportamento resistivo do EG, filme e eletrólito.

b) Elementos de fase constante (EFC ou CPE ou ainda Qdl): elementos com a impedância definida por $Z_{(CPE)} = A_{(CPE)} \cdot (j\omega)^{-n_{(CPE)}}$. Em que, A é a constante de frequência, ω é a frequência angular e $n_{(CPE)}$ é um fator dimensional, geralmente com valores entre 0,5 e 1. O significado físico desse fator está relacionado com a heterogeneidade do eletrodo funcionalizado (eletrodo de trabalho). Sendo assim, quando a superfície do referido eletrodo é irregular (rugosa), a componente capacitiva do semicírculo é mais bem representada por um elemento de fase constante que por um capacitor. Sendo assim, o CPE simula o desvio do comportamento de um capacitor puro devido às irregularidades de superfície do eletrodo¹⁷⁴.

c) Elementos difusionais: Esses simulam os efeitos de difusão. Podem descrever uma difusão semi-infinita (impedância de Warburg, W) ou a difusão num meio onde a interface atrapalha o fluxo de espécies sendo representada por uma função tangente hiperbólica, impedância transmissiva (T).

O EG e o EG/poli (3-HBA) foram utilizados como substratos para a reação redox do par $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ numa solução de ferro/ferricianeto de potássio $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ contendo $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e estudados através de voltametria cíclica e EIE. A voltametria cíclica foi utilizada para a determinação do potencial de equilíbrio ($E_{p/2}$) de cada sistema (Figura 43). Os espectros de EIE foram obtidos nos potenciais de meia onda ($E_{p1/2}$) de cada sistema, medidos previamente.

Figura 43: VC do 1º ciclo de varredura obtido a 50 mV s^{-1} em solução de ferro/ferricianeto de potássio $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ contendo KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,7, para: (a) EG; (b) EG/poli (3-HBA).

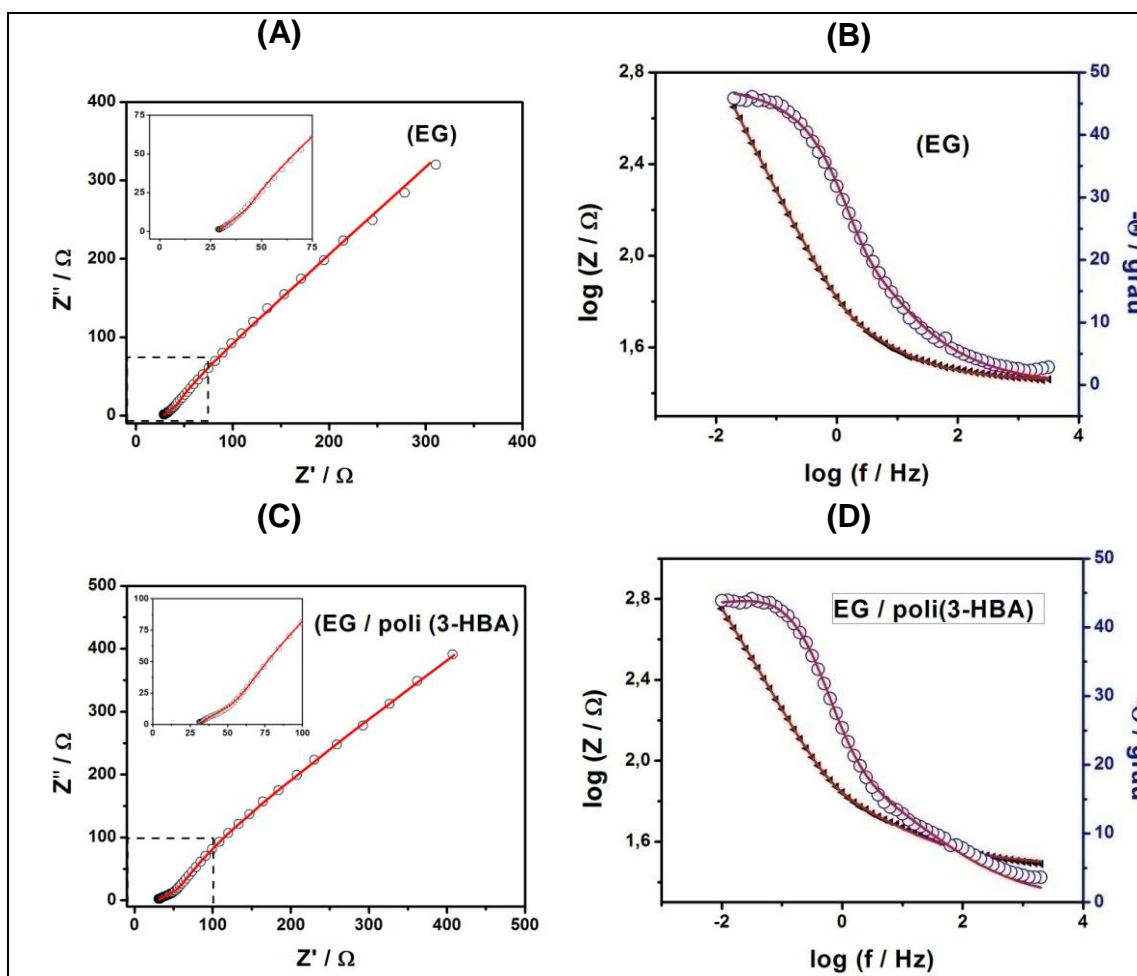


Fonte: Autor, 2015.

Como podem ser observados na Figura 43 os potenciais de meia onda ($E_{p/2}$) para o eletrodo funcionalizado e não funcionalizado ocorreram por volta de 0,21 V (seta verde, Figura 43). Há também um pequeno deslocamento no potencial de pico de oxidação para potenciais mais positivos (Figura 43 (b)), o que indica modificação na superfície do eletrodo de grafite. Esse deslocamento do potencial de pico do EG/ poli (3-HBA) provavelmente está relacionado com a diminuição da área eletroativa (menos rugoso) e a repulsão entre a sonda redox aniônica com os grupos aniônicos do filme em pH 6,7, isso será apresentado com mais detalhes na discussão dos resultados da resistência à transferência de carga da Tabela 1.

Os resultados de EIE foram tratados a partir da simulação do espectro de impedância com circuitos elétricos, através do software do NOVA1.1 em interface com o Autolab. A Figura 44 mostra os espectros de EIE no plano complexo (diagrama de Nyquist) e os gráficos de variação do módulo de impedância e do ângulo de fase com a frequência (diagramas de bode), comparando os resultados experimentais com os resultados simulados, para o EG e EG/poli (3-HBA).

Figura 44: Diagramas de Nyquist (à esquerda) e Bode (à direita) dos espectros de impedância eletroquímica do EG e EG/poli (3-HBA), obtidos em solução de $K_4[Fe(CN)_6]$ / $K_3[Fe(CN)_6]$ 5,0 mmol L⁻¹ contendo KCl 0,1 mol L⁻¹; polarizados a 0,21 V; Amplitude 5 mV; Intervalo de frequência: 10⁴ a 10⁻² Hz. As linhas sólidas representam os resultados simulados a partir do circuito da Figura 45. As inserções correspondem a uma ampliação (zoom) nas regiões de alta frequência (diagrama de Nyquist).

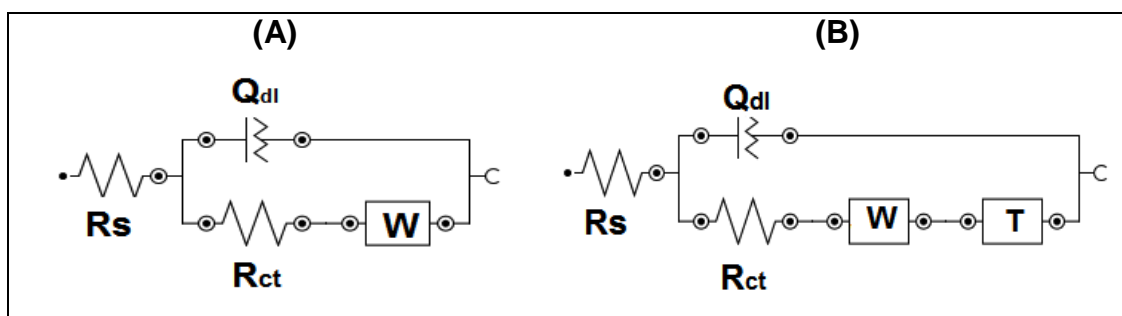


Fonte: Autor, 2015.

Ao comparar os diagramas de Nyquist entre o EG (Figura 44(A)) e o eletrodo de grafite funcionalizado (Figura 44 (C)) verifica-se um semicírculo na região de alta frequência seguido de um comportamento do tipo Warburg, o que evidencia um sistema controlado pelo processo difusional. Já nos gráficos de bode, observa-se que os ângulos de fase destacados em azul, para o EG

(Figura 44 (B)) e para o eletrodo funcionalizado (Figura 44 (D)), em baixas frequências, estão próximos de 45° , isso é característico de sistema controlado por processo difusional. Além disso, no gráfico de Bode é possível observar apenas uma constante de tempo para o EG e EG/poli (3-HBA) em consonância com a presença de apenas um semicírculo (Nyquist). Sendo assim, é esperado que o EG e o EG/poli (3-HBA) apresentem circuitos elétricos semelhantes para simulação de seus dados experimentais. A Figura 45 mostra o circuito elétrico equivalente que melhor se ajustou aos dados experimentais e a Tabela 1 mostra os valores obtidos para cada parâmetro investigado.

Figura 45: Circuito elétrico equivalente proposto para os resultados de EIE para: (A) EG; (B) EG/poli (3-HBA).



Fonte: Autor, 2015.

Para as condições do experimento, o circuito elétrico equivalente para o EG (Figura 45 (A)) foi um circuito do tipo Randles. Nesse tipo de circuito, R_s representa a resistência da solução eletrolítica, em série com um elemento de fase constante (Q_{dl}), representando o acúmulo de espécies carregadas na interface eletrodo/solução em paralelo à resistência à transferência de carga do par redox (ferro/ferricianeto). Entretanto, um comportamento difusional das espécies eletroativas é frequentemente observado em eletrodos porosos de carbono, de maneira que um elemento difusional de Warburg (W), normalmente, é adicionado em série à resistência à transferência de carga¹⁷⁵.

O circuito elétrico equivalente para o EG/poli (3-HBA) (Figura 45 (B)) foi semelhante ao circuito do EG, exceto pela inserção de mais um elemento difusional, impedância transmissiva (T) em série com a impedância de

Warburg. O elemento difusional T está relacionado à difusão finita de espécies num meio onde uma das interfaces dificulta esta difusão (filme polimérico), isso resulta numa relação da dispersão em frequência com uma função tangente hiperbólica¹⁷⁶, definida como mostra a equação 6:



Equação 6: $Z_{(T)} = \frac{1}{Y_0(j\omega)^{1/2}} \tanh B(j\omega)^{1/2}$

Em que: Y_0 é a admitância, medida em siemens (Ω^{-1}), representa o inverso da impedância (Z); B refere-se a susceptância do meio, medida em siemens (Ω^{-1}) sendo, portanto, o recíproco da reatância (X_c). A susceptância está relacionada com o coeficiente de difusão da solução (D) e com a espessura (L) do filme polimérico eletrossintetizado, como mostra a equação 7:

Equação 7: $D = L^2/B^2$

Com isso, podemos avaliar a difusão de espécies na interface polímero /eletrólito em função dos valores de B e da espessura do filme. O valor obtido para o parâmetro B foi baixo devido, principalmente, a delgada camada do filme depositada, em 10 ciclos de potencial, na superfície do eletrodo de grafite.

Tabela 1: Parâmetros elétricos para o EG e EG/poli (3-HBA) polarizados a 0,21 V obtidos em solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mmol L⁻¹ contendo KCl 0,1 mol L⁻¹. Ajuste (Figura 45).

| | $\chi^2 / 10^{-3}$ | R_s (Ω) | Q_{dl} | | R_{ct} (Ω) | T | | W ($\Omega^{-1}.s$) |
|----------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------------------|-------|--------------------------|------------------------------|------------------|----------------------------|
| | | | Y_0 ($\Omega^{-1}.s^n$) | N_1 | | Y_0 ($\Omega^{-1}.s$) | B (s^n) | |
| EG | 9,30 | 29 | $6,85. 10^{-3}$ | 0,53 | 18 | - | - | $10,50. 10^{-3}$ |
| EG/poli (3-HBA) | 3,70 | 30 | $6,07. 10^{-3}$ | 0,47 | 71,30 | $37. 10^{-3}$ | 0,07 | $6,34. 10^{-3}$ |

Fonte: Autor, 2015.

Os valores apresentados na Tabela 1 são condizentes com o circuito descrito e mostram claramente a alteração nos parâmetros elétricos após a

funcionalização do eletrodo de grafite com o poli (3-HBA). Os dois circuitos apresentaram bons valores de chi-quadrado (χ^2), na ordem de 10^{-3} , demonstrando um baixo erro estatístico na simulação dos dados experimentais. Conforme já citado anteriormente, R_s representa a resistência ôhmica da solução. Nos dados simulados, os valores de R_s ficaram praticamente constantes no EG/poli (3-HBA) em relação ao EG, uma vez que, os espectros de EIE foram realizados no mesmo meio eletrolítico, sendo assim, a resistência da solução é praticamente constante, a pequena variação encontrada está dentro da margem do erro experimental.

Em relação ao elemento de fase constante (Qdl), observa-se que houve um pequeno decréscimo no seu valor do eletrodo funcionalizado em relação ao EG. Vale ressaltar que, neste caso, o Qdl fornece informações a respeito da rugosidade/porosidade (área eletroativa do material) podendo ser tomado como um dado importante para análise da superfície polimérica. Para o EG o maior valor de Qdl pode ser explicado pela maior rugosidade (Figura 42 (A)), sendo que à medida que ocorre a polimerização na superfície do eletrodo essa começa a ser recoberta (Figura 42 (B)) conforme discutido no item 6.1.4. Vale ressaltar também que a pequena variação encontrada para os valores de Qdl entre o eletrodo funcionalizado e não funcionalizado está relacionada com a delgada camada de material polimérico eletrossintetizada em apenas 10 ciclos de varredura. Essa ideia é consistente com a redução do valor de N encontrado para o EG/poli (3-HBA), uma vez que, N está relacionado com as irregularidades do eletrodo, normalmente, encontra-se entre 0,5 e 1 para eletrodo poroso como é o caso do grafite e próximo de 1 para superfície plana (capacitor ideal). Um valor de N próximo de 0,5 (Tabela 1) é característico de sistema controlado por processo difusional, conforme já apresentado anteriormente na discussão dos gráficos de Nyquist e Bode.

O valor da resistência à transferência de carga, R_{ct} , aumentou consideravelmente do EG para o eletrodo funcionalizado, isso também pode ser comprovado na diminuição das correntes de pico anódico e catódico do par redox Fe^{2+}/Fe^{3+} (ver Figura 43 (b)). Esse aumento da R_{ct} e diminuição do Qdl no eletrodo modificado, provavelmente, estão relacionados com a diminuição da área eletroativa do material. Nesse contexto, vale mencionar que em pH 6,7 os grupamentos carboxilas livres do filme estão desprotonados ($R-COO^-$), com

isso, a malha polimérica com carga residual negativa dificulta a transferência eletrônica (repulsão eletrostática) do par redox também negativo ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$).



Em relação à inserção do componente difusional T no circuito elétrico do eletrodo funcionalizado é mais uma prova concreta de alteração na superfície eletroativa do EG, uma vez que, o filme polimérico, no caso específico desse experimento em pH 6, 7, atrapalha a difusão dos contra-íons e do par redox na interface filme / eletrólito. A presença desse elemento difusional no circuito elétrico do filme corrobora com a ideia anterior para explicar o aumento da R_{ct} após a funcionalização do eletrodo.

O elemento difusional de Warburg (W), que representa a difusão semi-infinita das espécies nas porosidades do material, apresentou um pequeno decréscimo ao funcionalizar o grafite com o poli (3-HBA). Isso, provavelmente, está relacionado à adsorção da estrutura espacial polimérica na superfície eletroativa, redução da rugosidade do material. Com isso, percebe-se claramente a forte influência da estrutura tridimensional do filme polimérico (alteração da rugosidade) nas propriedades eletroquímicas da superfície sensora, a qual será utilizada para imobilizar biomoléculas para o desenvolvimento do biossensor.

Sendo assim, para uma melhor compreensão das propriedades desse filme (funcionalização do EG, imobilização de biomoléculas) é indispensável o conhecimento de sua estrutura molecular (disposição espacial e grupos funcionais) e eletrônica.

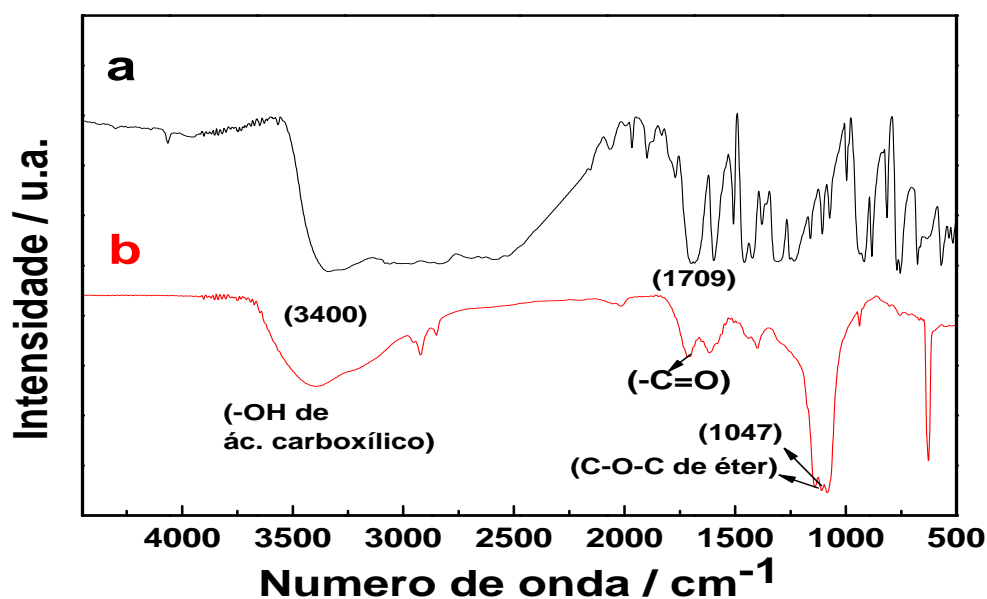
Nesse contexto, o estudo de química teórica constitui-se como uma ferramenta de fundamental importância para a melhor compreensão da estrutura molecular e eletrônica do filme. Além disso, é possível também elucidar o mecanismo de eletropolimerização do filme e ainda estudar as interações das biomoléculas, imobilizadas na superfície transdutora do EG/poli (3-HBA), com o referido polímero no desenvolvimento de um imunossensor para diagnóstico da anaplasmosse bovina.

Em virtude da evolução tecnológica na área de informática, diversos métodos computacionais são aplicados, atualmente, no estudo e planejamento de novas substâncias¹⁷⁷. Nesse contexto, a modelagem molecular do poli (3-HBA) torna-se indispensável, pois através dela pode-se ter uma descrição detalhada da estrutura molecular, das interações intermoleculares e até mesmo na inferência da reação química de polimerização do polímero que ocorre na superfície do EG.

6.2.1 Comparação entre os espectros de infravermelho experimental e teórico do poli (3-HBA)

A Figura 46 mostra os espectros de infravermelho experimentais do 3-HBA e poli (3-HBA).

Figura 46: Espectros de infravermelhos obtidos em pastilhas de KBr para: (a) 3-HBA e (b) poli(3-HBA) eletropolimerizado em pH 0,5; com 20 ciclos consecutivos em resolução de 4 cm^{-1} .



Fonte: Autor, 2015.

Devido à presença dos grupos funcionais (-OH e -COOH) na estrutura aromática do 3-HBA foi possível identificar um espectro de estrutura complexa (Figura 46a). Para o espectro de infravermelho do 3-HBA, na região de 3350 cm^{-1} , observa-se uma larga banda característica de deformação axial O-H de ácidos carboxílicos. Outra banda de relevante importância localiza-se em 1696 cm^{-1} a qual representa uma deformação axial C=O, característica de ácidos carboxílicos. Os picos conseguintes encontram-se de forma mais complexa, entretanto, na sua grande maioria, representam deformações típicas de compostos aromáticos; em 1577 e 1468 cm^{-1} são deformações axiais C=C aromáticos; em 1391 cm^{-1} ocorre uma deformação angular C-O-H típica de compostos fenólicos; em 1217 cm^{-1} também existe uma deformação axial C-O característica de compostos fenólicos, e, finalizando, por volta de 877 e 714 cm^{-1} encontramos deformações C-H angulares fora do plano características de compostos aromáticos.

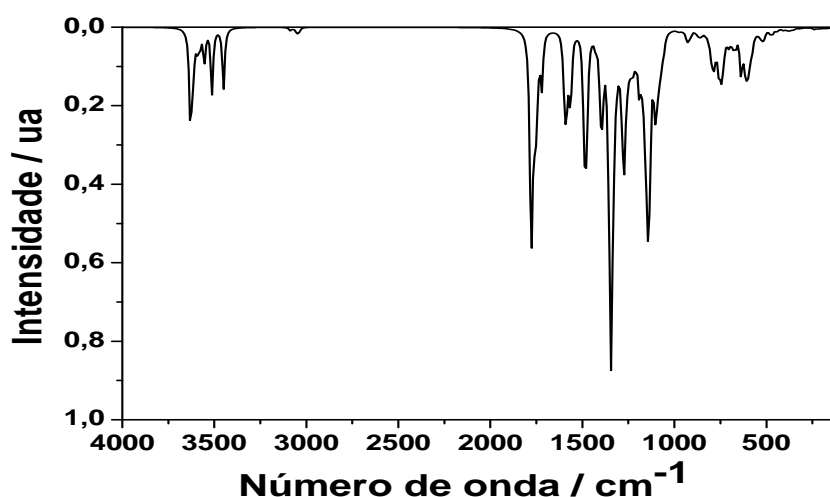
O polímero formado a partir da eletropolimerização do 3-HBA apresentou um espectro modificado (Figura 46b), considerando o espectro do monômero de partida (Figura 46a), com destaque para algumas observações. O espectro do poli (3-HBA) apresentou um menor número de picos representativos dos grupos funcionais, presentes em sua estrutura. Na região de 3400 cm^{-1} ainda está presente, mas com um perfil diferente, uma banda alargada intensa característica de deformação O-H de ácidos carboxílicos. Em 1706 e 1627 cm^{-1} ocorrem bandas atribuídas a C=O de ácidos carboxílicos com uma provável sobreposição com outras bandas. O perfil e a proximidade desses picos tornam este resultado relativamente impreciso, pois, esta região abrange outras possibilidades de deformações de grupos funcionais distintos. Assim como no 3-HBA, o espectro do poli (3-HBA) em 1399 cm^{-1} apresentou deformações axiais C=C de compostos aromáticos.

E, por fim, entre 1147 e 1066 cm^{-1} ocorreu uma deformação axial assimétrica C-O-C bastante intensa e característica de éteres. Através da análise realizada dos espectros obtidos é possível perceber uma diferença relevante quanto ao aparecimento da banda característica de éteres (C-O-C) em 1066 cm^{-1} no espectro do poli (3-HBA). Este fato permite sugerir que a polimerização está acontecendo através da hidroxila fenólica presente no anel

aromático, pois a banda O-H característica de ácidos carboxílicos se mantém preservada no espectro do polímero, descartando assim, a possibilidade da polimerização ter ocorrido através deste grupamento. O espectro vibracional do dec (3-HBA) simulado utilizando DFT é bastante similar com os dados experimentais obtidos para o poli (3- HBA).

A Figura 47 mostra o espectro de infravermelho teórico obtido pelo cálculo B3LYP/6-31G para o decâmero do 3-HBA.

Figura 47: Espectro de infravermelho teórico obtido pelo cálculo B3LYP/6-31G para o decâmero do 3-HBA. Calculado com meia largura e meia altura em 15 cm^{-1} , corrigidos com o uso de um fator de escala de 0,947.



Fonte: Autor, 2015.

No espectro teórico do decâmero 3-HBA (Figura 47) vale destacar que em 3345 cm^{-1} há uma deformação característica de OH (ácido carboxílico). Verifica-se também em 1725 cm^{-1} um pico de baixa intensidade, característico da deformação C=O de ácidos carboxílicos, além de uma deformação axial de compostos aromáticos C=C em 1350 cm^{-1} . Outra banda em destaque nesse espectro ocorre em 1075 cm^{-1} que é uma deformação axial típica de éteres.

Na comparação entre os espectros teóricos do decâmero 3-HBA (Figura 47) com o espectro experimental do poli (3-HBA) (Figura 46 b), foi necessário corrigir os picos de absorção do espectro teórico usando um fator de escala igual a 0,947 (<http://cccbdb.nist.gov/vsf.asp>). Após essa correção, os picos, de

uma forma geral, apresentaram uma boa concordância com os dados experimentais como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Alguns dos sinais de infravermelhos atribuídos ao poli (3-HBA) e ao decâmico (3-HBA).

| Número de onda/cm ⁻¹ | | Atribuição do número de onda dos espectros de infravermelho |
|---------------------------------|-------------------|---|
| poli(3-HBA) | dec(3-HBA) | |
| 3400 | 3408,70 – 3432,23 | Deformação axial O-H (ác. carboxílico) |
| 1706 | 1716,12 – 1728,66 | C=O Deformação de ácidos carboxílicos. |
| 1399 | 1397,60 – 1399,91 | C=C Deformação de aromático no plano. |
| 1047;1055; 1066 | 1048,06 -1187,73 | C-O-C Deformação axial assimétrica (característico de éter) |

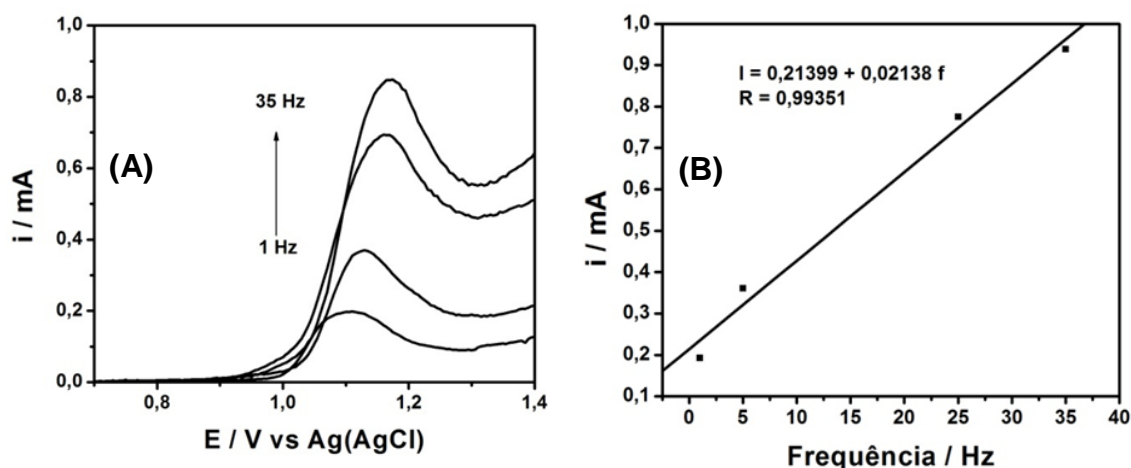
Fonte: Autor, 2015.

6.2.2 Inferência de mecanismo para a eletropolimerização do poli (3-HBA)

A proposta de uma inferência 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^{178,179,180}. Nesses sistemas costuma-se observar apenas o pico catódico ou anódico. No caso da polimerização do poli (3-HBA) a partir do 3-HBA observou-se apenas o pico anódico referente à oxidação do monômero (Figura 28), sendo assim, a VOQ constitui-se como uma técnica adequada para determinar o número de elétrons envolvido na oxidação do monômero (sistema totalmente irreversível). A Figura 48 mostra o voltamograma de onda quadrada para a oxidação do 3-HBA, na janela de potencial de + 0,8 V a + 1,2 V em diferentes frequências de aplicação de pulso.

A Figura 48 também mostra a relação linear entre as correntes de pico e as respectivas frequências aplicadas, uma vez que, essa linearidade é uma característica intrínseca de processos redoxes irreversíveis.

Figura 48: (A) Voltamograma de onda quadrada para oxidação do 3-HBA. Amplitude: 0,02 V, Incremento: 0,005 V, Frequência: 1, 5, 25 e 35 Hz, Eletrólito suporte: HClO_4 0,5 mol L^{-1} contendo 2,5 mmol L^{-1} de 3-HBA. (B) Regressão linear entre a corrente de pico e os incrementos de frequência aplicados.



Fonte: Autor, 2015.

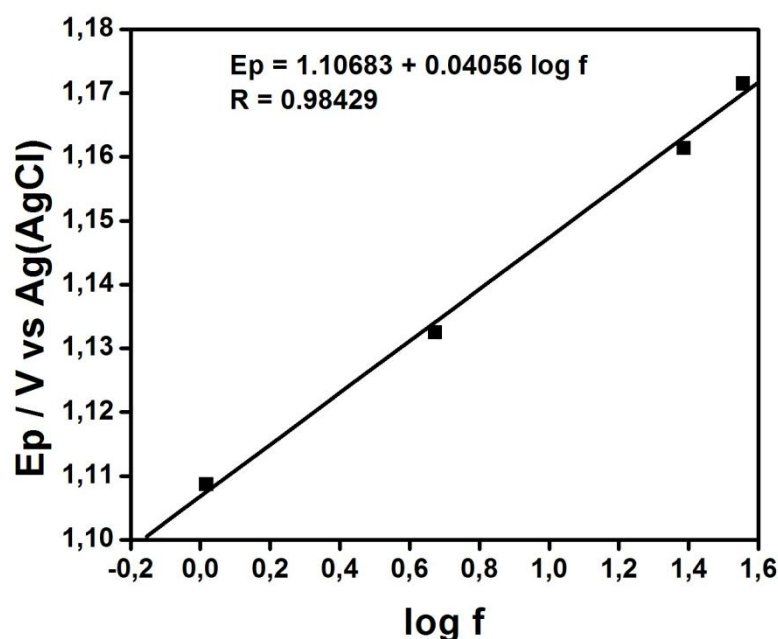
O número de elétrons envolvidos na oxidação anódica do 3-HBA foi determinado a partir da Equação 8¹⁸².

Equação 8:
$$\Delta \frac{E_p}{\log f} = \pm \frac{2,3RT}{2n\alpha F}$$

onde: E_p é o potencial de pico, f é a frequência, R é a constante dos gases ideais, T é a temperatura em kelvin, n é o número de elétrons envolvidos na oxidação do 3-HBA, α é o coeficiente de transferência eletrônica e F é a constante de Faraday^{182, 183}.

A Figura 49 mostra as relações entre E_p e $\log f$ obtidas para a oxidação do 3-HBA nas frequências de 1, 5, 25 e 35 (Figura 48).

Figura 49: Parâmetros de regressão linear da curva E_p vs. $\log f$ obtidos dos voltamogramas de onda quadrada para o 3-HBA. Amplitude: 0,02 V, Incremento: 0,005 V, Frequências: 1, 5, 25 e 35 Hz, Eletrólito suporte: HClO_4 0,5 mol L^{-1} contendo 2,5 mmol L^{-1} de 3-HBA.



Fonte: Autor, 2015.

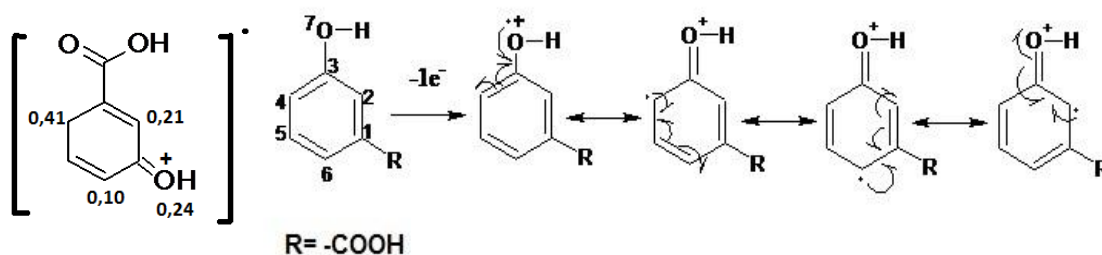
Utilizando a equação 8 para encontrar o número de elétrons do 3-HBA, vale que o quociente à esquerda da igualdade pode ser obtido a partir da tangente da reta E_p vs. $\log f$ (Figura 49) e o quociente à direita da igualdade pode ser resumido em $\pm 0,0295 / n\alpha$ para $R = 8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, $T = 298,15 \text{ K}$ e $F = 96485,3399 \text{ C mol}^{-1}$. O sinal positivo ou negativo está relacionado com a inclinação da reta (processo de oxidação é positivo e no de redução o sinal é negativo).

Substituindo os valores já citados na equação 8 encontramos um valor para n igual a 1, ou seja, o ácido 3-hidroxibenzóico perde um elétron na oxidação anódica por unidade monomérica, com um coeficiente de transferência eletrônica (α) de 0,73¹⁸¹. A perda de um elétron pelo 3-HBA gera o seu respectivo cátion radical (cr3-HBA). Vale ressaltar que esse elétron é retirado durante a oxidação da molécula do 3-HBA e não de um ponto específico da mesma.

A Figura 50 mostra a estrutura do cátion radical do 3-HBA com os valores das densidades de spin do elétron igual ou acima de 0,10. Esses

valores de densidade de spin indicam as posições que apresentam as maiores variações de carga após a retirada de um elétron, ou seja, indicam os sítios de reação, posições com as maiores probabilidades para localizar o elétron desemparelhado. No caso da densidade de spin ser igual ou próximo de zero, elétrons emparelhados, o valor da densidade de spin mais próximo de 0,5, elétron desemparelhado, constituindo um possível sítio de reação radicalar em se tratando de reações radicalares ou reações por cátions radicais como é o caso do cr3-HBA.

Figura 50: Estrutura do cr3-HBA com as densidades de spin do elétron dos átomos que apresentam valores iguais ou superiores a 0,10 e suas respectivas estruturas de ressonância.



Fonte: Autor, 2015.

Em relação aos átomos de carbono do anel aromático (Figura 50), verifica-se que apenas os carbonos de número 2 (0,21), 4 (0,10) e 6 (0,41) apresentam densidade de spin maiores ou igual a 0,10. Essas posições conforme já mencionado anteriormente constituem os possíveis sítios de reação no anel aromático. Nesse caso, vale destacar que as posições C2 e C6 apresentam impedimento estérico devido à proximidade (posição orto) com a carboxila ligada diretamente ao anel aromático, dificultando assim, a propagação da reação de eletropolimerização do 3-HBA por esses sítios reacionais. A posição C4 por sua vez não apresenta nenhum impedimento estérico constituindo assim um sítio de reação favorável à propagação da reação de eletropolimerização. Conforme já apresentado anteriormente, o espectro de infravermelho experimental (Figura 46) indicou a presença do grupo éter na estrutura do polímero (por volta de 1147 e 1066 cm^{-1} presença de uma deformação axial assimétrica C-O-C). Com isso, a inferência de

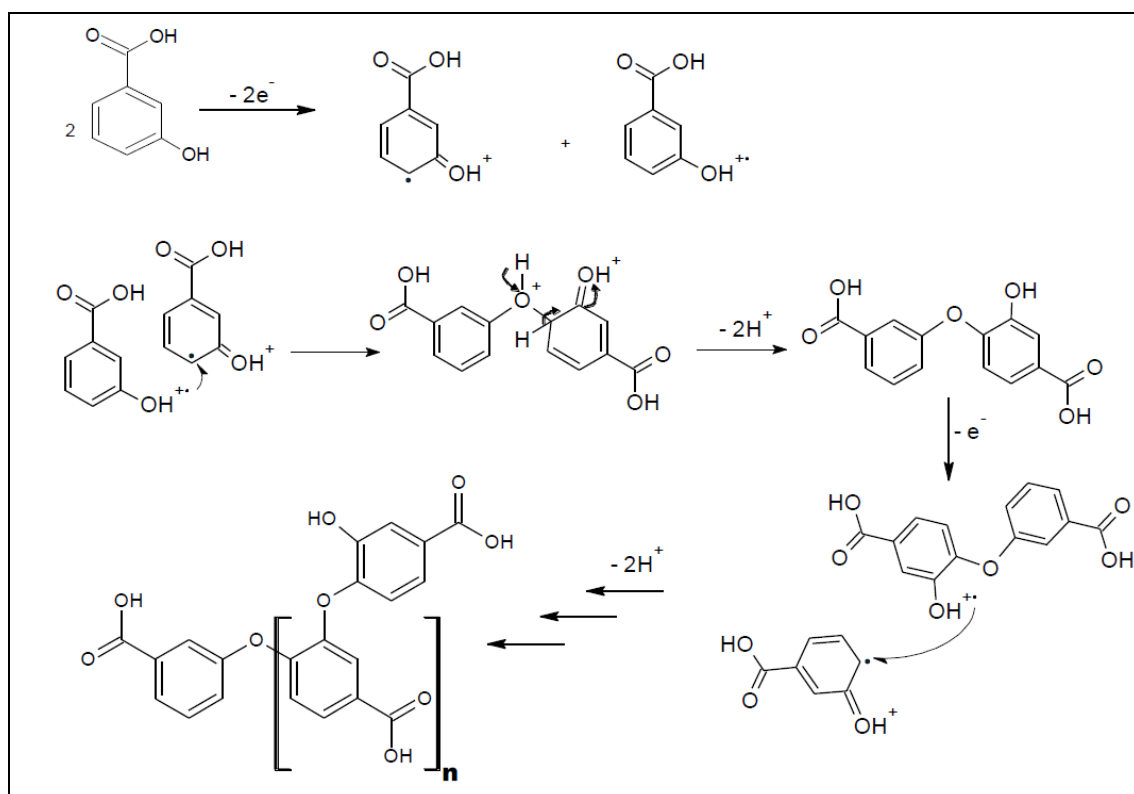
mecanismo para a reação de polimerização do 3-HBA pode ser dividida basicamente em três etapas:



- I. Oxidação dos monômeros para a formação dos cátions radicais.
- II. Acoplamento dos cátions radicais envolvendo o carbono aromático C4 e o oxigênio fenólico seguido de desprotonação para reconstituir a aromaticidade.
- III. Acoplamento entre os oligômeros reoxidados com os cátions radicais oriundos da oxidação do monômero.

A Figura 51 mostra a inferência de mecanismo para a eletropolimerização do 3-HBA até a formação do poli (3-HBA) como produto.

Figura 51: Inferência de mecanismo de polimerização para o poli (3-HBA) via C4.



Fonte: Autor, 2015.

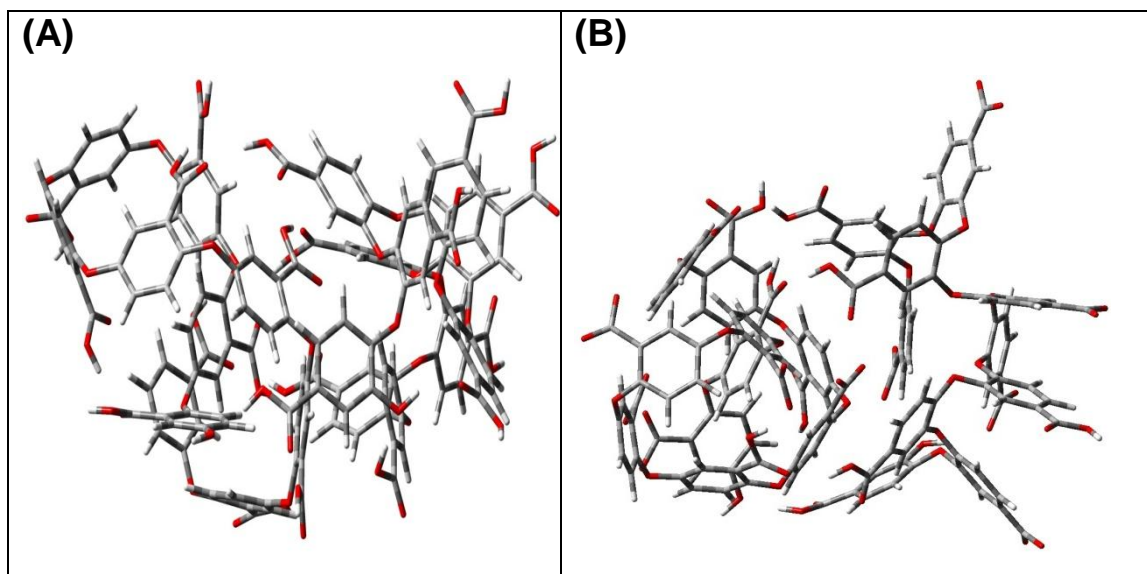
A etapa de propagação da polimerização é determinada a partir da reoxidação dos oligômeros durante os ciclos de potencial na superfície do

eletrodo de grafite. Na sequência, esses cátions radicais de oligômeros já reoxidados acoplam-se aos cátions radicais de outros monômeros presentes no meio reacional. A etapa de terminação ocorre após cessar os ciclos de potencial.

No esquema proposto (Figura 51), temos o acoplamento de cátions radicais nas posições C4 do anel aromático e oxigênio fenólico resultando em estruturas do tipo poli aril éter, com a presença de grupos carboxilas livre que poderão interagir através de ligações de hidrogênio com as biomoléculas imobilizadas na superfície transdutora funcionalizada com o poli (3-HBA).

A Figura 52 mostra uma estrutura tridimensional de mínimo de energia otimizada pela análise conformacional Monte Carlo para o bisdecâmero éter derivado do 3-HBA.

Figura 52: Estrutura de mínimo de energia do bisdecâmero éter derivado do 3-HBA, otimizada utilizando análise conformacional Monte Carlo (A) estrutura protonada; (B) estrutura parcialmente desprotonada.



Fonte: Autor, 2015.

A partir da estrutura de mínimo de energia para o bisdecâmero éter derivado do 3-HBA (Figura 52) é possível verificar uma tendência de dobramento na sua cadeia que origina uma disposição globular em sua estrutura tridimensional. Essa disposição provavelmente fica mais bem definida

com o aumento da cadeia polimérica, isso em consequência das maiores interações intermoleculares (ligações de hidrogênio entre carboxilas e carboxilatos, bem como as interações π (π) entre os anéis aromáticos) existentes em sua estrutura. Essa conformação globular para a estrutura polimérica é consistente com os dados experimentais, uma vez que, 10 ciclos de potencial de varredura (filme delgado) reduziram em mais de 75% a rugosidade do eletrodo de grafite (Figura 42 B).

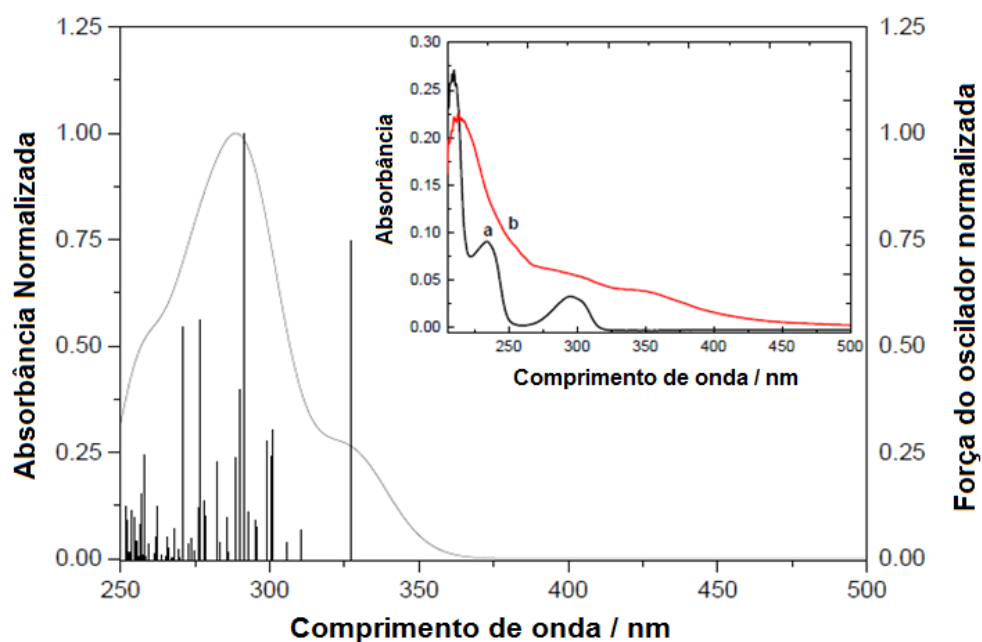
Essa disposição espacial para o poli (3-HBA) também é muito interessante para funcionalizar a superfície transdutora do EG, uma vez que, as biomoléculas ao serem imobilizadas no eletrodo funcionalizado com esse filme podem facilmente se prender na sua estrutura globular (sulcos) e ficarem retidas na superfície sensora ao invés de serem lixiviadas para a solução eletrolítica. Com isso, a sensibilidade do biossensor aumenta ao funcionalizar o eletrodo de grafite com o poli (3-HBA). Isso será discutido posteriormente nos itens 6.3 e 6.4.3, já que foram realizadas detecções (bases nitrogenadas e interações antígeno-anticorpo) com o eletrodo de grafite funcionalizado com o poli (3-HBA) e as mesmas detecções sem funcionalizar o EG.

Outro fato relevante relacionado com a imobilização de biomoléculas no eletrodo funcionalizado se deve a presença da carboxila livre na estrutura polimérica. Essas carboxilas podem estar protonadas (R-COOH) ou desprotonadas (R-COO^-). Os valores de pK_{a1} e pK_{a2} para o 3-HBA são respectivamente 4,06 e 9,92¹⁸². Com isso, o estado de protonação vai depender apenas do pH da solução em que se encontra a biomolécula a ser imobilizada. Em pH 7,0 aproximadamente 99,88% das carboxilas estão desprotonadas. Com isso, dependendo do pH do meio, esse filme pode ser utilizado na imobilização de biomoléculas que dependem de prótons (Figura 52 (A)) para melhor interação na superfície sensora do eletrodo, assim como na imobilização de biomoléculas que não dependem de prótons, como as biomoléculas com carga residual positiva que por sua vez irão interagir facilmente com o filme desprotonado (Figura (52 B)) com carga residual negativa.

6.2.3 Espectroscopia do Ultravioleta/Visível e cálculo do *band gap* do poli (3-HBA).

A Figura 53 mostra o espectro de absorção UV-vis do dec(3-HBA) em acetonitrila, simulação teórica usando o funcional DFT m06 e o conjunto de base 6-311G (d, p).

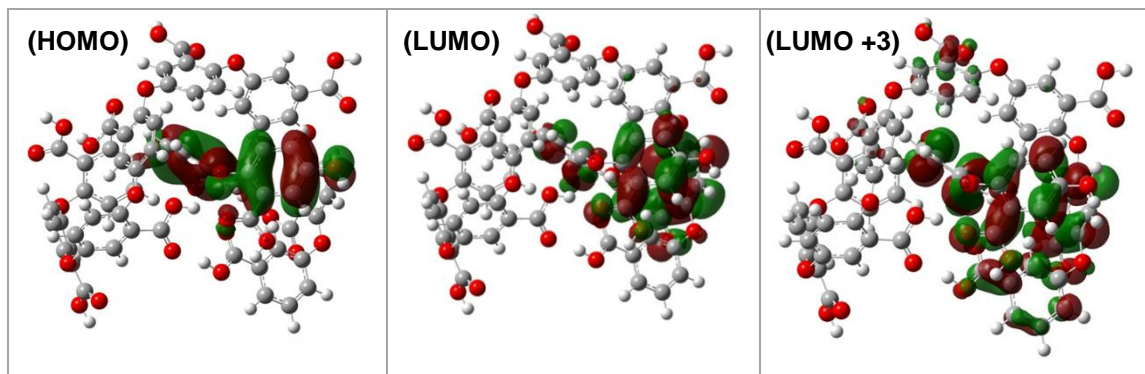
Figura 53: Espectro de absorção UV-vis do dec (3-HBA) em acetonitrila, simulação teórica usando o funcional DFT m06 e o conjunto de base 6-311G(d, p). Inserção: Espectro de absorção UV-vis experimental do (a) 3-HBA e (b) poli (3-HBA), em acetonitrila.



Fonte: Autor, 2015.

Na Figura 53 é possível identificar um máximo a 289 nm e um ombro a cerca de 330 nm que caracterizam o espectro de absorção eletrônica simulado para o dec (3- HBA) em acetonitrila. A Figura 54 mostra os orbitais moleculares do dec (3-HBA).

Figura 54: Orbitais moleculares relacionados com a transição eletrônica $S_0 \rightarrow S_1$ do dec (3-HBA).



Fonte: Autor, 2015.

A análise dos orbitais moleculares (Figura 54) sugere que o ombro está relacionado com uma transição $S_0 \rightarrow S_1$ semelhante a uma transição benzenóide π, π^* transição eletrônica (HOMO \rightarrow LUMO (83%) e HOMO \rightarrow LUMO+3 (12%)). Apesar do caráter π, π^* a força do oscilador ($f = 0,0912$) desta transição sugere que é de baixa probabilidade, devido ao arranjo espacial dos orbitais moleculares envolvidos. É possível identificar que o HOMO ficou distribuído entre dois monômeros em uma das extremidades da cadeia (Figura 54). Os orbitais moleculares relacionados aos estados virtuais que compõem a “banda de condução” estão ocupando toda a extensão da molécula. Isso é indicativo de uma eficiente transferência de carga durante a excitação eletrônica do polímero. Essa propriedade é uma característica muito desejável para os materiais semicondutores.

O espectro eletrônico do monômero (Figura 53 (a)) mostra três bandas localizadas em: 202 230 e 294nm. Essas bandas estão respectivamente correlacionadas com as transições teóricas localizadas em 203, 235 e 283 nm. Por outro lado, o espectro de absorção do poli (3 - HBA), Figura 53 b, é mais difuso, apresentando mudanças significativas no que diz respeito ao espectro do monômero, uma vez que, o espectro do poli (3-HBA) apresenta dois ombros na faixa compreendida entre 260 e 400 nm, e um máximo em aproximadamente 214 nm. Nesse mesmo espectro (Figura 53 (b)) também é possível observar que há uma cauda que se estende para comprimentos de onda menores do que 214 nm, mas isso se deve, provavelmente, a um conjunto considerável de transições eletrônicas e/ou vibracionais com a

participação dos estados eletrônicos envolvendo as interações entre soluto e solvente, dissipação não-radiativa (relaxação vibracional e a conversão interna). Há também um aumento do grau de absorção acima de 400 nm. O prolongamento do espectro de absorção até na faixa do visível se deve, provavelmente, ao aumento da extensão de conjugação da cadeia polimérica e à incorporação de estados eletrônicos e vibracionais decorrentes das interações entre o soluto e o solvente (relaxação por fluorescência).

Nesse contexto vale destacar que a deslocalização dos orbitais moleculares acima e abaixo da cadeia polimérica permitirá uma mobilidade de carga na extensão dessa cadeia. Entretanto, para um polímero conjugado, há diferenças na distância entre as ligações, uma vez que, nas duplas ligações a distância é menor em relação às ligações simples. Essa variação entre as distâncias das ligações na cadeia polimérica promove a distorção de Peierls¹⁸³.

A distorção de Peierls faz com que os orbitais ocupados π e os orbitais vazios π^* se expandam originando orbitais moleculares análogos as conhecidas bandas de condução e de valência encontradas em semicondutores, também chamadas respectivamente de LUMO e HOMO¹⁵⁴.

A energia requerida para retirar um elétron (e^-) do HOMO e levá-lo a uma distância infinita no vácuo é chamada de potencial de ionização (PI), e a energia requerida para trazer o elétron de uma distância infinita no vácuo até o LUMO é chamada de afinidade eletrônica (AE). A energia representada pelo infinito no vácuo é chamada de nível de vácuo (NV).

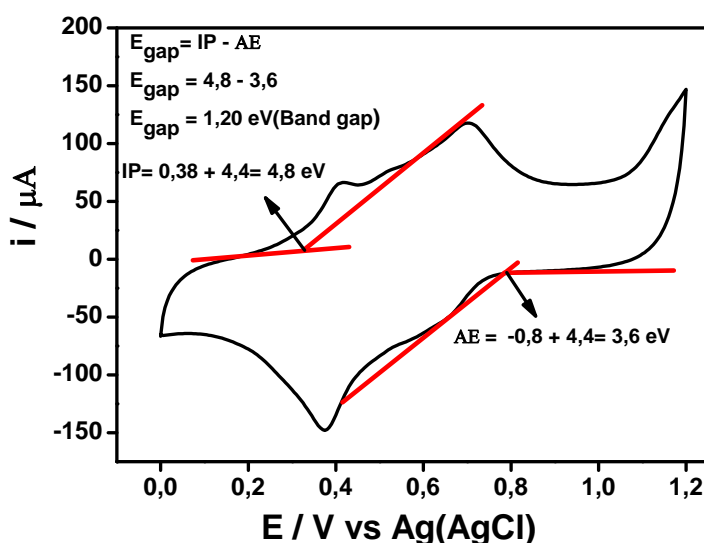
Assim, a diferença de energia entre os valores de PI e AE nada mais é que a diferença de energia entre HOMO e LUMO, denominada de energia de *band gap* (E_{gap})¹⁸⁴. Os valores de PI e AE podem ser obtidos através da aplicação da técnica de voltametria cíclica¹⁵⁵. No presente trabalho, EG/poli (3-HBA) foi imerso na solução do eletrólito suporte de polimerização (HClO_4 0,5 mol L^{-1}) para obter o VC. Através desse voltamograma, nas regiões de potenciais anódicos e catódicos, determinaram-se os potenciais de oxidação e redução do filme polimérico (Figura 55). Esses potenciais devem ser determinados no início em que ocorre o aumento da corrente na varredura direta e também no início em que ocorre o aumento da corrente na varredura inversa na forma de acúmulo de carga em função do potencial aplicado¹⁸⁵. Na verdade, esse aumento de corrente nas varreduras direta e inversa caracteriza

o acúmulo de carga positiva e negativa, respectivamente, nas malhas poliméricas.

Sendo assim, nenhuma carga é acrescentada ou retirada do polímero até que um potencial correspondente a esse nível de energia seja atingido, com isso, essa troca de carga está diretamente relacionada ao máximo da densidade de estado ocupado (HOMO) e ao mínimo da densidade de estado desocupado (LUMO) ¹⁸⁶.

Como as medidas são feitas em soluções e não no vácuo, devemos corrigir os valores encontrados para os potenciais de oxidação e redução do VC, afim de que os valores de PI e AE sejam condizentes às condições do experimento. Essa correção é feita levando-se em consideração o tipo de eletrodo de referência empregado e o tipo de solução eletrolítica utilizada como eletrólito suporte. Com isso, fica evidente, que para cada eletrodo de referência e solução eletrolítica empregados, haverá um valor para o fator de correção. No presente estudo o eletrodo de referência empregado foi o Ag (AgCl) em KCl 3 mol L⁻¹ e o eletrólito suporte foi a solução de HClO₄ 0,5 mol L⁻¹, nessas condições o valor de correção atribuído aos potenciais foi de 4,4 V¹⁵⁵.

Figura 55: Voltamograma cíclico obtido após eletropolimerização, somente em solução de ácido perclórico 0,5 mol L⁻¹, na ausência do monômero, para o eletrodo de grafite modificado com poli (3-HBA), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

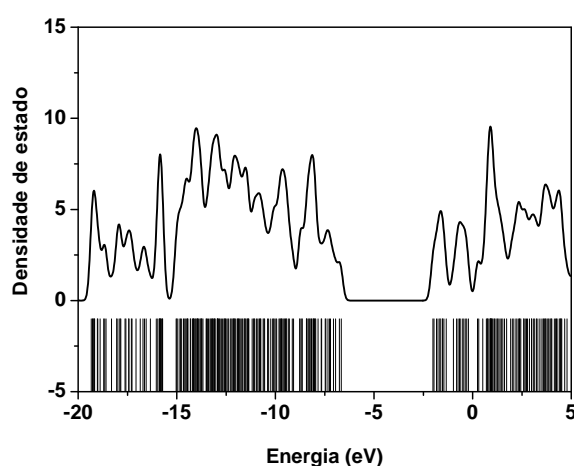


Fonte: Autor, 2015.

Uma estimativa mais rigorosa da energia relacionada com a transição $S_0 \rightarrow S_1$ foi feita usando o conjunto de bases 6-311++G (2d, 2p) e com o mesmo objetivo utilizou-se também o funcional GGA, essas tentativas resultaram em um valor próximo de 3,71 eV (cerca de 334 nm). Este valor foi considerado como sendo o intervalo de banda para o modelo em estudo. O valor experimental estimado para o poli (3 - HBA) usando voltametria cíclica foi de aproximadamente 1,20 eV (Figura 55), típico de material semiconductor (Gap < 3 eV)¹⁸⁷.

No entanto, o valor encontrado de 3, 71 eV é relativamente consistente ao considerarmos a extensão da cadeia, devido ao processo de eletropolimerização. A abertura da faixa estimada para o 3-HBA é de aproximadamente 4,39 eV. A diminuição do intervalo de banda como incremento da cadeia do polímero é estendido e sugere que o modelo proposto para a formação do poli (3 - HBA) comporta, à primeira vista, de acordo com o esperado. A análise do espectro de densidade de estados para o dec (3-HBA) (Figura 56) reforça a ideia de que o referido material apresenta características semelhantes às exigidas para materiais semicondutores.

Figura 56: Espectro de densidade de estados para o dec (3-HBA).



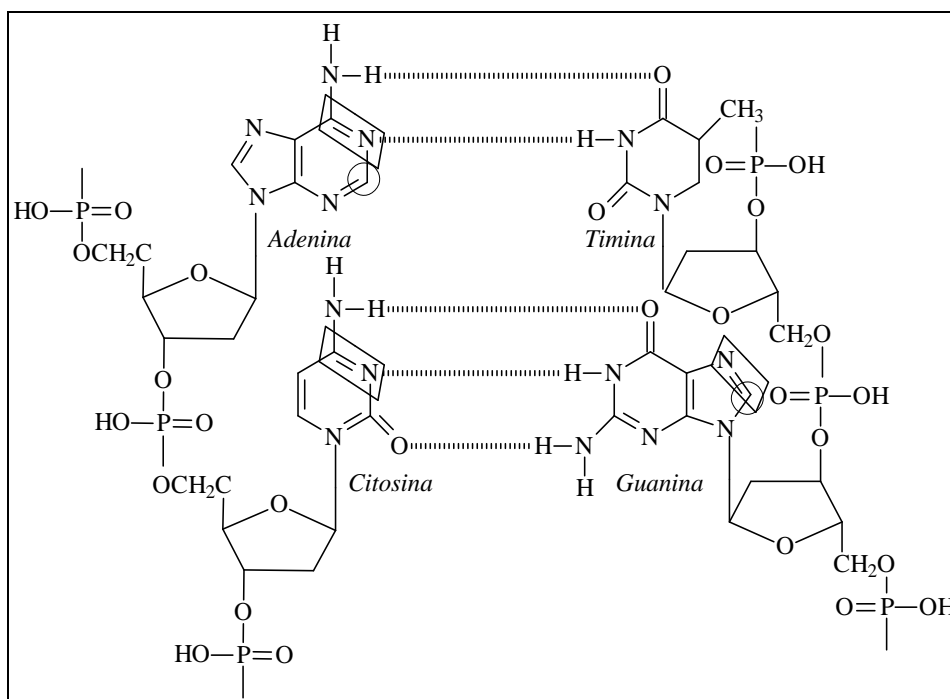
Fonte: Autor, 2015.

6.3 APLICAÇÃO DO EG/POLI (3-HBA) NA IMOBILIZAÇÃO DE BASES NITROGENADAS E OLIGONUCLEOTÍDEOS

Investigações foram conduzidas, utilizando-se o EG/poli (3-HBA) como plataforma para imobilização de oligonucleotídeo (poliGA), bem como a detecção da hibridação com o alvo complementar (poliCT). Os resultados experimentais, para verificação da viabilidade do processo de imobilização e hibridização foram obtidos por meio de voltametria de pulso diferencial através de detecção direta.

Sabe-se que 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. Os sítios de oxidação e redução para as bases nitrogenadas são mostrados na Figura 57.

Figura 57: Pareamento Watson-Crick de bases e os respectivos sítios de oxidação e redução do DNA^{188, 189}. (O) sítios de oxidação para A e G e (□) sítios de redução para A, C e G.

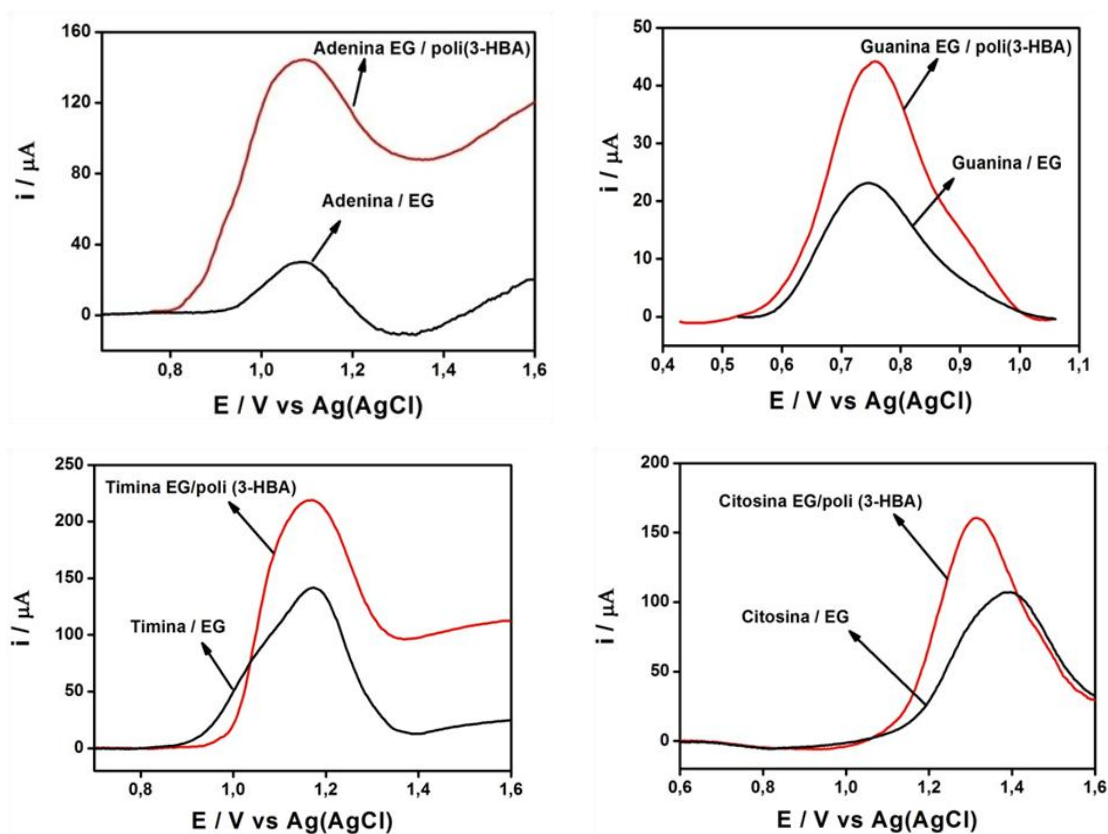


Fonte: Palecek, 1996.

Inicialmente, foi investigada a imobilização das bases nitrogenadas púricas e pirimídicas na superfície do EG sem ser funcionalizada com o poli (3-HBA) em comparação com a imobilização dessas mesmas bases, nas mesmas condições experimentais, no EG funcionalizado com o poli (3-HBA).

A Figura 58 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial que retratam esse comparativo de imobilização que foi avaliado de acordo com a resposta eletroquímica das bases (correntes de pico) em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹. Esse experimento também serviu para demonstrar a importância do filme para minimizar o processo de lixiviação das bases nitrogenadas em função das sucessivas lavagens.

Figura 58: Voltamogramas de pulso diferencial em: (—) eletrodo de grafite modificado com poli (3-HBA); (—) eletrodo de grafite não modificado contendo guanina, G, (10 mmol L⁻¹), adenina, A, (10 mmol L⁻¹), timina, T, (10 mmol L⁻¹) e citosina, C, (10 mmol L⁻¹). Eletrólito: tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,3. Condições experimentais: Amplitude: 25 mV; duração do pulso 60 ms; $v = 10$ mV s⁻¹.



Fonte: Autor, 2015.

A Figura 58 mostra que as imobilizações das bases nitrogenadas adenina, guanina, citosina e timina no eletrodo de grafite funcionalizado com o

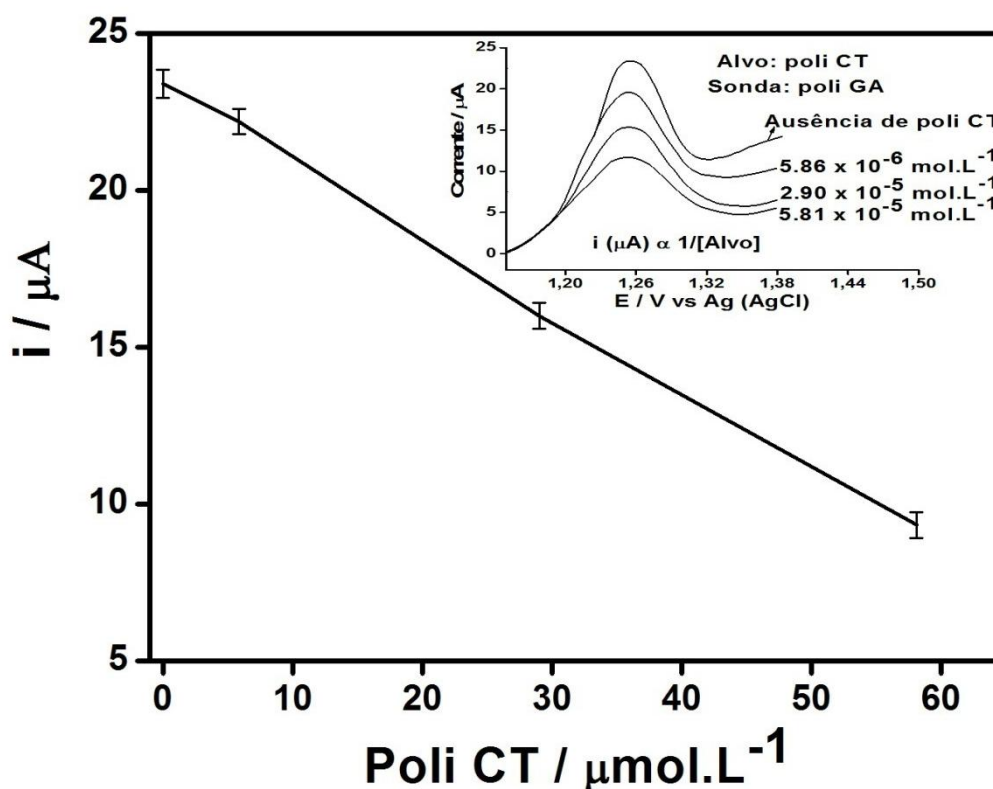
poli (3-HBA) apresentaram maiores valores de corrente de pico em relação à imobilização dessas bases no EG não funcionalizado. Esses resultados mostram claramente a eficiência do poli (3-HBA) na retenção de bases nitrogenadas na superfície transdutora do EG.

Essa propriedade do poli (3-HBA) provavelmente está relacionada à sua configuração espacial globular (Figura 52), que atua como "as malhas de uma rede" fixando as bases nitrogenadas no EG, minimizando assim a lixiviação das mesmas.

Outro fator que favorece a imobilização das bases no eletrodo funcionalizado é a presença da carboxila (ou carboxilato) livre na estrutura do filme. Esse grupo pode interagir por ligação de hidrogênio ou interação eletrostática com o grupamento (-NH-) das bases nitrogenadas. Essas interações (filme bases nitrogenadas) associadas à estrutura globular do poli (3-HBA) promovem uma interação mais efetiva no momento da imobilização o que reduz a lixiviação dessas biomoléculas durante as etapas de lavagem, justificando assim, o maior sinal de corrente encontrado nas detecções por voltametria de pulso diferencial nos eletrodos funcionalizados em relação aos eletrodos não funcionalizados.

No intuito de explorar ainda mais as potencialidades dessa plataforma com material genético, foi realizado um experimento que mostra a imobilização do oligonucleotídeo poli (GA) (5'- GGG GGG GGA AAA AAA A-3') na concentração de $6,3 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ no eletrodo funcionalizado com o poli (3-HBA)¹⁹⁰. Os experimentos de hibridação foram feitos após incubação bem como a detecção do alvo complementar (poli CT) (3'- CCC CCC CCT TTT TTT T- 5') nas concentrações de $5,86 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹, $2,90 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $5,81 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹. Nesse experimento monitorou-se o pico de oxidação da adenina, sem utilizar nenhum intercalador eletroativo, portanto, a detecção foi direta através da técnica de voltametria de pulso diferencial (Figura 59).

Figura 59: Voltametria de pulso diferencial em eletrodo de grafite modificado com poli (3-HBA), contendo 18 μL de poli (GA) a $6,3 \mu\text{mol L}^{-1}$: Ausência de Poli (CT) e após 15 minutos de incubação a 37°C , com 18 μL desse alvo nas concentrações de: $5,86 \mu\text{mol L}^{-1}$, $29 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $58,1 \mu\text{mol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 4,3. Condições experimentais: Amplitude: 25 mV; duração do pulso 60 ms; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2015.

A Figura 59 indica que a sonda poli (GA) foi eficientemente imobilizada no eletrodo de grafite funcionalizado com poli (3-HBA) em tampão acetato pH 4,3. Após a interação com alvo complementar poli (CT), não foi observado deslocamento relevante do potencial de oxidação da adenina (1,26 V). Em trabalho realizado por Oliveira-Brett e colaboradores¹⁹¹ o pico de oxidação da adenina em eletrodo de carbono vítreo foi de 1,33 V (Ag/AgCl).

Após o processo de hibridização, ocorreu uma diminuição nos valores de corrente de oxidação monitorados para a adenina, detecção direta. Essa diminuição da corrente de oxidação sugere que o sítio de oxidação dessa base ficou mais comprometido devido às interações por ligação de hidrogênio com a base complementar (timina), indicando a hibridização entre a sonda e o alvo.

complementar o que provavelmente dificultou a oxidação da mesma^{192, 193}.

Além disso, vale destacar também que a redução nos valores das correntes de pico observados após a hibridação entre poli (GA) e poli (CT), quando comparados com a fita simples de poli (GA), se deve a maior rigidez estrutural apresentada pela dupla fita de DNA¹⁹⁴, uma vez que, a menor flexibilidade conformacional da estrutura hibridizada aumenta a distância entre as bases nitrogenadas e a superfície eletroativa do EG/poli (3-HBA), com isso, tem-se um aumento da resistência o que explica a redução da corrente de pico (hibridação) em função do aumento da concentração do alvo complementar (poli CT), sem deslocamento do potencial de pico (inserto Figura 59).

A análise de regressão linear de corrente (μA) versus concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$) mostra o perfil de linearidade compreendido de $5,86 \cdot 10^{-6}$ a $5,81 \cdot 10^{-5}$ ($r > 0,99$).

Vale ressaltar que o intuito desse experimento não foi o de construir uma curva analítica de calibração, e sim para mostrar a imobilização do poli (GA) no EG/poli (3-HBA) e o processo de hibridação em função da concentração do alvo complementar (poli CT), mostrando com isso, as potencialidades dessa nova plataforma para o desenvolvimento de um genossensor.

6.4 DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSENSOR PARA DIAGNÓSTICO DA ANAPLASMOSE BOVINA UTILIZANDO EG/POLI (3-HBA) COMO SUPERFÍCIE TRANSDUTORA

A etapa da imobilização de biomoléculas sobre a superfície do eletrodo desempenha um papel importante na obtenção da sensibilidade, seletividade e estabilidade do imunossensor. Essas características são avaliadas por meio de controle químico e cobertura de superfície, garantindo, assim, a capacidade de reação, afinidade e estabilidade para a biomolécula imobilizada¹⁹⁵.

Após análise da detecção do evento de hibridação (poli (GA) / poli (CT)), realizou-se a segunda aplicação para o EG/poli (3-HBA), desta vez, com a imobilização de um antígeno sintético de membrana da *Anaplasma marginale* (Am1) para a detecção do anticorpo IgG específico da anaplasmoze bovina.

6.4.1 Imobilização da proteína de membrana da *A. marginale* na superfície sensora

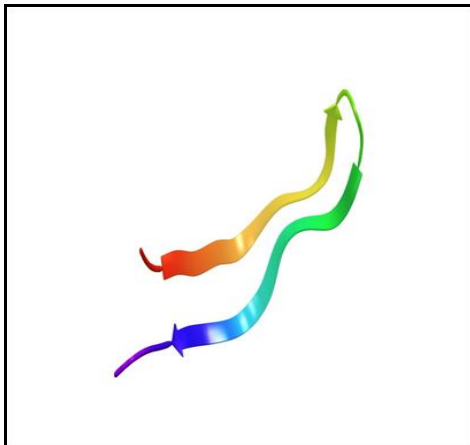
O genoma da *A. marginale* é circular com dimensões entre 1,2 e 1,6 Mpb (milhões de pares de bases). As proteínas principais de superfície (MSP - major surface protein) da *A. marginale* fornecem informações importantes principalmente sobre as sequências dos genes e anticorpos monoclonais e seus potenciais valores em ensaios de diagnósticos^{196, 197}.

Santos, P. S e colaboradores (2011)⁷⁰, usando a técnica de *Phage display* (PD) selecionaram dois peptídeos miméticos da região antigênica da MSP1 que, posteriormente, foram sintetizados e denominados de Am1 e Am2. Ambos foram submetidos a três testes comprobatórios de ELISA, 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* e os hemoprotozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e por fim o terceiro ensaio foi realizado em amostras reais de uma mistura de soros sanguíneos de animais não contaminados e contaminados por *A. marginale*. Os resultados obtidos mostraram que Am2 apresentou reação cruzada com a *Brucelose*, *B. bovis* e *B. bigemina*⁷⁰.

A proteína Am1 mostrou-se eficiente, inclusive no teste de seletividade e por esse motivo foi utilizada nas imobilizações sobre os eletrodos de grafite modificados com poli (3-HBA). Na tentativa de compreender melhor essas disparidades encontradas experimentalmente entre as proteínas de membrana da *A. marginale* foram realizados cálculos teóricos de modelagem molecular a fim de compreender melhor as estruturas das proteínas de membrana Am1 e Am2 e discutir as suas estabilidades e especificidades.

A busca por proteínas homólogas utilizando-se os softwares e servidores de modelagem comparativa mais comum (*Modeller*, *swissmodel*, entre outros) não encontrou nenhuma seqüência parecida com essas proteínas. Esse fato nos levou a uma busca pela elucidação estrutural a partir do método *web server RaptorX*¹⁵⁵. A Figura 60 representa uma estrutura estável encontrada para a proteína de membrana Am1 empregando o referido método.

Figura 60: Estrutura estável em folha-beta encontrada para a proteína de membrana Am1 através do método *web server RaptorX*. Sequência da Am1: STSSQLGGGSSTSSQLGGGSSTSSQL (S= serina, T= treonina, Q= glutamina, L= leucina G= glicina).

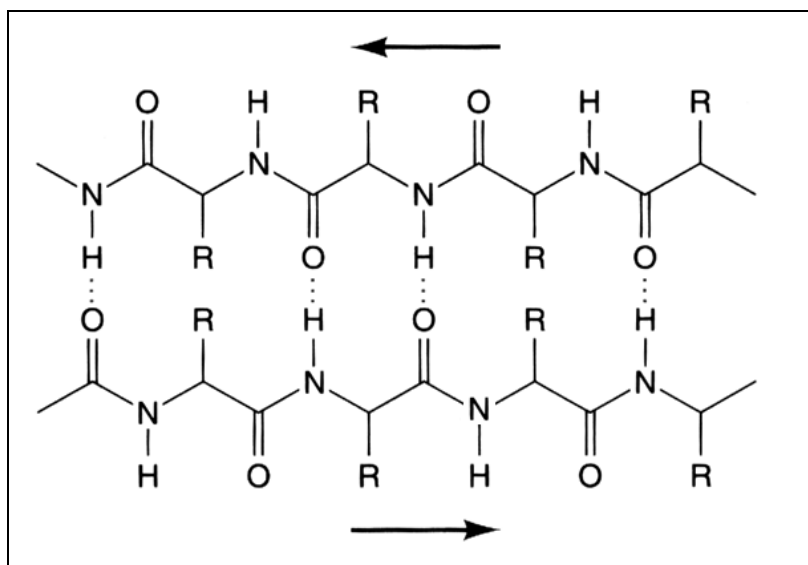


Fonte: Autor, 2015.

Esta estrutura encontrada para a Am1 é denominada de estrutura em folha-beta ou folha pregueada. Vale ressaltar que a folha-beta é um padrão estrutural encontrado em várias proteínas, nas quais regiões vizinhas da cadeia polipeptídica associam-se por meio de ligações de hidrogênio resultando em uma estrutura achatada e rígida.

Na folha pregueada essas ligações são estabelecidas entre cadeias polipeptídicas diferentes, distendidas e paralelas, ou entre segmentos distantes e distendidos de uma mesma cadeia⁹⁰. A Figura 61 mostra um diagrama geral de uma estrutura em folha-beta.

Figura 61: Diagrama geral de uma estrutura em folha-beta.



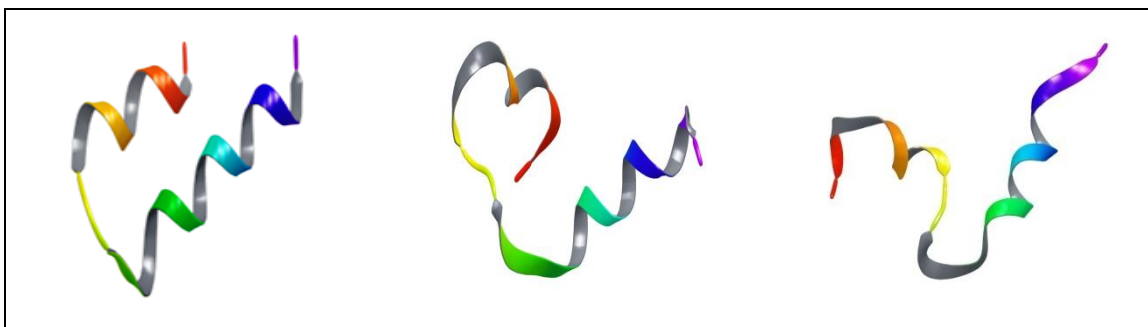
Fonte: Riaccardi; Costa; Yamanaka, 2002.

Na estrutura apresentada (Figura 61) as ligações de hidrogênio são perpendiculares ao eixo das cadeias, e os grupos R dos aminoácidos projetam-se para cima e para baixo do plano da folha pregueada, com isso, as cadeias associadas resultam em uma estrutura flexível, bastante estável.

A estrutura encontrada para a Am1 (Figura 60) se mostrou também bastante rígida após alguns passos de análise conformacional Monte Carlo (procedimento semelhante ao empregado para o bisdecâmero). Essa estabilidade estrutural da Am1 explica a eficiência dessa proteína nos testes experimentais de seletividade discutidos anteriormente, já que a interação antígeno-anticorpo é bastante específica.

A Figura 62 mostra uma estrutura em alfa-hélice que foi encontrada para a proteína de membrana Am2 empregando o método de *web server RaptorX*.

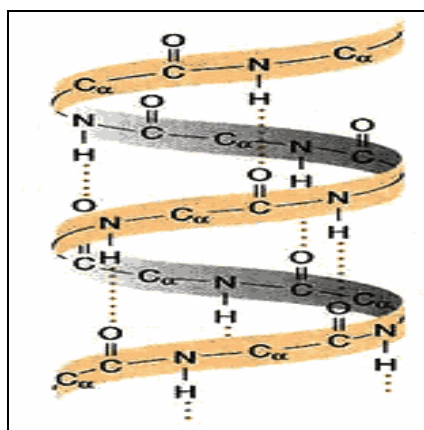
Figura 62: Mostra as três principais estruturas em alfa-hélice encontradas para a proteína de membrana Am2 através do método *web server RaptorX*. Sequência da Am2: SEASTSSQLGAGGGSSEASTSSQLGA (S= serina, E= ácido glutâmico, A= alanina, T= treonina, Q= glutamina, L= leucina, G= glicina).



Fonte: Autor, 2015.

A estrutura em Alfa-hélice ou α -hélice encontrada está presente na estrutura secundária dos níveis de organização das proteínas. Assemelha-se a uma escada em espiral. A Figura 63 mostra o diagrama geral de uma estrutura básica em α -hélice.

Figura 63: Diagrama geral de uma estrutura em alfa-hélice.



Fonte: Riaccardi; Costa; Yamanaka, 2002.

Verifica-se que nessa estrutura o esqueleto polipeptídico está estreitamente enrolado ao longo do maior eixo da molécula e as cadeias

laterais dos resíduos de aminoácido projetam-se para fora do esqueleto helicoidal.

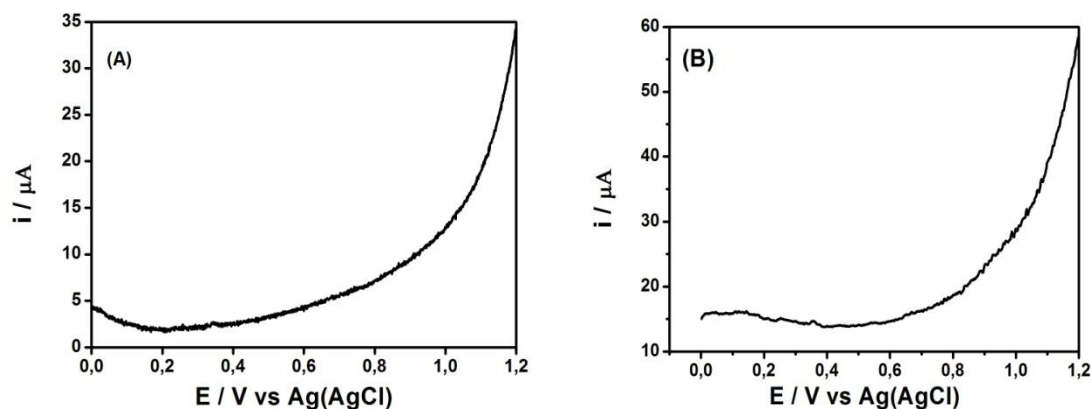
A conformação espacial se dá pela presença das ligações de hidrogênio entre os grupamentos NH e CO da cadeia principal. O grupamento CO de cada aminoácido forma ligação de hidrogênio com o grupamento NH do aminoácido que está situado a quatro unidades adiante na sequência linear, sendo que todos os grupamentos NH e CO formam ligações de hidrogênio⁹⁰.

A estrutura encontrada para a proteína de membrana Am2 (Figura 62) não se mostrou estável como a encontrada para a Am1 (Figura 60), uma vez que, foi possível encontrar três estruturas em alfa-hélice para Am2 com significativa alteração espacial, além de outras não representadas, empregando as mesmas análises conformacionais feitas para a Am1. Essa instabilidade estrutural da Am2 é indispensável para explicar as reações cruzadas encontradas entre esta proteína de membrana com o seu anticorpo específico em presença de anticorpos para *Brucelose*, *B. bovis* e *B. bigemina*, nos testes experimentais de seletividade⁷⁰.

6.4.2 Detecção direta da Am1 em EG/poli (3-HBA)

Como a Am1 apresentou uma estrutura estável e específica ao anticorpo IgG (soro de animais infectados para *A. marginale*), num primeiro momento, esta proteína foi imobilizada sobre a superfície dos eletrodos modificados com poli (3-HBA) e submetida a detecção direta por voltametria de pulso diferencial. Nesse experimento investigava, na verdade, se a referida proteína apresentava sítios eletroativos (resíduos de aminoácidos facilmente oxidáveis) em sua estrutura. A Figura 64 mostra o resultado da detecção direta da Am1 em EG/poli (3-HBA).

Figura 64: Voltamogramas de pulso diferencial do eletrodo de grafite modificado com poli (3-HBA) contendo: (A) 18 μL de Am1 ($0,055 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$), (B) 18 μL Am1 ($0,055 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) + 18 μL do soro positivo (diluição 1:50). Eletrólito: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,3. Condições experimentais: Amplitude: 25 mV; duração do pulso 60 ms; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2015.

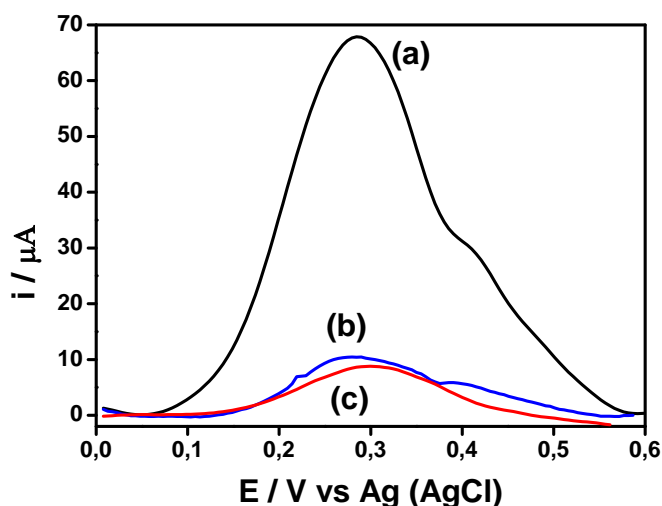
A Figura 64 mostra que não foi possível realizar a detecção direta da Am1 por voltametria de pulso diferencial em tampão fosfato (Figura 64 (A)). Com isso, podemos afirmar que os resíduos de aminoácidos (serina, treonina, glutamina, leucina e glicina) que constituem a estrutura da Am1 não são eletroativos em EG/poli (3-HBA) na faixa de potencial de 0,0 a + 1,2 V (eletropolimerização do filme), o mesmo ocorreu na detecção da Am1 com o soro positivo (Figura 64 (B)).

Segundo Enache e Oliveira-Brett¹⁹⁸ dos 20 aminoácidos presentes nas proteínas somente a tirosina, triptofano, histidina, cisteína e metionina são eletroativos em eletrodos de carbono. Isso explica a ausência de pico de corrente da Am1 em EG, uma vez que, nenhum dos aminoácidos citados anteriormente está na estrutura da referida proteína. Como a detecção direta da Am1 não foi possível na plataforma funcionalizada, os próximos experimentos retratam os resultados da detecção indireta da Am1 em presença de um intercalador eletroativo de proteína, 4-aminoantipirina (4-AAP).

6.4.3 Detecção indireta da Am1 em EG/poli (3-HBA) na presença da 4-AAP

A Figura 65 mostra o teste realizado com a 4-aminoantipirina (4-AAP), detecção indireta, para o soro positivo, branco e soro negativo.

Figura 65: Voltamogramas de pulso diferencial do eletrodo de grafite modificado com poli (3-HBA) após adição de (a) 18 μL da Am1 ($0,055 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) + 18 μL do soro positivo (diluição 1:25) + 18 μL 4-AAP a 10 mmol L^{-1} ; (b) 18 μL da Am1 ($0,055 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) + 18 μL 4-AAP a 10 mmol L^{-1} ; (c) 18 μL da Am1 ($0,055 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) + 18 μL do soro negativo (diluição 1:25) + 18 μL 4-AAP a 10 mmol L^{-1} . Eletrólito: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,3. Condições experimentais: Amplitude: 25 mV; duração do pulso 60 ms; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2015.

Percebe-se que utilizando o intercalador eletroativo 4-AAP foi possível diferenciar bem as detecções do soro positivo (Figura (65 a)) em relação às detecções para o branco (Figura 65 (b)) e soro negativo (Figura 65 (c)). Vale destacar que nesse experimento a resposta (pico de corrente) do soro negativo foi semelhante à resposta do branco. Esses valores comprovam a excelente especificidade da proteína de membrana Am1 em relação ao seu anticorpo específico (soro positivo, IgG +), já que o experimento foi realizado com

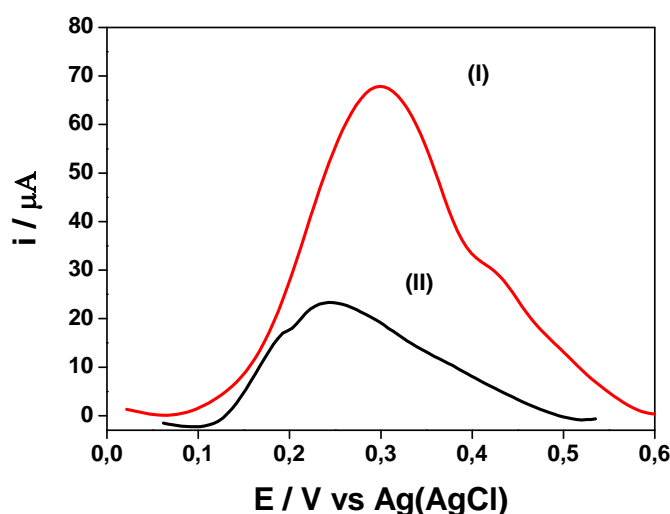
amostras reais de animais infectados com *A. marginale* (soro positivo) e amostras reais de animais não infectados com a *A. marginale* (soro negativo).

Na detecção indireta do soro positivo houve um aumento de aproximadamente 85 % da corrente de pico em relação ao branco e ao soro negativo. Vale destacar que na detecção indireta o que estamos monitorando é o pico de corrente do intercalador eletroativo e não a oxidação de sítios eletroativos existentes nas estruturas das biomoléculas em análise.

Esse aumento está relacionado com a maior quantidade do intercalador eletroativo na superfície do eletrodo, uma vez que, a Am1 está interagindo com a IgG+ (macromolécula) de animais infectados com a *A. marginale*, como a 4-AAP é um intercalador de proteínas (não específico) irá interagir tanto com a Am1 quanto com o anticorpo, isso aumentará o sinal de reposta (corrente de pico) no momento da detecção.

O mesmo não ocorre com o branco e soro negativo, pois, nesses casos, temos apenas a interação da 4-AAP com a Am1 (biomolécula com apenas 26 resíduos de aminoácidos em sua estrutura), menor retenção do intercalador na superfície do eletrodo o que leva a um menor sinal de pico de corrente do mesmo na análise por voltametria de pulso diferencial (Figura 65). A Figura 66 mostra um comparativo de detecção indireta utilizando o mesmo intercalador eletroativo para a interação entre a Am1 e o soro positivo no EG/polí (3-HBA) e no EG sem o filme.

Figura 66: Voltamogramas de pulso diferencial para: (I) eletrodo de grafite modificado com poli (3-HBA) após adição de 18 μL da Am1 ($0,055 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) + 18 μL do soro positivo (diluição 1:25) + 18 μL 4-AAP a 10 mmol L^{-1} ; (II) eletrodo de grafite não modificado com o filme após adição de 18 μL da Am1 ($0,055 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) + 18 μL do soro positivo (diluição 1:25) + 18 μL 4-AAP a 10 mmol L^{-1} . Eletrólito: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,3. Condições experimentais: Amplitude: 25 mV; duração do pulso 60 ms; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2015.

A partir da Figura 66 torna-se possível constatar que a imobilização da Am1 e a detecção do alvo (IgG+) no eletrodo de grafite funcionalizado com o poli (3-HBA) apresentaram um aumento de aproximadamente 66% no valor da corrente de pico em relação à imobilização da Am1 e detecção do referido alvo no EG não funcionalizado, nas mesmas condições experimentais.

Esses resultados justificam mais uma vez a importância em funcionalizar o eletrodo de grafite com poli (3-HBA) para a imobilização de biomoléculas, pois, propiciou um aumento da sensibilidade de detecção para bases nitrogenadas (Figura 58) e um aumento da sensibilidade de detecção do alvo complementar da Am1 (Figura 66). Essa propriedade do poli (3-HBA) em reter biomoléculas na superfície do eletrodo de trabalho, provavelmente, está relacionada com a sua configuração espacial globular (Figura 52), imobilização por oclusão, além das interações de hidrogênio facilmente estabelecidas entre os grupos funcionais (-NH) das biomoléculas com a carboxila livre existente na

malha polimérica. Essa característica do poli (3-HBA) em reduzir a lixiviação das biomoléculas na superfície transdutora é indispensável para o desenvolvimento do imunossensor, uma vez que, a etapa de imobilização desempenha um papel muito importante na otimização da sensibilidade, seletividade e estabilidade do biossensor¹⁹⁹.

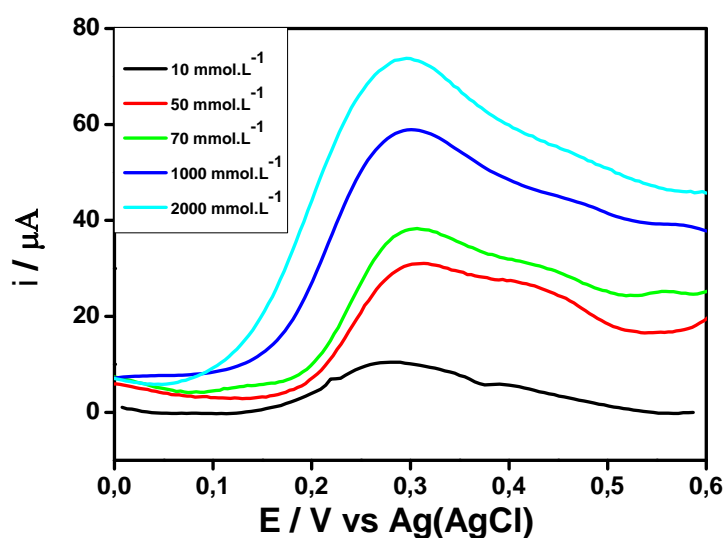
Em relação ao desenvolvimento do imunossensor para diagnóstico da anaplasmoze bovina, essa otimização pode ser entendida como um conjunto de análises que busca aprimorar uma série de condições experimentais de tal forma que o melhor resultado analítico seja alcançado no momento da interação da Am1 com o soro de um animal infectado com a *A. marginale*.

Nesse contexto, torna-se indispensável para o desenvolvimento do referido imunossensor compreender os seguintes itens: Otimização da concentração da 4-AAP, mecanismo de oxidação da 4-AAP, interação da 4-AAP com a proteína de membrana Am1, otimização do tempo de interação da Am1 com o soro positivo.

a) Otimização da concentração da 4-AAP

Conforme já apresentado no item 2.2.3 a 4-AAP é uma substância potencialmente tóxica, uma vez que, apresenta uma DL50 relativamente baixa para ratas (1,705 mg/kg). Como o intuito de utilizar a menor concentração possível da referida substância foi realizado um experimento para monitorar a corrente de pico da Am1 em função da evolução das concentrações da 4-AAP nas mesmas condições experimentais (Figura 67). Vale ressaltar que essa interação (Am1 + 4-AAP) representa o sinal do branco (ausência do alvo complementar, analito de interesse). Esse sinal do branco (média das correntes de pico) foi subtraído em todos os valores de corrente de pico analisados para as detecções da interação da Am1 com o soro positivo.

Figura 67: Voltamogramas de pulso diferencial para o eletrodo de grafite modificado com poli (3-HBA) após adição de 18 μL da Am1 ($0,055 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) + 18 μL 4-AAP (10 mmol L^{-1} , 50 mmol L^{-1} , 70 mmol L^{-1} , 1000 mmol L^{-1} , 2000 mmol L^{-1}). Em cada experimento foi realizado a lavagem em tampão fosfato para retirar o excesso do intercalador. Eletrólito: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,3. Condições experimentais: Amplitude: 25 mV ; duração do pulso 60 ms ; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.



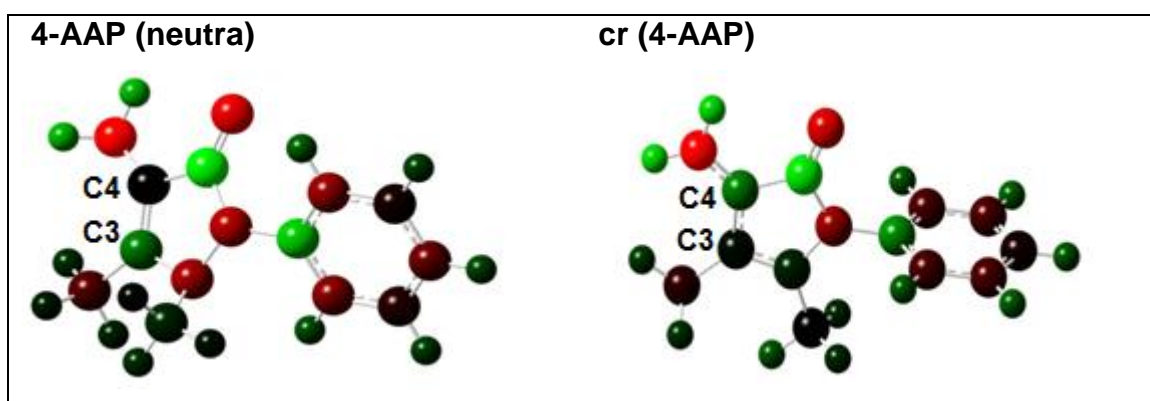
Fonte: Autor, 2015.

A Figura 67 mostra que 10 mmol L^{-1} foi a menor concentração da 4-AAP que apresentou um pico de corrente detectável, com isso, o trabalho foi realizado empregando a concentração da 4-AAP no menor nível de toxicidade possível. Os valores de corrente de pico aumentam com a evolução da concentração da 4-AAP devido ao aumento da quantidade de matéria eletroativa adicionada na superfície do EG/poli (3-HBA). A concentração de 10 mmol L^{-1} para a 4-AAP foi empregada para todos os experimentos de detecção indireta (Am1 + soro positivo) desenvolvidos neste trabalho.

b) Mecanismo de oxidação da 4-AAP

A Figura 68 mostra as variações na distribuição parcial de carga para a 4-AAP e para o seu cátion radical (forma oxidada da 4-AAP) em função da alteração da intensidade de cor dos átomos, pelo método ChelpG.

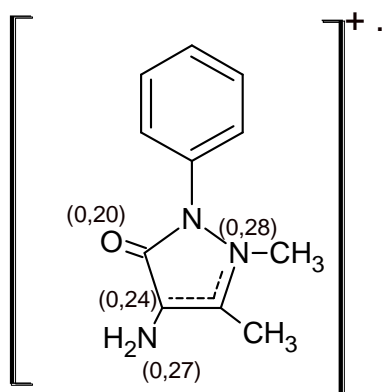
Figura 68: Distribuição parcial de carga para a 4-AAP neutra e para o cátion radical da 4-AAP (cr(4-AAP)) pelo método ChelpG. A cor vermelha refere-se a carga negativa (aumento da densidade eletrônica), a cor verde escuro refere-se a carga mais positiva (redução da densidade eletrônica) e as cores intermediárias a essas cores representam o aumento ou a diminuição da densidade eletrônica.



Fonte: Autor, 2015.

O intuito dessa análise é simplesmente qualitativo, uma vez que, os valores absolutos da distribuição parcial de carga obtidos pelo método ChelpG apresentam pouco significado físico. Com isso, se compararmos as duas estruturas percebe-se que nos carbonos da dupla ligação (C3 e C4) temos as maiores variações de intensidade de cor, essa maior variação de cor entre esses átomos está relacionada com a região de maior probabilidade de localização do sítio eletroativo da 4-AAP. Essa ideia também é fundamentada pelo fato de que a ligação dupla ficou deslocada ($-N(CH_3)$, C3 e C4) na estrutura do cr(4-AAP), estabilizada por ressonância. A Figura 69 mostra a distribuição da densidade de spin para os átomos do cr(4-AAP) com valores superiores a 0,10.

Figura 69: Mostra a distribuição da densidade de spin para os átomos do cr (4-AAP) com valores superiores a 0,10.



Fonte: Autor, 2015.

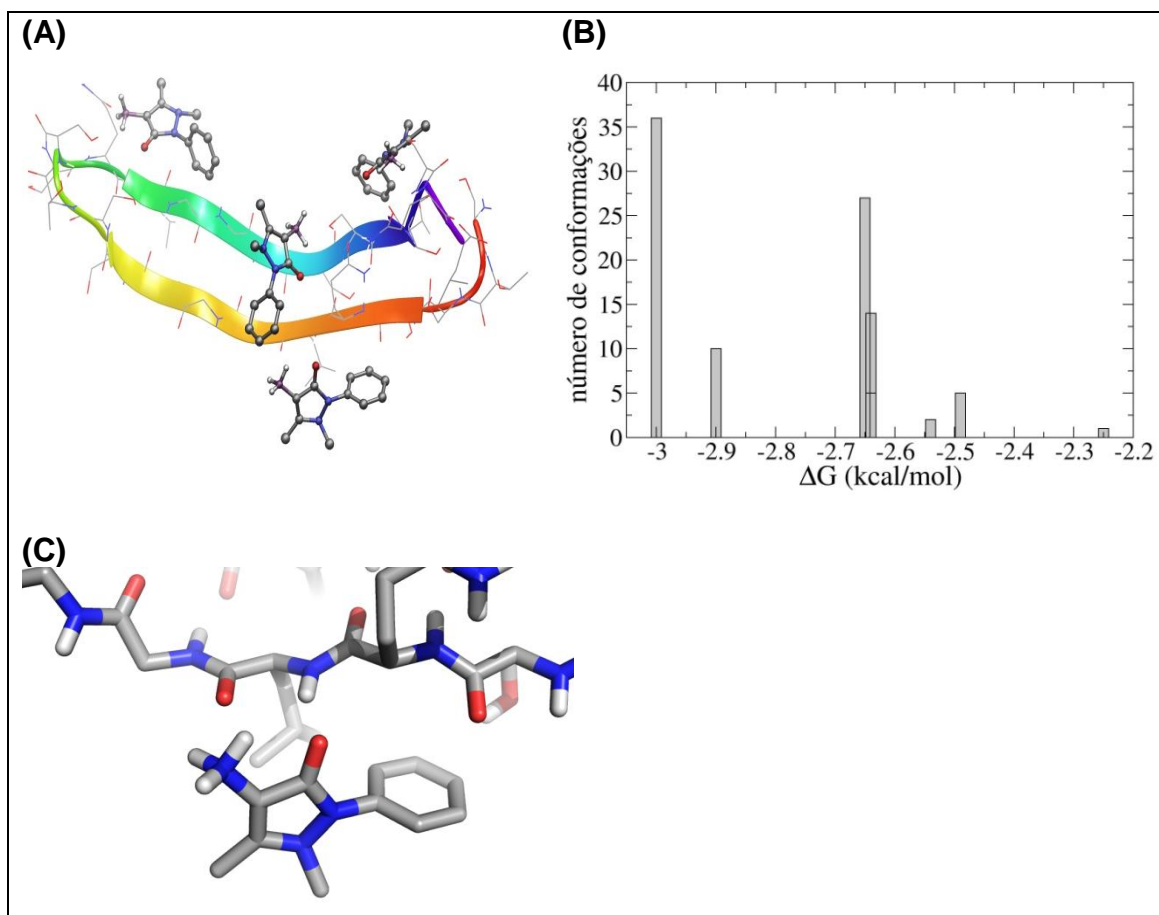
A Figura 69 mostra através dos valores da densidade de spin que o elétron desemparelhado do cr (4-AAP) não encontra-se localizado em um átomo específico, pode ser encontrado no oxigênio da carbonila (0,20), no carbono ligado ao grupo (-NH₂) (0,24), no nitrogênio ligado ao radical metil (0,28) e no nitrogênio do grupo (-NH₂) (0,27). Esses resultados estão em consonância com a variação de carga e deslocalização da ligação dupla apresentados para o cr (4-AAP) na Figura 68.

Nas detecções indiretas obtidas no desenvolvimento do imunossensor para a anaplasmoze bovina, a 4-AAP apresentou um potencial de pico anódico em aproximadamente + 0,30 V (Figura 65) e correntes de pico anódico proporcionais a quantidade do referido intercalador, que por sua vez, está correlacionado com o teor de proteínas imobilizadas na superfície do EG/poli (3-HBA).

c) Interação da 4-AAP com a proteína de membrana Am1

A Figura 70 mostra uma disposição da Am1 em folha-beta imobilizada no dec (3-HBA) e as posições mais prováveis, obtidas por atracamento molecular, de interação da 4-AAP com essas estruturas.

Figura 70: Posições mais prováveis, obtidas por atracamento molecular, de interação da 4-AAP com a proteína de membrana Am1 imobilizada no dec (3-HBA), em que: (A) posições mais prováveis (4-AAP + Am1); (B) frequência da interação/posição (nº de conformação) em função da energia livre de Gibbs; (C) interação mais provável (maior frequência (35) e menor energia livre (-3 kcal mol^{-1})).

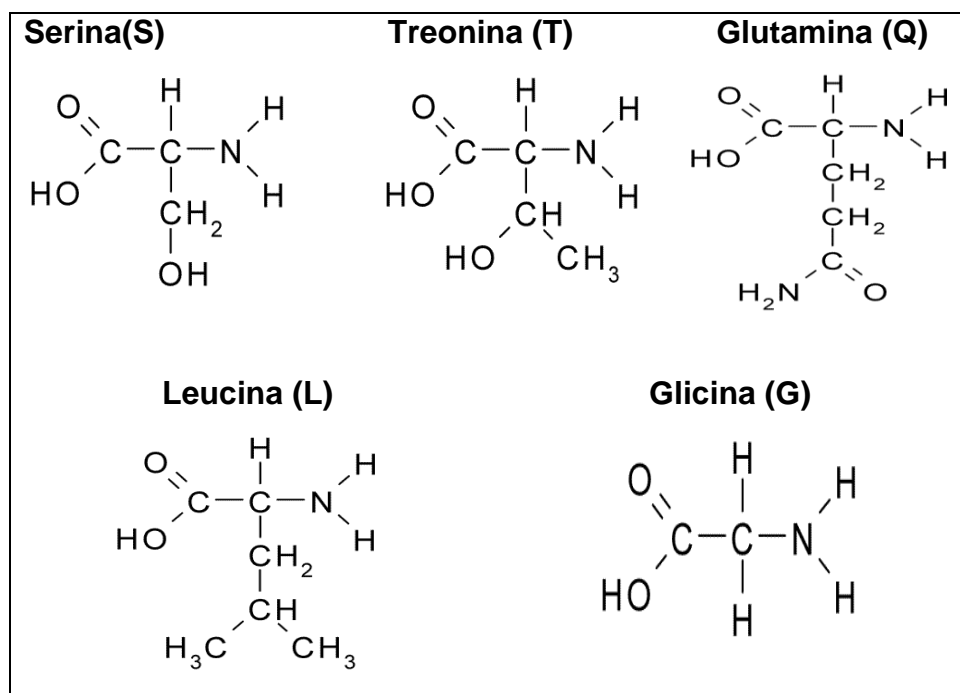


Fonte: Autor, 2015.

A partir da análise da Figura 70 (A) percebe-se que a 4-AAP não apresenta uma única posição de interação com a Am1, ou seja, interage praticamente ao longo de toda a estrutura rígida e achatada da proteína (folha-beta). Para a melhor compreensão das interações envolvendo a 4-AAP e a Am1 é indispensável conhecer a estrutura dos aminoácidos constituintes da referida proteína (Figura 71). A partir da estrutura dos aminoácidos, podemos também compreender melhor as interações entre o filme e a proteína, já que o

EG/poli (3-HBA) minimizou a lixiviação da Am1 aumentando assim o sinal da corrente de pico na detecção (Am1 + soro positivo) (Figura 66).

Figura 71: Estrutura química dos aminoácidos presentes na estrutura da Am1.



Fonte: Autor, 2015.

Conforme já apresentado no item 5.2.1 a Am1 empregada no presente trabalho consiste em uma sequência STSSQLGGGSSTSSQLGGGSSTSSQL. Esse peptídeo foi construído com 26 resíduos de aminoácidos contendo repetições da sequência motivo MSP1a (sublinhado) separados por um espaçador de 4 aminoácidos, GGGG. Com isso, verifica-se a presença de 11 resíduos do aminoácido serina na estrutura do peptídeo. Esse aminoácido apresenta em sua estrutura o grupamento (-OH) livre (Figura 71) que irá interagir por ligações de hidrogênio com a malha polimérica que por sua vez apresenta o grupamento (-COOH) livre em sua estrutura. A serina também pode interagir através de ligações de hidrogênio com a 4-AAP, já que esta última apresenta grupos (-NH₂ e -CO) livres em sua estrutura.

O mesmo raciocínio pode ser aplicado para o aminoácido treonina, o qual apresenta três resíduos na estrutura da Am1 e também apresenta o grupo (-OH) livre em sua estrutura (Figura 71). O resíduo do aminoácido glutamina

também aparece três vezes na estrutura do referido peptídeo que por sua vez contém uma amida primária livre na sua estrutura (Figura 71). Com isso, esse resíduo irá interagir facilmente através de ligações de hidrogênio tanto com o filme polimérico (imobilização) quanto com a 4-AAP.

Na estrutura da Am1 também há três resíduos do aminoácido leucina e seis resíduos do aminoácido glicina. Esses dois aminoácidos diferentemente dos outros já citados não apresentam grupos funcionais livres em suas estruturas, com isso, a principal interação desses resíduos com o filme polimérico e com o intercalador ocorre através da interação de London (dipolo instantâneo). Essa interação também ocorre nos resíduos dos aminoácidos serina, treonina e glutamina, pois esse tipo de ligação ocorre em todas as moléculas, só que nesses três aminoácidos em específico a ligação de hidrogênio deve ser a interação mais relevante (maior energia potencial de interação).

Vale destacar também que no resíduo de todos os 26 aminoácidos constituintes do peptídeo há 25 ligações peptídicas, ou seja, temos a presença do grupamento (-CONH-) que pode interagir também através de ligação de hidrogênio com o filme e com a 4-AAP. Em relação às estruturas dos aminoácidos leucina e glicina (Figura 71) a diferença é a presença do radical isobutila na estrutura da leucina, isso faz com que o resíduo deste aminoácido apresente maior polarizabilidade em relação ao resíduo de glicina, por isso, a interação de London na leucina é maior que na glicina²⁰⁰.

A Figura 70 (B) mostra a frequência da posição (número de conformação) em função da energia livre de Gibbs, nessa análise é indispensável associar a maior frequência da conformação com a menor energia de Gibbs. Sendo assim, a maior frequência associada à menor energia (-3 kcal mol^{-1}) foi 35, ou seja, para cada 100 interações entre a Am1 e a 4-AAP 35 interações ocorreriam na posição apresentada na Figura 70 (C). Essa posição corresponde a uma ligação de hidrogênio entre a 4-AAP com os átomos do grupamento (-CONH-) da ligação peptídica estabelecida entre os resíduos dos aminoácidos da serina e treonina. Conforme já discutido anteriormente, esses dois resíduos de aminoácidos também apresentam o grupo (-OH) livre em suas estruturas que poderá interagir por ligação de hidrogênio com a 4-AAP na referida posição.

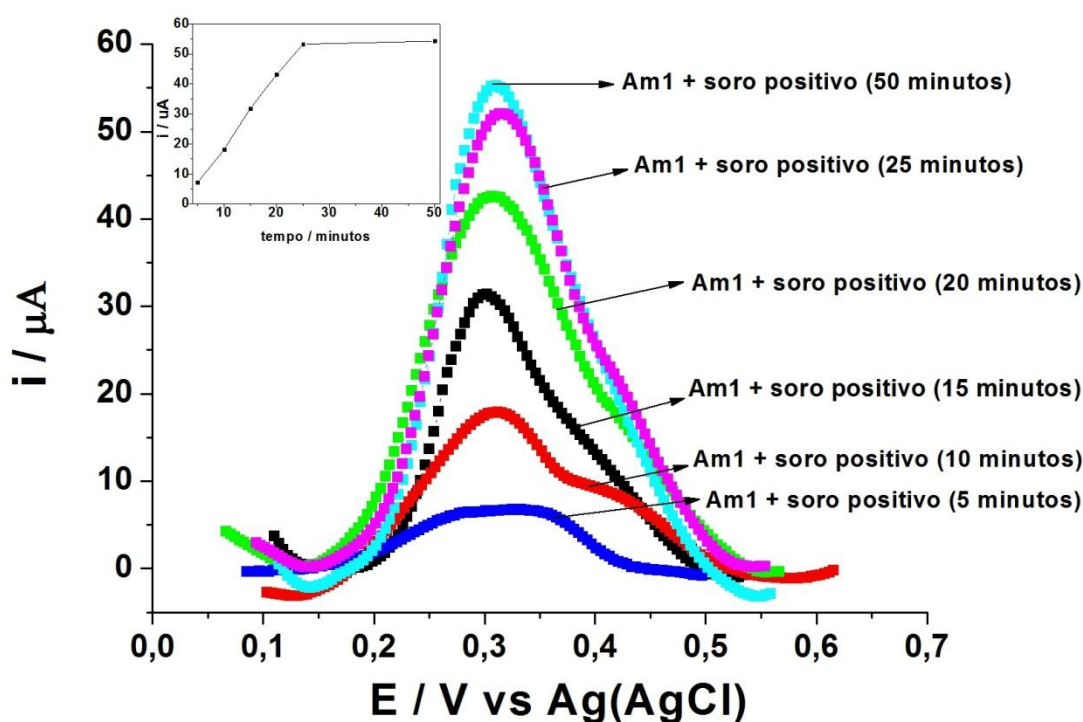
Nesse contexto é indispensável destacar além da ligação de hidrogênio outra interação importante que ocorre principalmente entre o filme polimérico e a 4-AAP que é a interação π (π), esta é consistente com as nuvens de elétrons π deslocalizados dos núcleos aromáticos existentes tanto na cadeia polimérica quanto na estrutura da 4-AAP.

As interações eletrostáticas assim como a interação íon dipolo podem ocorrer entre o filme polimérico e o peptídeo, já que este foi diluído em tampão acetato pH = 4,3. Nesse valor de pH o peptídeo apresenta carga residual positiva (PI=5,8) e como os eletrodos após eletropolimerização foram pré-condicionados por cronoamperometria (- 0,2 V por 120 s em HClO₄ 0,5 mol L⁻¹), esse aumento na densidade eletrônica do filme favorece as interações eletrostáticas com o peptídeo (positivo em pH 4,3). Conforme já discutido anteriormente, o conhecimento dessas interações que envolvem a etapa de imobilização da Am1 no eletrodo funcionalizado é imprescindível para o desenvolvimento do imunossensor, especialmente no que se refere à sensibilidade da interação entre Am1 e o seu alvo complementar (IgG+).

d) Otimização do tempo de interação da Am1 com o soro positivo

Outro aspecto importante é o tempo de contato para interação do alvo com a sonda. Tempos muito curtos não permitem a completa condição de interação e tempos muito extensos podem promover adsorções indesejadas ou até mesmo a desnaturação das proteínas da superfície do eletrodo, em tais circunstâncias é esperado um decréscimo no sinal de corrente. Um estudo de otimização do tempo de interação foi realizado, como pode ser visto na Figura 72.

Figura 72: Voltamogramas de pulso diferencial para o eletrodo de grafite modificado com poli (3-HBA) após adição de 18 μL da Am1 ($0,055 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) + 18 μL 4-AAP a 10 mmol L^{-1} + 18 μL do soro positivo (diluição 1:100) em função do tempo de interação da Am1 com o anticorpo específico (5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 25 minutos e 50 minutos). Eletrólito: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,3. Condições experimentais: Amplitude: 25 mV; duração do pulso 60 ms; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.



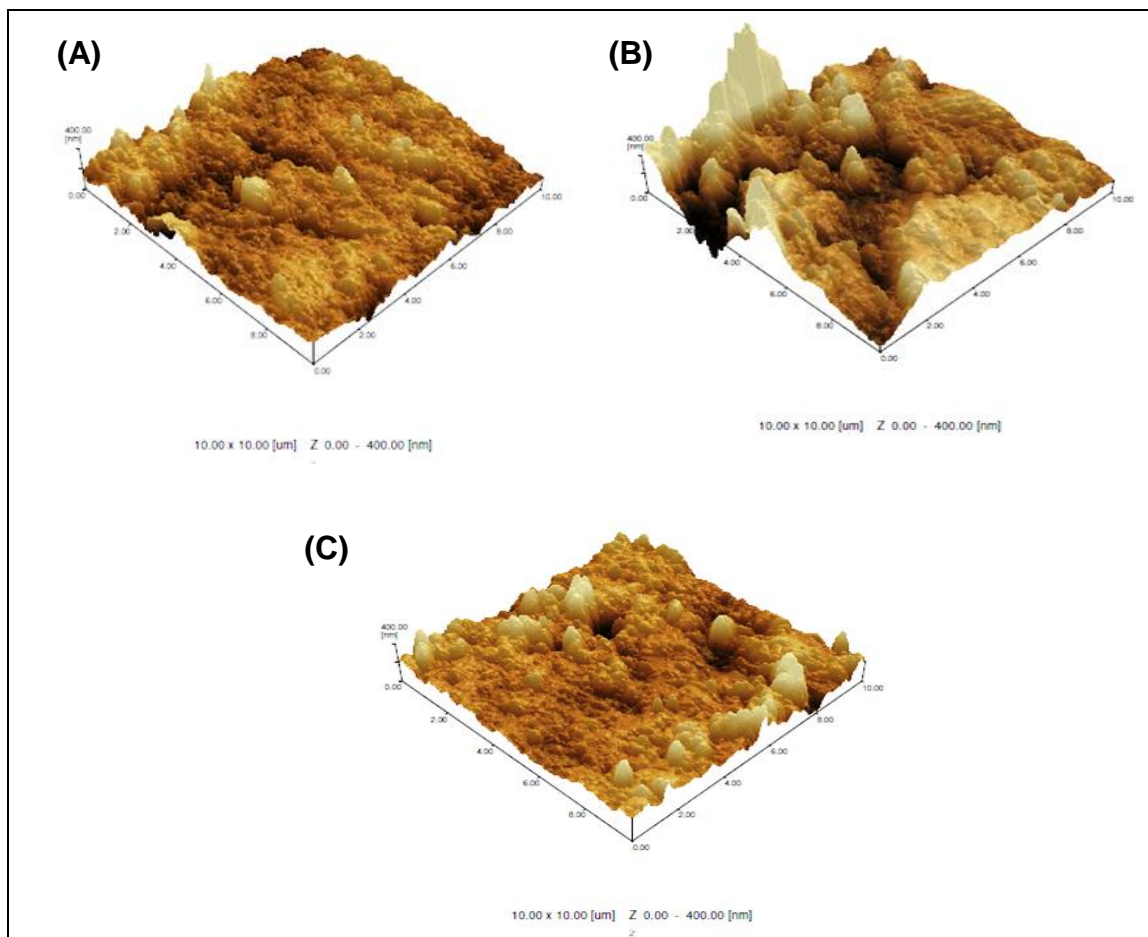
Fonte: Autor, 2015.

A Figura 72 mostra que há um acréscimo nos valores de corrente de 5 a 25 minutos de interação, na temperatura de 37°C . A partir de 25 minutos de interação as respostas de corrente aumentam em pouca escala, tendendo a uma estabilização. Assim, 25 minutos parece ser o limiar da interação entre Am1 e soro de animais infectados com a *A. marginale*. Todos os tempos de interação empregados neste trabalho foram de 25 minutos.

6.4.4 Estudo morfológico do imunossensor

A Figura 73 mostra a topografia da superfície do EG/poli (3-HBA) após adição das biomoléculas Am1, IgG+ e IgG-.

Figura 73: Mostra as imagens de microscopia de força atômica do EG/poli (3-HBA): (A) após adição de 18 μL da Am1 ($0,055 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$); (B) após adição de 18 μL da Am1 ($0,055 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) + 18 μL do soro positivo (diluição 1:25); (C) após adição de 18 μL da Am1 ($0,055 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) + 18 μL do soro negativo (diluição 1:25).



Fonte: Autor, 2015.

Conforme já discutido no item 6.1.5 os valores de rugosidade do EG foram reduzidos em aproximadamente 75 % após a eletrodeposição do filme. A Tabela 3 mostra os valores de rugosidade para o EG, EG/poli (3-HBA) e os valores de rugosidade do EG/poli (3-HBA) após adição da Am1 (Figura 73 (A)), soro positivo (Figura 73 (B)), adição soro negativo (Figura 73 (C)).

Tabela 3: Valores de rugosidade da superfície do EG antes e após a adição de biomoléculas.

| Amostras | Rq (nm) |
|--|---------------|
| EG | 98,66 ± 5,6 |
| EG / poli (3-HBA) | 24,5 ± 1,87 |
| EG + poli (3-HBA) + Am1 | 64,72 ± 2,74 |
| EG + poli (3-HBA) + Am1 + IgG ⁺ | 104,24 ± 2,08 |
| EG + poli (3-HBA) + Am1 + IgG ⁻ | 58,25 ± 2,02 |

Fonte: Autor, 2015.

Na Tabela 3 é possível verificar que a superfície do EG/poli (3-HBA) ficou mais rugosa após imobilização da Am1 e esta, por sua vez, ficou menos rugosa em relação à superfície imobilizada com o peptídeo Am1 após adição do alvo específico (IgG⁺). Percebe-se, com isso, que o sistema reconhece o alvo, e mesmo após a lavagem nota-se a retenção do mesmo baseado na modificação da superfície topográfica que alias é gradativa em termos de rugosidade, aumento de 38%. Já a superfície imobilizada com Am1 após adição do soro negativo ficou cerca de 44% menos rugosa em relação a superfície do soro positivo. Isso mostra que a Am1 não interagiu com alvo não específico (isso será mais detalhado no item 6.4.6) e que o soro negativo foi removido da superfície sensora após a lavagem.

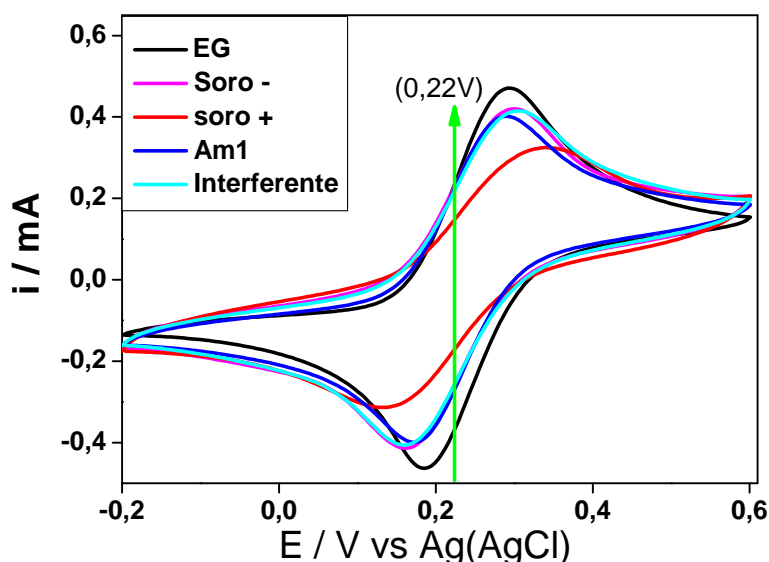
A superfície do EG após adição do soro negativo apresentou rugosidade próxima a superfície do eletrodo contendo o filme e Am1. A pequena redução observada, cerca de 10%, provavelmente, está relacionada com uma lavagem a mais em tampão fosfato para remover o excesso do soro negativo, uma vez que, esse mesmo procedimento não foi realizado no eletrodo contendo filme e Am1. Vale destacar que os valores das rugosidades dispostos na Tabela 3 estão de acordo com os aspectos visuais observados na Figura 73.

6.4.5 Estudo de espectroscopia de impedância eletroquímica aplicado ao imunossensor

Neste trabalho, conforme já apresentado no item 6.4.1 a proteína de membrana Am1 da *A. marginale* foi imobilizada sobre a superfície dos eletrodos modificados com poli (3-HBA) e realizada a detecção com o anticorpo IgG. Na verdade, foram feitos testes com os anticorpos denominados IgG+

(positivo para *A. marginale*), IgG- (negativo para *A. marginale*) e soro positivo para uma doença do gado que mais se manifesta concomitantemente com a anaplasmoze, *Brucelose*. A detecção foi realizada por EIE e VPD. A Figura 74 mostra os voltamogramas cíclicos utilizados para a determinação do potencial de equilíbrio ($E_{p/2}$) de cada sistema de biomolécula que foi estudado. Os espectros de EIE foram obtidos nos potenciais de meia onda ($E_{p/2}$) de cada sistema, medidos previamente.

Figura 74: Voltamograma cíclico do 1º ciclo de varredura obtido a 50 mV s^{-1} em solução de ferro/ferricianeto de potássio $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ contendo KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,7, para: (—) EG; (—) Soro-; (—) soro+; (—) Am1 e (—) Interferente.

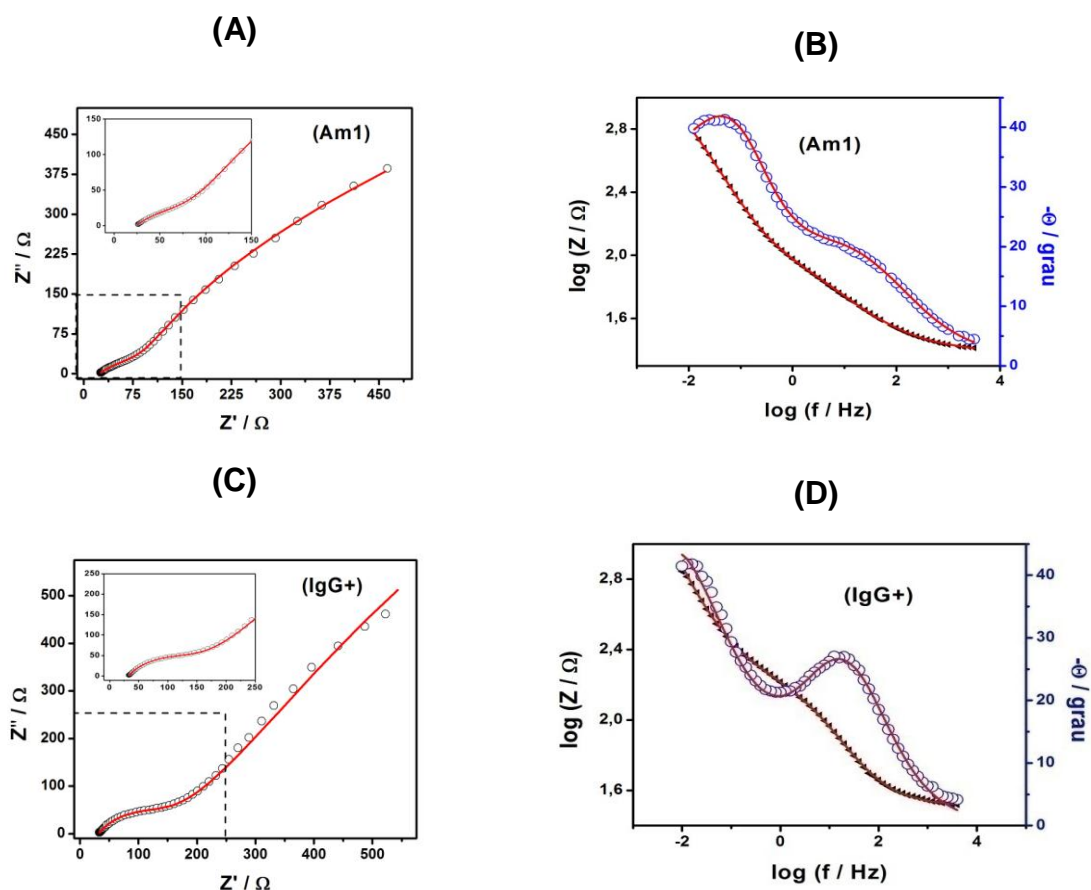


Fonte: Autor, 2015.

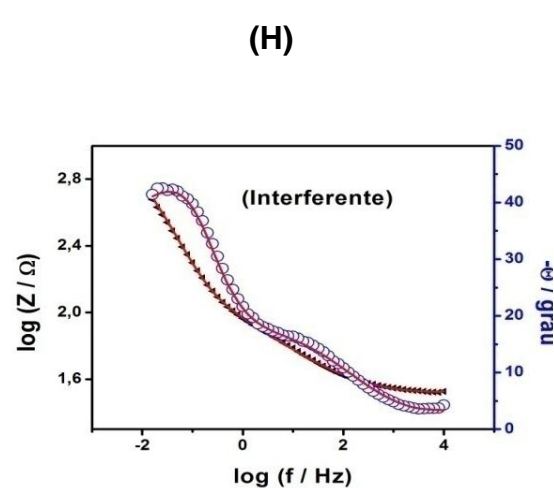
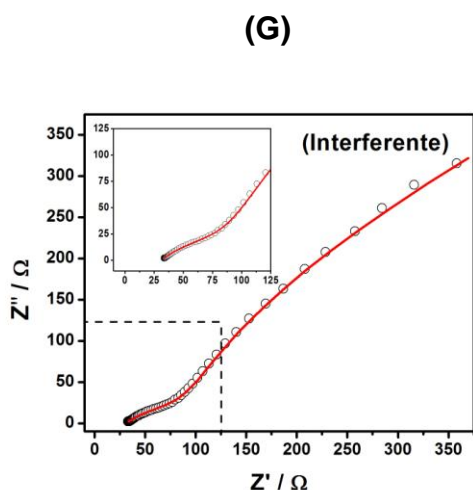
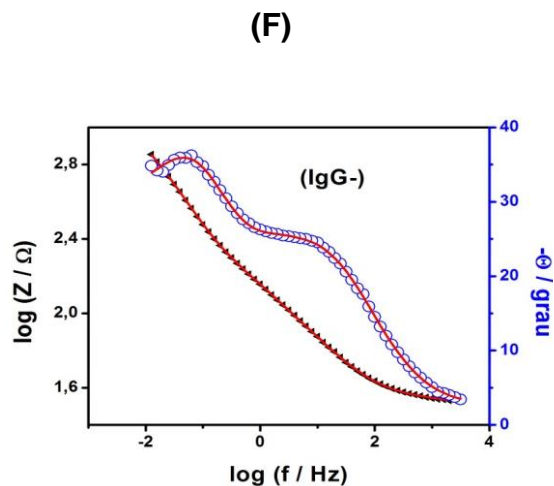
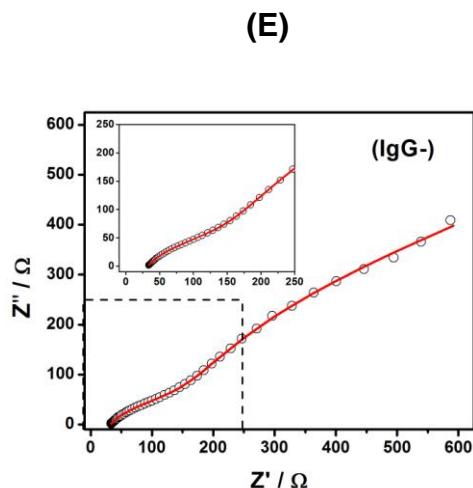
A Figura 74 mostra que os potenciais de meia onda para os eletrodos funcionalizados com o poli (3-HBA) após a imobilização e interação das biomoléculas (Am1, soro+, soro- e interferente) ocorreram por volta de 0, 22 V (seta verde, Figura 74). Conforme já descrito no item 6.1.5 os resultados de EIE foram tratados a partir da simulação do espectro de impedância com circuitos elétricos, através do software NOVA1.1 em interface com o Autolab. A Figura 75 mostra os espectros de EIE no plano complexo (diagrama de Nyquist) e os gráficos de variação do módulo de impedância e do ângulo de fase com a frequência (diagramas de bode), comparando os resultados

experimentais com os resultados simulados, para o EG/poli (3-HBA) contendo: Am1; IgG+; IgG- e soro positivo de interferente (Brucelose).

Figura 75: Diagramas de Nyquist (à esquerda) e Bode (à direita) dos espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução de $K_4[Fe(CN)_6]$ / $K_3[Fe(CN)_6]$ 5,0 mmol L⁻¹ contendo KCl 0,1 mol L⁻¹, para o EG/poli (3-HBA) contendo: Am1; IgG+; IgG- e interferente (Brucelose). Polarizados a 0,22 V; Amplitude 5 mV; Intervalo de frequência: 10⁴ a 10⁻² Hz. As linhas sólidas representam os resultados simulados a partir do circuito da Figura 77. As inserções correspondem a uma ampliação (zoom) nas regiões de alta frequência (diagrama de Nyquist).



Continuação

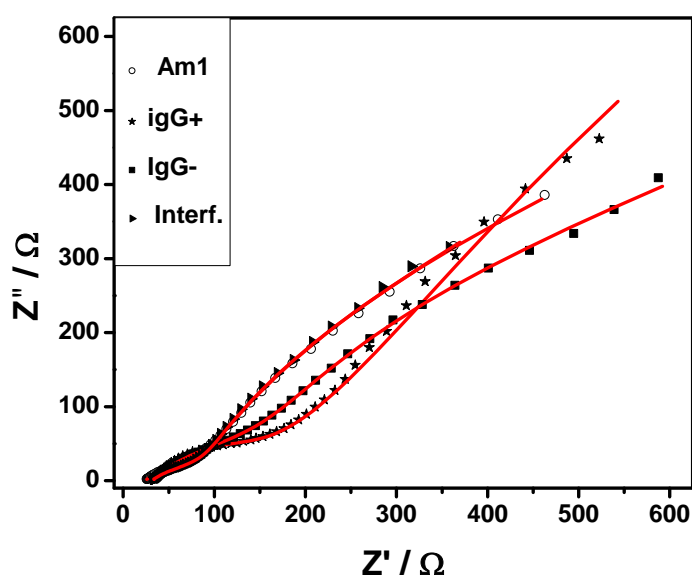


Fonte: Autor, 2015.

Conforme observado (Figura 75) todos os quatro sistemas investigados apresentaram nos diagramas de Nyquist (à esquerda) um semicírculo na região de alta frequência (relacionado ao transporte cinético do par redox). Já na região de baixa frequência não foi possível observar um semicírculo bem definido relacionado ao processo resistivo do filme polimérico e das biomoléculas imobilizadas. No diagrama de Bode (à direita) foi possível observar duas constantes de tempo para os quatro sistemas em estudo.

A Figura 76 mostra uma sobreposição dos espectros de EIE no plano complexo (diagrama de Nyquist) para o EG/polí (3-HBA) contendo: Am1; IgG+; IgG- e interferente (Brucelose).

Figura 76: Sobreposição dos diagramas de Nyquist dos espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução de $K_4[Fe(CN)_6]$ / $K_3[Fe(CN)_6]$ 5,0 mmol L⁻¹ contendo KCl 0,1 mol L⁻¹, para o EG/polí (3-HBA) contendo: Am1; IgG+; IgG- e interferente (Brucelose). Polarizados a 0,22 V; Amplitude 5 mV; Intervalo de frequência: 10⁴ a 10⁻² Hz. As linhas sólidas representam os resultados simulados a partir do circuito da Figura 77.



Fonte: Autor, 2015.

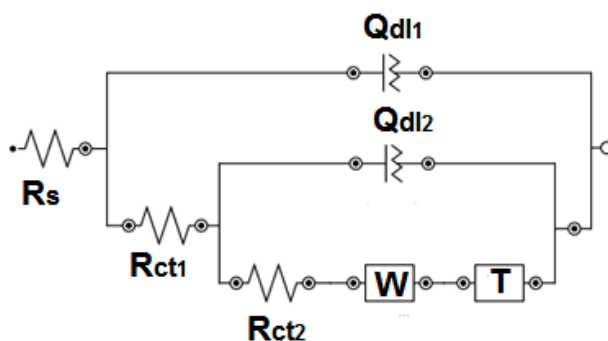
Na Figura 76 essa sobreposição dos espectros de EIE no plano complexo é indispensável para verificar um deslocamento para regiões de maior impedância do EG/polí (3-HBA) após detecção da IgG+ em região de altas frequências. Neste caso há um predomínio do controle cinético com semicírculo devido aos componentes resistivo e capacitivo relacionados a efeitos de interface: biomoléculas (Am1 + IgG+) / eletrólito, biomoléculas / eletrodo funcionalizado.

Através dessa sobreposição também é possível observar uma grande semelhança entre o espectro do EG/polí (3-HBA) contendo somente Am1 imobilizada com o espectro do EG/polí (3-HBA) contendo Am1 imobilizada

seguida da adição de soro positivo de Brucelose (interferente). Essa observação foi muito importante para confirmar a especificidade do imunossensor, uma vez que, após adicionar o soro positivo de um importante interferente (Brucelose) sobre o EG/poli (3-HBA) imobilizado com Am1 e esperar o tempo de interação (25 minutos), seguido de lavagem (tampão fosfato, pH 7,3), o resultado foi idêntico ao EG/poli (3-HBA) imobilizado com Am1 (branco), ou seja, a lavagem foi eficiente para remover praticamente toda IgG+ para Brucelose da superfície do eletrodo imobilizado com Am1, por isso, o espectro do interferente por EIE ficou semelhante ao espectro do branco. Essa ideia também será confirmada no item 6.4.6 (análise dos interferentes) por VPD.

Devido à maior complexidade das interfaces inerentes a esses quatro sistemas em estudo, um novo circuito elétrico foi montado para a simulação dos resultados experimentais, constituído de combinações em série e paralelo de resistências, elementos de fase constante, impedância de Warburg e impedância transmissiva, conforme mostrado na Figura 77.

Figura 77: Circuito elétrico equivalente proposto para os resultados de EIE para: EG/poli (3-HBA) com as seguintes imobilizações: Am1; interação da Am1 com soro positivo; interação da Am1 com soro negativo e interação da Am1 com soro positivo de Brucelose (interferente).



Fonte: Autor, 2015.

Devido às complexas conformações espaciais oriundas das interações das biomoléculas (Am1, IgG+, IgG- e interferente) com o filme e com o EG, o teremos, provavelmente, espectros com características semelhantes aos espectros de eletrodos tridimensionais²⁰¹, em que os efeitos de queda ôhmica e

baixa penetração de corrente são frequentes em virtude dos diferentes ambientes eletroquímicos formados no interior e no exterior do eletrodo.

No circuito elétrico apresentado na Figura 77 o primeiro conjunto (R_s Q_{dl1}) descreve a resposta da área superficial externa na interface biomoléculas / meio eletrolítico, enquanto que o segundo $R_{ct1}(Q_{dl2}[R_{ct2}, W, T])$ descreve a resposta da área superficial mais interna na interface polímero e/ou Am1 / EG.

Esse circuito apresentou valor de χ^2 na ordem de 10^{-3} , mostrando-se apropriado para apoiar e caracterizar os resultados experimentais. A Tabela 4 mostra os valores obtidos para cada parâmetro investigado. Vale ressaltar que estes não foram normalizados pela área dos eletrodos. Desta maneira, os valores de resistência diminuem com o aumento da área eletroativa do eletrodo enquanto que os valores de Q_{dl} aumentam com o aumento da área eletroativa.

Tabela 4: Parâmetros elétricos para EG/poli (3-HBA) com as seguintes imobilizações: Am1; interação da Am1 com soro positivo; interação da Am1 com soro negativo e interação da Am1 com soro positivo de Brucelose (interferente), polarizados a 0,22 V obtidos em solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mmol L⁻¹ contendo KCl 0,1 mol L⁻¹. Ajuste (Figura 77).

| | $\chi^2 / 10^{-3}$ | R_s (Ω) | Q_{dl1} | | R_{ct1} (Ω) | Q_{dl2} | | R_{ct2} (Ω) | T | | W ($\Omega^{-1}s$) |
|---------------------|--------------------|-----------------------|--------------------------------|-------|---------------------------|--------------------------------|-------|---------------------------|-----------------------------|------------------|---------------------------|
| | | | Y_0 ($\Omega^{-1}.s^n$) | N_1 | | Y_0 ($\Omega^{-1}.s^n$) | N_2 | | Y_0 ($\Omega^{-1}s$) | B (s^n) | |
| Am1 | 2,10 | 25 | $2,83.10^{-3}$ | 0,30 | 45,52 | $1,47.10^{-6}$ | 0,55 | 133 | 71.10^{-3} | 0,07 | $6,42.10^{-3}$ |
| IgG + | 19 | 29 | $6,48.10^{-3}$ | 0,53 | 64,70 | 294.10^{-6} | 0,58 | 429 | 196.10^{-3} | 0,40 | $12,34.10^{-3}$ |
| IgG - | 1,30 | 27 | $2,47.10^{-3}$ | 0,31 | 47,30 | $4,3.10^{-6}$ | 0,61 | 172 | 68.10^{-3} | 0,04 | $5,84.10^{-3}$ |
| Interferente | 4,40 | 26 | $2,85.10^{-3}$ | 0,34 | 49,21 | $2,4.10^{-6}$ | 0,60 | 130 | 69.10^{-3} | 0,02 | $7,63.10^{-3}$ |

Fonte: Autor, 2015.

Os valores apresentados na Tabela 4 são condizentes com o circuito descrito (Figura 77), uma vez que, os valores de chi-quadrado (χ^2) estão dentro dos limites estatísticos aceitáveis para esse tipo de análise²⁰². Conforme já citado no item 6.1.5 R_s representa a resistência ôhmica total à solução. Em

relação aos quatro sistemas analisados os valores de R_s ficaram praticamente constantes, uma vez que, todas as análises foram realizadas utilizando as mesmas espécies eletrolíticas nas mesmas concentrações (ferro/ferri 5 mmol.L^{-1} contendo KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e na mesma temperatura (condições ambiente), com isso, a resistência da solução não sofreu variação significativa.

Em relação ao elemento de fase constante (Q_{dl1}) que representa o acúmulo de carga na interface externa; biomolécula / meio eletrolítico observou-se que os valores para os quatro sistemas ficaram bem próximos, apenas o sistema contendo IgG+ apresentou um pequeno aumento (cerca de 20% em relação ao valor médio), mais como o valor de Q_{dl} depende da área eletroativa do material, esse aumento é explicado pelo fato da IgG+ ser uma macromolécula (imunoglobulina presente no plasma de bovinos infectados com a *A. marginale*) estar presente na superfície externa do complexo (EG/filme/Am1/IgG+) aumentando assim área de troca com os contra-íons existentes na solução. Já os valores do Q_{dl2} que representam o acúmulo de carga na superfície mais interna dos sistemas em estudo, foram substancialmente menores em relação aos valores do Q_{dl1} , isso é compreendido levando-se em consideração que as biomoléculas deixam as superfícies internas mais compactas, ou seja, como se elas bloqueassem os poros efetivos do grafite para a entrada e saída de íons na interface mais interna, com isso, temos uma redução da área ativa do material o que reduz o acúmulo de carga ($Q_{dl2} < Q_{dl1}$).

Essa ideia é confirmada ao constataremos que o oposto ocorre em relação à resistência à transferência de carga, pois, os valores de R_{ct1} (superfície mais externa, menos compacta) são menores que os valores de R_{ct2} (superfície mais interna, mais bloqueada pelas biomoléculas). Com isso, verificamos que a redução da área eletroativa aumenta a resistência à transferência de carga ($R_{ct2} > R_{ct1}$) e diminui o acúmulo de carga (entrada dos contra-íons). Vale ressaltar a consonância dos resultados encontrados para o soro positivo, maior resistência à transferência de carga (R_{ct}) na Tabela 4 e menor corrente de pico na Figura 74, uma vez que, a R_{ct} é inversamente proporcional a corrente de pico.

Em relação aos valores de N , percebe-se que para os quatro sistemas os valores de N_2 (camada mais interna) são maiores que os valores de N_1 (camada mais externa). Isso pode ser explicado a partir dos gráficos de Bode (Figura 75), já que a primeira constante de tempo apresenta menor ângulo de fase e maior frequência (camada mais externa, N_1), enquanto que a segunda constante de tempo apresenta maior ângulo de fase e menor frequência (camada mais interna, N_2). Sabe-se que quando mais próximo de 90° for o ângulo de fase, em menor frequência, maior será o valor de N (capacitor puro, $N=1$). Devido à camada interna estar mais próxima da superfície do eletrodo o comportamento de Q_{dl2} é mais próximo ao de um capacitor ideal ($N_2 > N_1$). Vale ressaltar que nesse tipo de análise os valores de N não podem ser avaliados apenas em função da rugosidade direta da superfície, pois, é indispensável compreender também a disposição espacial das estruturas em função das complexas imobilizações e interação das biomoléculas, que interferem diretamente nas propriedades eletroquímicas de cada sistema.

Vale destacar que nos gráficos de Bode os valores dos ângulos de fase, em baixa frequência, estão próximos de 45° , característico de sistema controlado por processo difusional, comparando os quatro sistemas, o que apresenta valor de N mais próximo de 0,5 (IgG+) é o que apresenta maior comportamento difusional, por isso, o referido sistema apresentou maior impedância de Warburg (controlado por difusão semi-infinita).

Em relação aos valores do componente difusional T , percebe-se claramente que a interação das biomoléculas, em especial no sistema contendo a IgG+, atrapalha a difusão dos íons na interface mais externa do sistema. O maior valor observado foi para o sistema contendo o soro positivo, a interação da Am1(antígeno) com a IgG+ é a que mais atrapalha o processo difusional.

Conforme apresentado na equação 6 no item 6.1.5 os valores de B no circuito elétrico estão relacionados com a espessura do filme e com o coeficiente de difusão das espécies no meio. No presente estudo, todas as funcionalizações do EG foram feitas com 10 ciclos de potencial (carga constante, Figura 32 do item 6.1.1), com isso, como o filme ficou bastante delgado em todos os eletrodos, o coeficiente de difusão é o parâmetro mais relevante na determinação de B (susceptância do meio, $B = L / D^{1/2}$). Sendo

assim, percebe-se que os valores simulados estão bem coerentes, já que o maior valor de B foi encontrado no sistema da IgG+, maior bloqueio de superfície e consequentemente menor difusão das espécies até as camadas mais internas.

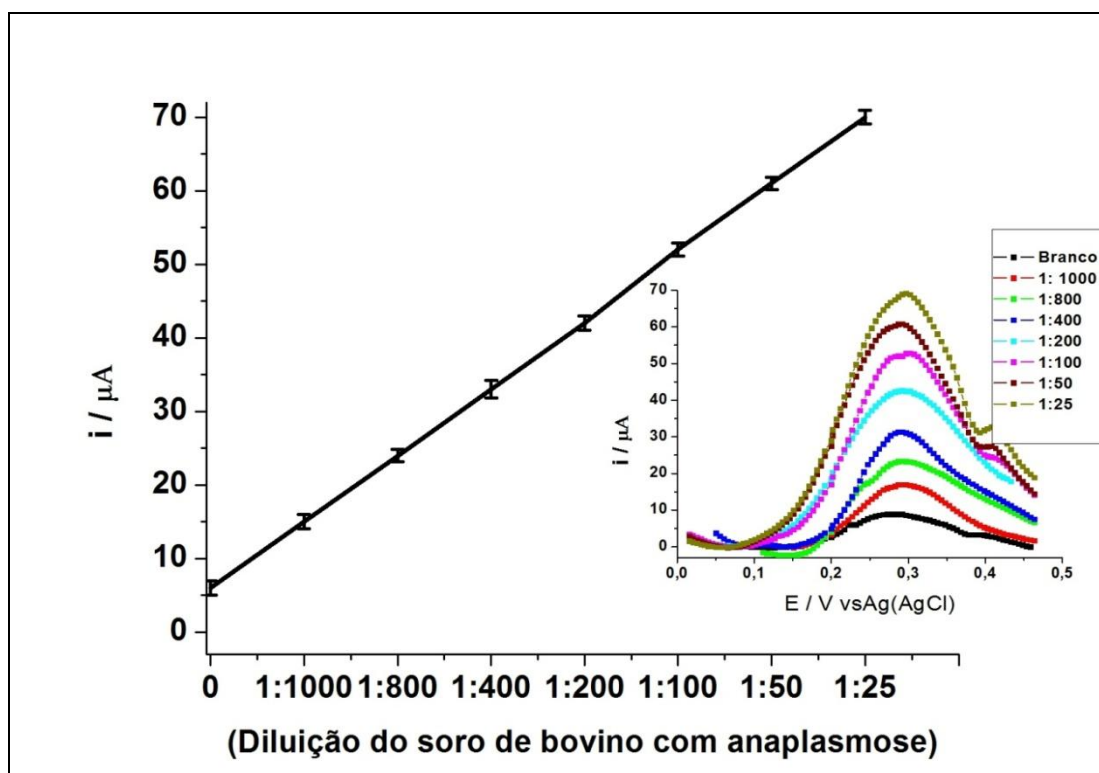
6.4.6 Análise de sensibilidade, seletividade e especificidade do imunossensor para diagnóstico da anaplasmoze bovina

a) Curva de calibração

Conforme já foi citado anteriormente, as amostras de soro positivo utilizadas no presente trabalho referem-se a amostras reais de soro de bovinos infectados com a *A. marginale*. Com isso, temos apenas a análise qualitativa dessas amostras, uma vez que, não conseguimos quantificar o teor de IgG⁺ nessas amostras, nem foi possível encontrar um padrão específico para a anaplasmoze bovina (anti-Am1), principalmente, em uma amostra tão complexa como é o soro desses animais, que por sua vez, pode conter vários tipos imunoglobulinas (IgGs) para as mais variadas doenças, ou até mesmo IgGs para a *A. marginale* em função da memória imunológica adquirida ao entrar em contato pelo menos uma vez com determinado patógeno transmitido pelo carrapato.

Diante do exposto, para os ensaios da curva de calibração o soro positivo dos animais infectados com *A. marginale* foi diluído em tampão fosfato em pH 7,3 nas seguintes proporções: 1:1000; 1:800; 1:400; 1:200; 1:100, 1:50, 1:25, mantendo a concentração da Am1 constante (0,055 µg µL⁻¹). Destaca-se que o principal objetivo dessa análise foi verificar a sensibilidade do imunossensor, detecção de IgG⁺ em amostras de soro diluídas 1000 vezes. A Figura 78 mostra as correntes de pico anódico em função das sucessivas diluições das amostras de soro positivo.

Figura 78: Voltamogramas de pulso diferencial para o eletrodo de grafite modificado com poli (3-HBA) após adição de 18 μL da Am1 ($0,055 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) + 18 μL 4-AAP a $10 \text{ mmol } \text{L}^{-1}$, com adição de 18 μL do soro de bovino com anaplasmosse após as seguintes diluições: 1:1000; 1:800; 1:400; 1:200; 1:100, 1:50, 1:25. Em todas as medidas foi subtraído o sinal do branco. Eletrólito: tampão fosfato $0,1 \text{ mol } \text{L}^{-1}$, pH 7,3. Condições experimentais: Amplitude: 25 mV; duração do pulso 60 ms; $v = 10 \text{ mV } \text{s}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2015.

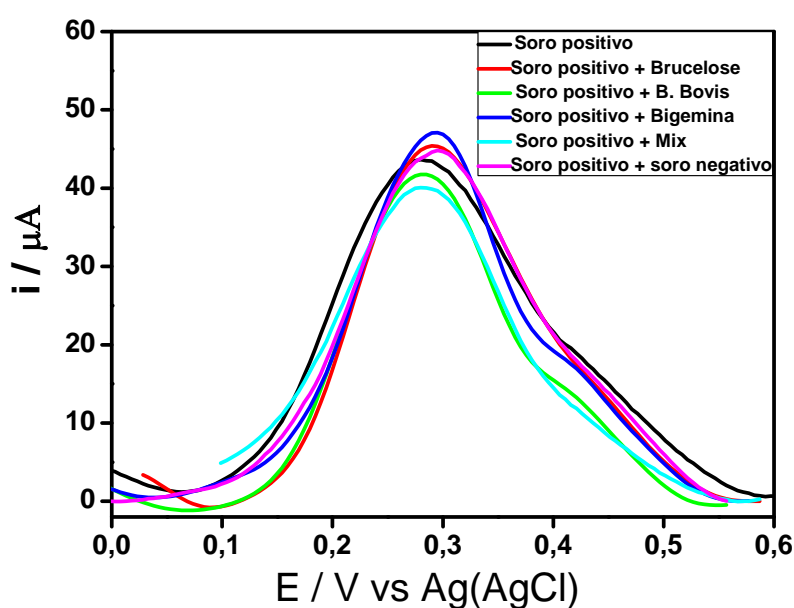
A análise de regressão linear de corrente (μA) versus as diluições (1:1000; 1:800; 1:400; 1:200; 1:100, 1:50, 1:25) do soro de bovino com anaplasmosse (Figura 78) mostra o perfil de linearidade ($r > 0,99$). O desenvolvimento de um imunossensor para diagnóstico da anaplasmosse bovina com boa sensibilidade é indispensável, uma vez que, os animais infectados com *A. marginale* frequentemente se tornam persistentemente infectados, com baixa parasitemia e baixos títulos de IgG^+ , servindo de reservatório²⁰³.

Os sinais clínicos da anaplasmosse, embora evidentes em animais susceptíveis, não são específicos, sendo necessário o diagnóstico sorológico²⁰⁴. Neste caso, a aplicação de um imunossensor para detecção em tempo real, com boa sensibilidade e especificidade é imprescindível, já que o diagnóstico tardio da doença acarreta uma série de prejuízos, como mortalidade dos animais, seqüelas em virtude da anemia severa que interfere no desenvolvimento normal e na diminuição da resistência natural, facilitando a ocorrência de outras enfermidades. Outro fator importante é que a presença de interferentes no soro do animal infectado com *A. marginale*, mesmo que estejam em concentrações significativamente superiores às moléculas a serem detectadas na amostra biológica, não devem exercer influência na resposta analítica. As análises de interferentes para o desenvolvimento do imunossensor para anaplasmosse serão abordadas no item a seguir.

b) Análise dos interferentes

A seletividade do reconhecimento das moléculas presentes na amostra pelo componente biológico, aliada à sensibilidade do transdutor, tem gerado grande número de trabalhos científicos na área de imunossensores^{205, 206}. A Figura 79 mostra as detecções de soro positivo para anaplasmosse bovina em presença de anticorpos de algumas doenças como a *Brucelose*, *B. bovis*, *B. bigemina* (Tristeza Parasitária Bovina) frequentemente associadas à anaplasmosse em gado de corte e gado de leite²⁰⁷.

Figura 79: Voltamogramas de pulso diferencial para o eletrodo de grafite modificado com poli (3-HBA) após adição de 18 μL da Am1 ($0,055 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) + 18 μL 4-AAP a 10 mmol L^{-1} , com adição de 18 μL da mistura de soro de bovino com anaplasnose (1:100) com soro positivo na diluição (1:100) para: *Brucelose*, *B. bovis*, *B. bigemina* e Mix (mistura de todos os soros interferentes). O soro negativo foi diluído (1:100). Em todas as medidas foi subtraído o sinal do branco. Eletrólito: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,3. Condições experimentais: Amplitude: 25 mV; duração do pulso 60 ms; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2015.

Na análise de interferentes foi adicionado juntamente com o soro positivo de animal infectado com *A. marginale* o soro positivo de uma doença que normalmente acomete os animais concomitantemente com anaplasnose bovina. Na análise das detecções (Figura 79) percebe-se que o imunossensor para anaplasnose não apresentou alteração significativa no sinal analítico em relação aos interferentes, a corrente de pico anódico do soro positivo na ausência de interferentes está praticamente sobreposta as correntes de pico anódico do soro positivo na presença dos interferentes, isso mostra a boa seletividade do imunossensor na detecção de IgG^+ para *A. marginale*. Essa ausência de interferência no momento da detecção está associada com a

excelente estabilidade estrutural da Am1 (Figura 60) conforme discutido no item 6.4.1. O soro positivo na presença do soro negativo também não apresentou alteração significativa na corrente de pico anódico (Figura 79).

6.4.7 Análise de detecção do imunossensor por ressonância de plásmons de superfície

Com o propósito de investigar ainda mais a resposta da interação da proteína de membrana Am1 com o soro positivo de bovinos com anaplasmoses foi empregada a técnica de Ressonância de Plásmons de Superfície (Figura 80). Nessa análise, a referida interação foi acompanhada através da variação angular ($\Delta\theta_{\text{SPR}}$) em função do tempo, tendo como referência, a variação angular provocada pela adição de soro negativo na proteína de membrana imobilizada na superfície sensora do eletrodo de ouro funcionalizado com poli (3-HBA).

Vale ressaltar que o objetivo primordial desse experimento não foi o de utilizar mais uma técnica para caracterização do imunossensor, uma vez que, essa caracterização já foi elucidada através das técnicas eletroquímicas. O intuito foi aproveitar as excelentes potencialidades da referida técnica (sensibilidade) para verificar a especificidade da Am1, agora, imobilizada em eletrodo de ouro modificado com poli (3-HBA) em solução eletrolítica de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

A respeito das variações angulares observadas no sensograma da Figura 80 vale destacar que quando a condição de ressonância do sistema é alcançada, conforme já apresentado no item 2.2.8 (as OPS e a radiação incidente tenham vetores de onda de igual magnitude), o ângulo de ressonância de plásmons de superfície (θ_{SPR}) ou ângulo de SPR, pode ser determinado a partir da equação 9²⁰⁸.

Equação 9:
$$\theta_{\text{SPR}} = \arcsen\left(\sqrt{\left(\frac{\varepsilon_Y \cdot \varepsilon_{\alpha}}{\varepsilon_Y + \varepsilon_{\alpha}}\right) \cdot \frac{1}{\varepsilon_1}}\right)$$

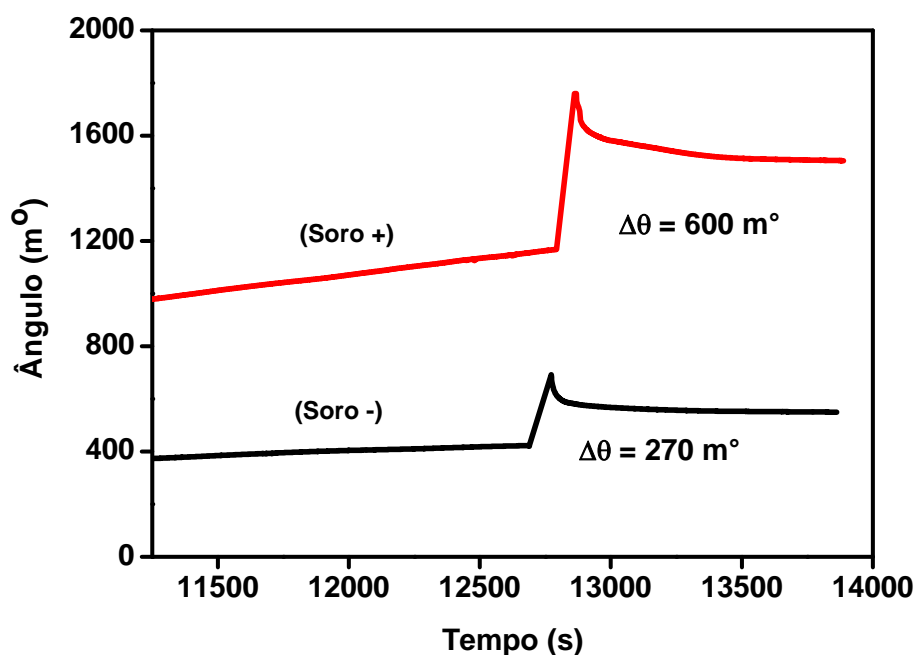
Em que ϵ_Y é a constante dielétrica do disco de ouro, ϵ_α é a constante dielétrica do meio (biomoléculas que interagem com a superfície metálica) e ϵ_1 é a constante dielétrica do prisma.

Com base nesta equação, é possível inferir que θ_{SPR} é sensível a mudanças nas propriedades ópticas do sistema, como as constantes dielétricas do metal, do prisma e do meio. Além disso, por meio da equação de Maxwell, sabe-se que em meios fracamente absorventes de luz, como filmes metálicos, a constante dielétrica (ϵ) relaciona-se com o índice de refração (n) como apresentado na equação 10²¹².

Equação 10: $n = \sqrt{\epsilon}$

Assim, alterações na superfície do metal, como a imobilização da proteína de membrana Am1 e a interação dessa proteína como anticorpo presente no soro de animais infectados com a *A. marginale*, irão alterar o índice de refração do meio e gerar variações no valor do θ_{SPR} ao longo do tempo (Figura 80).

Figura 80: Sensograma mostra a variação angular em função do tempo para a interação da Am1 ($18 \mu\text{L}$ a $0,055 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) imobilizada em Au/poli (3-HBA), 10 ciclos de varredura (3-HBA a $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em H_2SO_4 a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$) após adição de $18 \mu\text{L}$ soro positivo, diluição 1:25 e adição de $18 \mu\text{L}$ soro negativo, diluição 1:25. Lavagem em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,3.



Fonte: Autor, 2015.

Através da análise do sensograma foi possível observar que a interação da Am1 com o soro positivo, Au/poli (3-HBA), apresentou um maior deslocamento do ângulo de SPR ($\Delta\theta_{\text{SPR}} = 600 \text{ m}^\circ$). Enquanto que a adição do soro negativo na Am1, Au/poli (3-HBA), apresentou um menor deslocamento do ângulo de SPR ($\Delta\theta_{\text{SPR}} = 270 \text{ m}^\circ$). Essa variação no deslocamento do ângulo de SPR do soro positivo em relação ao soro negativo, nas mesmas condições experimentais, mostra a eficiência da interação antígeno-anticorpo, uma vez que, no soro negativo, após a lavagem com tampão fosfato houve a remoção das espécies fracamente ligadas na superfície sensora restando na superfície do ouro funcionalizado com poli (3-HBA) a proteína de membrana da *A. marginale* (Am1).

O maior deslocamento do ângulo de SPR observado na adição do soro positivo se deve a interação da Am1 com os anticorpos anti-*A. marginale*

presentes no soro de animais infectados, uma vez que, esses anticorpos permaneceram na superfície metálica mesmo após a lavagem com tampão fosfato. Já que, um maior número de moléculas imobilizadas na superfície do imunossensor tende a aumentar o índice de refração da superfície sensora e o consequente aumento do θ_{SPR} ²⁰⁹.

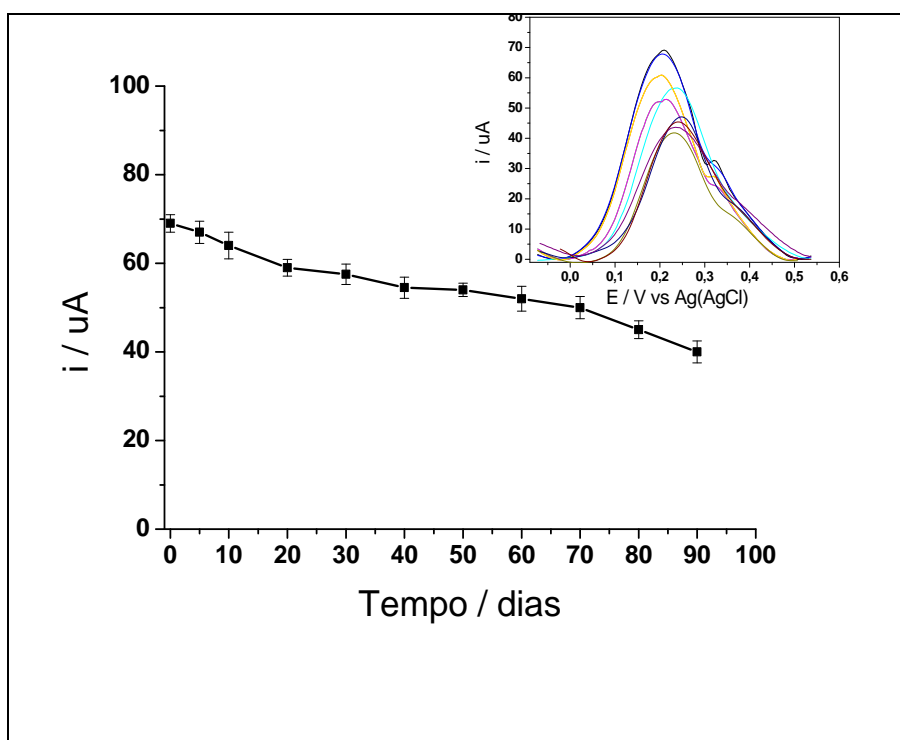
Com base nesses resultados de SPR, foi possível constatar, mais uma vez, o satisfatório potencial apresentado pelo imunossensor desenvolvido, por constituir-se como uma ferramenta analítica sensível, específica e rápida para o sorodiagnóstico da anaplasmoze bovina.

6.4.8 Análise do tempo de estocagem do imunossensor

O tempo de estocagem do imunossensor foi avaliado durante um período de noventa dias. Todas as análises foram realizadas em triplicata e a resposta de corrente foi obtida por voltametria de pulso diferencial, nas mesmas condições experimentais dos outros testes de detecção realizados no presente trabalho. Entre uma avaliação e outra, o eletrodo foi armazenado, em frasco hermeticamente fechado, no freezer até a próxima detecção. Vale mencionar que antes de ser armazenado o eletrodo foi funcionalizado com o poli (3-HBA) e imobilizado com a proteína de membrana Am1. Somente no momento da análise foi realizada a adição do soro positivo (Diluição 1: 25) e do intercalador (10 mmol L^{-1}), tempo de interação (Ag-Ac) foi de 25 minutos, eletrólito tampão fosfato, pH 7,3.

A Figura 81 mostra os resultados de resposta relativa do imunossensor em função do tempo de estocagem em dias.

Figura 81: Representa a variação da corrente de pico de oxidação em função do tempo em dias de estocagem.



Fonte: Autor, 2015.

Decorridos os primeiros trinta dias o imunossensor apresentou uma queda de corrente de aproximadamente 15%. Do trigésimo dia em diante a queda de resposta de corrente foi mais sutil. Ao final de sessenta dias a queda observada foi de 20 %. No final de noventa dias a queda de resposta foi de aproximadamente 35 %. Em trabalho realizado por Brahim e colaboradores²¹⁰, o desenvolvimento de um biossensor amperométrico com imobilização da enzima glicose oxidase, em película de hidrogel funcionalizada com polipirrol, apresentou no final de noventa dias uma queda de resposta de 30%. Esse biossensor enzimático apresentou boa estabilidade ao ser armazenado na ausência de tampão fosfato.

Em trabalho realizado por Razola²¹¹ ao imobilizar a peroxidase em eletrodo de grafite funcionalizado com polipirrol, a melhor condição de estabilidade foi obtida mantendo o biossensor em tampão fosfato, pH 6,2, à temperatura de 5°C, obtendo uma resposta de 90% em relação a inicial em 35

dias. Tasuma²¹² afirma que a exposição do biossensor enzimático ao ar pode causar diminuição da sensibilidade pela desativação da enzima ou por oxidação do material polimérico utilizado na funcionalização da superfície sensora.

Na verdade, a estabilidade de um biossensor enzimático é um dos principais problemas a serem superados, uma vez que, as enzimas apresentam uma natureza instável quando fora de seu meio natural²¹³.

Com isso, verifica-se que a boa estabilidade apresentada pelo imunossensor desenvolvido para diagnóstico da *A. marginale* está relacionada com a estrutura estável da proteína de membrana (Am1, oligopeptídeo com apenas 26 resíduos de aminoácidos) imobilizada na superfície sensora do EG / poli (3-HBA). Essa estabilidade constitui um dos fatores indispensáveis para que esse imunossensor seja comercializado, principalmente, para aplicações de monitoramento contínuo.

Segundo Ahuja e colaboradores²¹⁴ a estabilidade é um dos principais problemas que afeta o potencial comercial de um biossensor, por isso, uma grande variedade de técnicas de imobilização tem sido investigadas para a produção de imunossensores mais estáveis.

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O poli (3-HBA) foi eletropolimerizado sobre eletrodos de carbono grafite. Os estudos de estabilidade eletroquímica do filme eletrogerado comprovaram baixa perda de atividade. Esse material polimérico também foi eficiente para imobilizar oligonucleotídeo e a proteína de membrana da *A. marginale*, uma vez que, as correntes de pico dos eletrodos funcionalizados foram superiores (66%) aos dos eletrodos não funcionalizados.

Esse aumento de resposta foi atribuído a menor lixiviação, já que a estrutura globular do filme e a presença de grupos carboxilas livres na estrutura do polímero facilitam a retenção das biomoléculas na superfície sensora. Além das potencialidades dessa matriz para o desenvolvimento de um genossensor, nesse trabalho, essa matriz polimérica foi escolhida para a construção de um imunossensor para detecção da anaplasmosse bovina.

Os espectros de FTIR do poli (3-HBA), quando comparados aos espectros do 3-HBA, mostraram comportamento bem distinto, sugerindo a modificação na estrutura química do monômero. O perfil de maior destaque foi da deformação axial assimétrica C-O-C característica de éteres, a qual não aparece no espectro do monômero, sugerindo que a posição de polimerização entre os cátions radicais seja entre o oxigênio fenólico e o carbono do anel de menor impedimento estérico (C4), formação de um poli aril éter.

Em relação ao estudo teórico realizado para o 3-HBA foi possível propor um mecanismo para a reação de eletropolimerização do poli (3-HBA). Os Espectros de infravermelho teórico obtido pelo cálculo B3LYP/6-31G para o decâmero do 3-HBA apresentaram uma boa concordância com os dados experimentais. Através do espectro UV-vis teórico foi possível determinar o *band gap* do decâmero do 3-HBA, 3,71 eV. O valor experimental estimado para o poli (3 - HBA) usando voltametria cíclica foi de aproximadamente 1,20 eV. Esse valor encontrado é típico de materiais semicondutores. Em relação aos testes de reversibilidade esse polímero foi caracterizado como material quase reversível.

Foi realizado, através do método de *web server RaptorX*, a elucidação estrutural para as proteínas de membrana da *A. marginale* em que a Am1 apresentou uma estrutura estável em folha-beta e a Am2 uma estrutura instável

em α -hélice. Essa instabilidade estrutural da Am2 é indispensável para explicar as várias reações cruzadas em testes de diagnósticos da anaplasmosse que empregam esse peptídeo como antígeno.

O imunossensor para identificação da anaplasmosse em amostras sorológicas de bovinos foi construído sobre a matriz de poli (3-HBA). As detecções foram realizadas através do sinal obtido pela oxidação do intercalador de proteína 4-AAP, utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial.

Experimentos também foram realizados para confirmação das imobilizações, por espectroscopia de impedância eletroquímica. Os resultados diferenciaram qualitativamente os sistemas contendo apenas o polímero, Am1, IgG+, IgG- e interferente. Houve um aumento significativo nos valores de resistência à transferência de carga e diminuição dos valores do elemento de fase constante ao adicionar o soro positivo na proteína de membrana da *A. marginale* imobilizada na plataforma funcionalizada com poli (3-HBA). Isso sugere uma redução da área eletroativa do EG/poli (3-HBA) e uma maior dificuldade de difusão do par redox até as proximidades da superfície sensora, indicando a presença dos materiais biológicos, confirmando assim as interações antígeno-anticorpo.

Os parâmetros de detecção foram otimizados e a concentração de 4-AAP foi de 10 mmol L^{-1} , o tempo de interação da Am1 com a IgG+ foi de 25 minutos e testes de interferentes utilizando alvos não-complementares foram realizados com sucesso. O imunossensor apresentou boa sensibilidade, antígeno (Am1) interagiu com o soro positivo em diluições de 1:1000, 1:800, 1:400, 1:200, 1:100, 1:50, 1:25 (faixa linear de trabalho). Através da técnica de SPR também foi possível observar a especificidade do imunossensor para diagnóstico da anaplasmosse bovina, empregando eletrodo de ouro funcionalizado com poli (3-HBA). O tempo de estocagem do imunossensor foi satisfatório com redução de 35% da resposta no final de noventa dias.

Como propostas futuras para o imunossensor, o sistema precisa ser miniaturizado e aplicado em estudos de viabilidade econômica para implantação comercial. Esse biomonitoramento, em tempo real, será muito importante para o diagnóstico da anaplasmosse bovina em rebanhos de corte e leiteiro, uma vez que, essa doença causa severos prejuízos à pecuária do

nosso país. Outra proposta futura que precisa ser aprimorada utilizando essa nova plataforma, EG/poli (3-HBA), seria o desenvolvimento de genossensores para o diagnóstico clínico de doenças.

REFERÊNCIAS

1. Kessler RH, Soares CO, Madruga CR, Araújo FR. Tristeza parasitária dos bovinos: quando vacinar é preciso. Campo Grande (MS): Embrapa, 2002
2. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int J Sys Evol Microb. 2001; 51:2145–2165.
3. Silva VMG, Araújo FR, Madruga CR, Soares CO, Kessler RH, Almeida MAO, Fragoso SP, Santos LR, Ramos CAN, Bacanelli G, Torres Junior RA. Comparison between indirect enzyme-linked immunosorbent assays for *Anaplasma marginale* antibodies with recombinant major surface protein 5 and initial body antigens. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006; 10:1511-1516.
4. Araújo FR, Santos LR, Madruga CR, Fragoso SP, Umaki ACS, SOARES CO. Clonagem e expressão do gene MSP5 de um Isolado brasileiro de *Anaplasma marginale*. Embrapa Gado de Corte: Circular Técnica. 2002; 29:1-4.
5. Palmer GH, Oberle SM, Barbet AF, Goff WL, Davis WC, McGuire TC. Immunization with a 36 kilodalton surface protein induces protection against homologous and heterologous *Anaplasma marginale* challenge. Infect Immun. 1988; 56(6):1526-1531.
6. Vidotto MC, McGuire TC, McElwain TF, Palmer GH, Knowles DP. Intermolecular relationships of major surface proteins of *Anaplasma marginale*. Infect Immun. 1994; 62(7):2940-2946.

7. Palmer GH, Barbet AF, Kuttler KL, McGuire TC. Detection of an *Anaplasma marginale* common surface protein present in all stages of infection. J. Clin. Microbiol. 1986; 23:1078-1083.
8. Morel PC. Tick-borne disease of livestock in Africa. Manual of tropical Veterinary Parasitology. Wallingford(UK): CBA International; 1989. p.301-454.
9. Kocan KM, De La Fuente J, Blouin EF, Garcia-Garcia JC. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. Parasitol. 2004; 129:285-300.
10. Gonçalves PM. Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na região sudeste do Brasil. Cienc Rural. 2000; 30:187-194.
11. Kocan KM, De La Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing SA. The natural history of *Anaplasma marginale*. Vet Parasitol. 2010; 167:95-107.
12. Zaugg JL, Kuttler KL. Anaplasmosis: in utero transmission and the immunological significance of ingested colostral antibodies. Am j Vet Res.1984; 45:440-443.
13. Guglielmone AA. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Veterinary Parasitology*. 1995; 57(3):109-119.
14. Eriks IS, Stiller D, Palmer GH. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmtion. J Clin Microbiol.1993; 31:2091-2096.
15. Kessler RH. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. Pesq Vet Bras. 2001; 21:177-199.
16. Kocan KM, Stiller D, Goff WL, Claypool PL, Edwards W, Ewin SA, Msguire TC, Hair JA, Barron SJ. Development of *Anaplasma marginale* in male

Dermacentor andersoni transferred from parasitemic to susceptible cattle. Am J Vet Res.1992; 53:499-507.

17. Kocan KM, De La Fuente J, Guglielmone AA, Meléndez RD. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. Clin Microbiol Rev. 2003; 16:698-712.

18. Ribeiro MFB, Passos LMF. Tristeza Parasitária Bovina. Cadernos Técnicos de veterinária e zootecnia. 2002; 39:36-51.

19. Vidotto O, Marana ERM. Diagnóstico em Anaplasmosse bovina. Ciência Rural. 2001; 31:361-368.

20. Farias MAR. Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina. Guaíba: Agropecuária. 1995.

21. Kessler RH, Schenk MAM. Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos. Campo Grande: Embrapa CNPGC. 1998.

22. Weiland G, Reiter I. Methods for the measurement of the serological response to *Babesia*. In: Ristic, M. Babesiosis of domestic animals and man. Flórida(US): CRC Press, 1988; p.143-162.

23. Curnow JA, Curnow BA. An indirect haemagglutination test for the diagnosis of *Babesia argentina* infection in cattle. Australian Veterinary Journal.1967; 43: 286-290.

24. Ross JPJ, Löhr KF. Serological diagnosis of *Babesia bigemina* infection in cattle by the indirect fluorescent antibody test. Research Veterinary Science. 1968; 9:557-562.

-
25. Curnow JA. The use of a slide agglutination test to demonstrate antigenic differences between *Babesia bigemina* parasites. Australian Veterinary Journal. 1973; 49(6):290-293.
26. Todorovic RA, Kuttler KLA. Babesiosis card agglutination test. American Journal of Veterinary Research. 1974; 35(10):1347-1350.
27. Lopez VG, Todorovic RA. Rapid latex agglutination (RLA) test for the diagnosis of *Babesia argentina*. Veterinary Parasitology. 1974; 4(1):1-9.
28. Kahl LP, Anders RF, Callow LL, Rodwell BJ, Mltchell GF. Development of a solid-phase radioimmunoassay for antibody to antigens of *Babesia bovis* infected bovine erythrocytes. International Journal for Parasitology. 1982; 12(2):103-109.
29. Waltisbuhl DJ, Goodger BV, Wright IG, Commins MA, Mahoney DF. An enzyme linked immunosorbent assay to diagnose *Babesia bovis* infection in cattle. Parasitology Research. 1987; 73:126-131.
30. Vidotto O, Marana ERM. Anaplasmosse bovina: aspectos epidemiológicos, clínicos e controle. Semina: Ci Agr. 1999; 20:98-106.
31. Tebele N, Mcguire TC, Palmer GH. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. Infect Immun. 1991; 59: 3199-4004.
32. Palmer GH, Lincoln S. Anaplasmosis. In: Smith BP. Large Animal Internal Medicine. 2002; 35:1049-1051.
33. Ristic M. Bovine Anaplasmosis. In: Kreier JP. Parasitic Protozoa. 1.ed. New York: Academic Press; 1977; 22: 235-249.

34. Horn SC, Artech CCP. Situação parasitária da pecuária no Brasil. A Hora da Veterinária. 1985; 4(23):13-32.

35. Brinkman BS, Kersting KW. Bovine anaplasmosis: an overview. Iowa State University Veterinarian. 1990; 52(1):45-51.

36. Brasil. Ministério da Agricultura, Secretária Nacional de Defesa Sanitária Animal. Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos. Boletim de Defesa Sanitária Animal. 1983; 13:83-90.

37. Grisi L, Massard CL, Moya Borja GE, Pereira JB. Impactos econômicos dos principais ectoparasitas em bovinos no Brasil. A Hora Veterinária. 2002; 21(125):3-10.

38. Araújo FR, Madruga CR, Soares CO, Kessler RH. Progressos na imunização contra *A. marginale*. Pesq Vet Bras. 2003; 23:139-48.

39. Brown WC, Norimine J, Knowles DP, Goff WL. Immune control of *Babesia bovis* infection. Veterinary Parasitology. 2006b; 138:75-87.

40. Gale KR, Leatch G, Gartside M, Dimmock CM. *Anaplasma marginale*: failure of sera from immune cattle to confer protection in passive-transfer experiments. Parasitol. Res. 1992; 78:410-415.

41. Brown WC, Norimine J, Goff WL, Suarez CE, McElwain TF. Prospects for recombinant vaccines against *Babesia bovis* and related parasites. Parasite Immunology. 2006a; 28: 315-327.

42. Estes DM, Closer NM, Allen GK. IFN- γ stimulates IgG2 production from bovine B cells costimulated with anti- μ and mitogen. Cell Immunol. 1994; 154:287-295.

-
43. Palmer GH, Mcguire TC. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. J Immunol.1984; 133:1010-1015.
44. Tuo W, Palmer GH, Mcguire TC, Zhu D, Brown WC. Interleukin-12 as an adjuvant promotes immunoglobulin G and type 1 cytokine recall responses to major surface protein 2 of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. Infect immun. 2000; 68:270-280.
45. Mcguire TC, Musoke AJ, Kurtti T. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. Immunology.1979; 38:249-256.
- 46- Brown WC, Shkap V, Zhu D, Mcguire TC, Tuo W, Mcelwain TF, Palmer GH. CD4+ T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. Infect Immun.1998a; 66:5406-5413.
47. Adler H, Peterhans E, Nicolet J, Jungi TW. Inducible L-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in bovine bone marrow-derived macrophages. Biochem Biophys Res Commun.1994; 198:510-515.
48. McGarey DJ, Allred DR. Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesins. Infect. Immun. 1994; 62:4587-4593.
49. Alleman AR, Kamper SM, Viseshakul N, Barbet AF. Analysis of the *Anaplasma marginale* genome by pulsed-field electrophoresis. J Gen Microbiol. 1993; 139:2439-44.
50. Oberle SM, Palmer GH, Barbet AF, Mcguire TC. Molecular size variations in an immunoprotective protein complex among isolates of *Anaplasma marginale*. Infect Immun.1998; 56:1567-1573.

51. Kano FS, Vidotto O, Pacheco RS, Vidotto MC. Antigenic characterization of *Anaplasma marginale* isolates from different regions of Brazil. Vet Microbiol. 2002; 87:131-138.

52. De La Fuente J, Lew A, Lutz H, Meli ML, Hofmann-Lehmann R, Shkap V, Molad T, Mangold AJ, Almazán C, Naranjo V, Gortázar C, Torina A, Caracappa S, Garcia-Perez AL, BarraL M, Oporto B, Ceci L, Carelli G, Blouin EF, Kocan KM. Genetic diversity of *Anaplasma* species major superficies proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. Anim Health Res Rev. 2005; 6:75-89.

53. Bowie MW, De La Fuente J, Kocan KM, Blouin EF, Barbet AF. Conservation of major surface protein 1 genes of *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between tucks and cattle. Gene. 2002; 282:95-102.

54. Palmer GH, Eid G, Barbet AF, McGuire TC, Mcelwain TF. The immunoprotective *Anaplasma marginale* major surface protein 2 is encoded by a polymorphic multigene family. Infect Immun. 1994; 62:3808-3816.

55. Alleman AR, Palmer GH, McGuire TC, Mcelwain TF, Perryman LE, Barbet AF. *Anaplasma marginale* major surface protein 3 is encoded by a polymorphic, multigene family. Infect Immun. 1997; 65: 156-63.

56. McGuire TC, Davis WC, Brassfield AL, Mcelwain TF, Palmer GH. Identification of *Anaplasma marginale* long-term carrier cattle by detection of serum antibody to isolated MSP-3 J. Clin Microbiol. 1991; 29:788-793.

57. Palmer GH, Mcelwain F. Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. Vet Parasitol. 1995; 57:233-253.

58. Oberle SM, Palmer GH, Barbet AF. Expression and immune recognition of the conserved MSP4 outer membrane protein of *Anaplasma marginale*. Infect Immun. 1993; 61:5245-5251.

-
59. Visser ES, McGuire TC, Palmer GH, Davis WC, Shkap V, Pipano E, Knowles DP. The *Anaplasma marginale* msp5 gene encodes a 19-kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infect Immun.* 1992; 60:5139-5144.
60. Knowles D, Echaide ST, Palmer G, McGuire T, Stiller D, McElwain T. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *J. Clin Microbiol.* 1996; 34:2225-2230.
61. Azzazy HM, Highsmith Junior WE. *Phage display* technology: clinical applications and recent innovations. *Clinical Biochemistry.* 2002; 35:425-445.
62. Parcmey S, Smith G. Antibody-selectable filamentous fd phagevectors: affinity purification of target genes. *Gene.* 1988; 73:305-318.
63. Stephen CW, Lane DP. Mutant conformation of p53. Precise epitope mapping using a filamentous phage epitope library. *Journal of Molecular Biology.* 1992; 225:577-583.
64. Rowley MJ, O'Connor K, Wijeyewickrema L. *Phage display* for epitope determination: a paradigm for identifying receptor-ligand interactions. *Biotechnology annual review.* 2004; 10:151-188.
65. Hemminga MA, Vos WL, Nazarov PV, Koehorst RBM, Wolfs CAM, Spruijt B, Stopa D. Viruses: incredible nanomachines. New advances with filamentous phages. *European Biophysics Journal.* 2010; 39:541-550.
66. Santos PS. Epítomos imunodominantes da MSP1a de *Anaplasma marginale* e suas aplicações diagnósticas e vacinais. Uberlândia. Tese [Doutorado] - Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia; 2011.

-
67. D’Orazio PD. Biosensors in Clinical Chemistry. *Clin Chim Acta*. 2003; 334:41-69.
68. Thevenot K, Toth RA, Durst GS. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry*. 1999; 71:2333–2348.
69. Yanaga Júnior T. Inovações tecnológicas na bioclimatologia animal visando aumento da produção animal: relação bem estar animal x clima [Internet]. 2006 [acesso em 05 out. 2014]. Disponível em: http://www.infobibos.com/artigos/2006_2/ITBA/Index.htm
70. Tothill IE. Biosensors developments and potential applications in the agricultural diagnosis sector. *Computers and Electronics in Agriculture*. 2001; 30(1-3):205-218.
71. Luong JHT, Male KB, Glennon JD. Biosensor technology: technology push versus market pull. *Biotechnology Advances*. 2008; 26(5):492-500.
72. Mello LD, Kubota LT. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry*. 2002; 77(2):237-256.
73. Wang J. Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2000; 19 (1-2):47-53.
74. Chen JA, Burrell K, Collis GE, Officer DL, Swiegers GF, Too CO, Wallace GG. Preparation, characterisation and biosensor application of conducting polymers based on ferrocene substituted thiophene and terthiophene. *Electrochimica Acta*. 2002; 47(17):2715-2724.

75- Zhang S, Wright G, Yang Y. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. *Biosensors and Bioelectronics*. 2000; 15(5-6): 273-282.

76- Rahman M A, Park DS, Chang SC, McNeil CJ, Shim YB. The biosensor based on the pyruvate oxidase modified conducting polymer for phosphate ions determinations. *Biosensors and Bioelectronics*. 2006; 21(7):1116-1124.

77. Wilson GS, Gifford R. Biosensors for real-time in vivo measurements. *Biosensors and Bioelectronics*. 2005; 20(12):2388-2403.

78. Vinícius M. DNA [Internet]. 2012 [acesso em 05 out. 2014]. Disponível em: <http://www.universitario.com.br/celo/topicos/subtopicos/genetica/dna/dna.html>.

79. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4th. ed. New York: Garland Science; 2002.

80. Watson JD, Crick FHC. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Desoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. 1953; 171:737-738.

81- Lehninger A L. *Principles of Biochemistry*. 4th. ed. New York: W.H. Freeman & Company Book Companion; 2004.

82 . Silva Jr. C, Sasson S. *Biologia*. 1. ed. São Paulo: Ed Saraiva; 2002. 672 p.

83. Uygun A. DNA hybridization electrochemical biosensor using a functionalized polythiophene. *Talanta*. 2009; 79:194-198.

84. Li LL, Cai H, Lee TM, Barford J, Hsing IM. Electrochemical Detection of PCR Amplicons Using Electroconductive Polymer Modified Electrode and Multiple nanoparticle Labels. *Electroanalysis*. 2004; 16:81-87.

85. Drummond TG, Hills MG, Barton JK. Electrochemical DNA sensors. *Nature. Biotechnology*. 2003; 21:1192-1199.

86. Riccardi CS, Costa PI, Yamanaka H. Imunossensor amperométrico. *Química Nova*. 2002; 25:316-320.

87. Skládal P. Advances in electrochemical immunosensors. *Electroanalysis*. 1997; 9:737-745.

88. Organização Mieloma Múltiplo. O que são cadeias leves livres [Internet]. 2014 [acesso em 05 out. 2014]. Disponível em <http://www.mielomamultiplo.org/tag/o-que-sao-cadeias-leves>.

89. Benjamin DC, Berzofsky JA, East IJ, Gurd FRN, Hannum C, Leach S, Margoliash JE, Michael JG, Miller A, Prager RM, Sercarz EE, Smith-Gill SJ, Todd PE, Wilson AC. The antigenic structure of proteins: a reappraisal. *Annual Review of Immunology*. 1984; 2:67-101.

90. Fernández F, Hegnerová K, Piliarik M, Sanchez-Baeza F, Homola J, Marco MP. A label free and portable multi channel surface plasmon resonance immunosensor for on site analysis of antibiotics in milk samples. *Biosensor and Bioelectronics*. 2010; 26(4):1231-1238.

91. Chemical Book. 4-Aminoantipyrine [Intenet]. 2014 [acesso em 10 mar. 2015]. Disponível em: http://www.chemicalbook.com/CASEN_83-07-8.htm

92. Arai G, Noma T, Hayashi M, Yasumori I. Electrochemical characteristics of D-amino acid oxidase immobilized in a conductive redox polymer. *J. Electroanal. Chem*. 1998; 452(3):43–48.

93. Bartlett PN, Caruana DJ. Electrochemical immobilization of enzymes. Part V: microelectrodes for the detection of glucose based on glucose oxidase immobilized in a poly (phenol) film. *Analyst*. 1992; 117(5):1287–1292.

-
94. Albareda-Sirvent M, Merkoçi A, Alegrete S. Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2000; 69(1-2):153-163.
95. Ramanathan K, Bangar MA, Yun M, Chen W, Myung NV, Mulchandani A. Bioaffinity Sensing Using Biologically Functionalized Conducting-Polymer Nanowire. *Journal of the American Chemical Society*. 2004; 127:496-497.
96. Sharma SK, Sehgal N, Kumar A. Biomolecules for development of biosensors and their applications. *Current Applied Physics*. 2003; 3:307-316.
97. Oni J, Diab N, Reiter S, Schuhmann. Metallophthalocyanine-modified glassy carbon electrodes: effects of film formation conditions on electrocatalytic activity towards the oxidation of nitric oxide. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2005; 105(2):208-213.
98. Ferreira LF, Boodts JFC, Madurro AGB, Madurro JM. Gold electrodes modified with poly (4-aminophenol): incorporation of nitrogenated bases and an oligonucleotide. *Polymer International*. 2008; 57(4):644-650.
99. Hajjizadeh M, Jabbari H, Heli H, Moosavi-Movahedi AA, Shafiee A, Karimian K. Electrocatalytic oxidation and determination of deferasirox and deferiprone on a nickel oxyhydroxide-modified electrode. *Analytical Biochemistry*. 2008; 373(2): 337-348.
100. Moses PR, Wier L, Murray R. Chemically modified tin oxide electrode. *Analytical Chemistry*. 1975; 47(12):1882-1886.
101. Schultze JW, Morgenstern T, Shattka D, Winkels S. Microstructuring of conducting polymers. *Electrochimica Acta*. 1999; 44(12):1847-1864.

-
102. Pron A, Rannou P. Processible conjugated polymers: from organic semiconductors to organic metals and superconductors. *Progress in Polymer Science*. 2002; 27(1):135-190.
103. Han D, Qiu X, Shen Y, Guo H, Zhang Y, Niu L. Electropolymerization of polypyrrole on PFIL-PSS-modified electrodes without added support electrolytes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2006; 596(1):33-37.
104. Skotheim TA. *Handbook of Conducting Polymers*. 2nd. ed. England: CRC Press; 1997.
105. Zoppi RA, De Paoli MA. Aplicações tecnológicas de polímeros intrinsecamente condutores: perspectivas atuais. *Química Nova*. 1993; 16(6):560-569.
106. Wan M. The influence of polymerization method and temperature on the absorption spectra and morphology of polyaniline. *Synthetic Metals*. 1989; 3(1):51-59.
107. Han D, Qiu X, Shen Y, Guo H, Zhang Y, Niu L. Electropolymerization of polypyrrole on PFIL-PSS-modified electrodes without added support electrolytes. *Journal of electroanalytical Chemistry*. 2006; 596(1):33-37.
108. Pron A, Rannou P. Processible conjugated polymers: from organic semiconductors to organic metals and superconductors. *Progress in Polymer Science*. 2002; 27(1):135-190.
109. Malhotra BD, Singhal R. Conducting polymer based biomolecular electronic devices. *Pramana Journal of Physics*. 2003; 61(2):331-343.
110. MacDiarmid AG. Synthetic metals: a novel role for organic polymers. *Chem. Int*. 2001; 40(14):2581-2590.

-
111. Lamamoto, T. Biosensor based in biomolecular electronic devices. *Journal of Organometallic Chemistry*. 2002; 653: 195-201.
112. Chandrasekhar P. Conducting Polymers. Fundamentals and applications: a practical approach. Kluwer Academic Publishers. 1999; 23-40.
113. Kanatzidis M G. Conductive polymers. *Chem.& Eng. News*.1990; 3(36):34-41.
114. Vieira SN, Ferreira LF, Franco DL, Afonso A S, Gonçalves R A, Brito-Madurro AG, Madurro JM. Electrochemical Modification of Graphite Electrodes with Poly(4-aminophenol). *Macromolecular Symposia*. 2006; 245(1):236-242.
115. Franco DL, Afonso AS, Vieira SN, Ferreira LF, Gonçalves RA, Brito-Madurro AG, Madurro JM. Electropolymerization of 3-aminophenol on carbon graphite surface: Electric and morphologic properties. *Materials Chemistry and Physics*. 2008; 107(2-3):404-409.
116. Silva F, Vieira S, Goulart L, Boodts J, Brito-Madurro A, Madurro JM. Electrochemical investigation of oligonucleotide-DNA hybridization on Poly(4-Methoxyphenethylamine). *International Journal of Molecular Sciences*. 2008; 9(7):1173-1187.
117. Silva TAR, Ferreira LF, Boodts JFC, Eiras SP, Madurro JM, Brito-Madurro AG. Poly(4-hydroxyphenylacetic acid): a new material for immobilization of biomolecules. *Polymer Engineering & Science*. 2008; 48(10):1963-1970.
118. Franco DL, Afonso AS, Ferreira LF, Gonçalves RA, Boodts JFC, Brito-Madurro AG, Madurro JM. Electrodes modified with polyaminophenols: Immobilization of purines and pyrimidines. *Polymer Engineering & Science*. 2008; 48(10):2043-2050.

-
119. Silva TAR, Ferreira LF, Souza LM, Goulart LR, Madurro JM, Brito-Madurro AG. New approach to immobilization and specific-sequence detection of nucleic acids based on poly(4-hydroxyphenylacetic acid). *Materials Science and Engineering*. 2009; 29(2):539-545.
120. Brito-Madurro A, Ferreira L, Vieira S, Ariza R, Filho L, Madurro JM. Immobilization of purine bases on a poly-4-aminophenol matrix. *Journal of Materials Science*. 2007; 42(9):3238-3243.
121. Ferreira LF, Boodts JFC, Brito-Madurro AG, Madurro JM. Gold electrodes modified with poly(4-aminophenol): incorporation of nitrogenated bases and an oligonucleotide. *Polymer International*. 2008; 57(4):644-650.
122. Losos GJ. *Infectious tropical diseases of domestic animals*. Longman Scientific and Technical Publishers. 1986; 746-748.
123. Farias NAR. *Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina*. Guaíba (RS): Ed. Agropecuária; 1995. 80p.
124. Aleixo LM. Voltametria: conceitos e técnicas [Internet]. 2014 [acesso em 10 jun. 2014]. Disponível em www.chemkeys.com.
125. Brett A, Brett CMA. *Electroquímica. Princípios, métodos e aplicações*. New York: Oxford University Press Inc; 1996. 471p.
126. Guo, 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*. 2004, 62:29-35.
127. Bard AJ, Faulkner LR. *Electrochemical methods fundamentals and applications*. 2nd. ed. New York: John Wiley & Sons; 1980.

-
128. Barker GC, Jenkins IL. Square-wave polarography. *Analyst*. 1952; 77:685-696.
129. Souza D, Galli A, Calegaro ML, Machado SAS, Pires RC. Utilização da múltipla voltametria de onda quadrada na determinação eletrolítica de compostos orgânicos e inorgânicos. *Química Nova*. 2007; 30(2):458-463.
130. Plambeck JA. *Electroanalytical chemistry: basic principles and applications*. New York: John Wiley & Sons; 1982; p.136-142.
131. Prodromidis MI. Impedimetric immunosensors. A review. *Electrochemical Acta*. 2009.
132. Suni II. Impedance methods for electrochemical sensors using nanomaterials. *Trac Trends in Analytical Chemistry*. 2008; 27(7):604-611.
133. Oliveira AR. Desenvolvimento de um microscópio confocal de varredura laser para caracterização topográfica de superfícies [dissertação]. Uberlândia (MG): Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Uberlândia, 2012.
- 134- Nano Science Instruments. Atomic Force Microscopy [Internet]. 2014 [acesso em 06 out. 2014]. Disponível em [www. nanoscience.com/product](http://www.nanoscience.com/product)
135. Kretschmann E., Reather H. Radiative decai of nonradiative surface plasmon excited by light. *Z. Naturf*. 1968; 23(A):2135-2136.
136. Souto DEP. Desenvolvimento de um imunosensor pela técnica de ressonância de plásmons de superfície para detecção em tempo real de anticorpos anti-*Leishmania infantum* [dissertação]. Diamantina (MG): Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri; 2012.

137. Damos FS, Mendes RK, Kubota LT. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio) sensores. Química Nova. 2004; 27(6):970-979.

138. Homola J, Koudela I, Yee SS. Surface plasmon resonance sensors based on diffraction gratings and prism couplers: sensitivity comparison sensors and Actuators B. 1999; 54:16- 24.

139. Green RJ, Frazier RA, Shakesheff KM, Davies MC, Roberts CJ, Tendler SJB. Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials Biomaterials. 2000; 21:1823-1835.

140- Leach A. Molecular Modelling: principles and applications. 2nd. ed. Pearson Education Limited; 2001.

141. Santos HF. O conceito da modelagem molecular. Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola: modelagem molecular. 2001; 4 (4-5).

142. Verdi H. Métodos de análise conformacional [Internet]. Faculdade de Farmácia – UFRGS - Centro de biotecnologia. Grupo de bioinformática estrutural [acesso em 03 out. 2014]. Disponível em: http://www.cbiot.ufrgs.br/bioinfo/modmol_3.pdf.

143. Coelho LW, Junqueira GMA, Herrera JOM, Machado SP. Molecular mechanics application in inorganic Chemistry. Quím. Nova. 1999; 22(3):396-404.

144. Hehre WJ. A Guide to Molecular Mechanisms and Quantum Chemical Calculations. Wavefunction. 2003.

145. Carvalho I, Pupo MT, Borges ADL, Bernarde LSC. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. Química Nova. 2003; 26(3):428-438.

-
146. Cowles MK. Markov Chain Monte Carlo convergence diagnostics: a comparative review. *Journal of the American Statistical Association*. 1996; 91:883–904.
147. Karp R. Monte carlo algorithms for the planar multiterminal network reliability problem. *Journal of Complexity*. 1985; 1:45-64.
148. Metropolis N, Ulam S. The Monte Carlo Method. *Journal of the American Statistical Association*. 1949; 335-341.
149. Smith A. Bayesian computation via the Gibbs sampler and related Markov chain Monte Carlo methods. *J. Roy. Statist. Soc. Ser. B*. 1993; 55:3-24.
150. Hehre WJ. A guide to molecular mechanisms and quantum chemical calculations. Wavefunction; 2003.
151. Arroio A, Honório KM, Silva ABF. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. *Química Nova*. 2010; 33(3):201-211.
152. Ferreira L F. Desenvolvimento de plataforma funcionalizada com poli (4-HBA) para aplicação em sensores biológicos [tese]. Uberlândia (MG): Universidade Federal de Uberlândia; 2009.
153. Stewart JJP. MOPAC: A Semiempirical Molecular Orbital Program. Leiden: ESCOM.1990.
154. Tomasi J, Mennucci B, Cammi R. *Chem. Rev.* 2005; 105:89-99.
155. Frish MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Montgomery JÁ, Vreven Jr T, Kudin KN, Burant JC, Millam JM, Iyengar SS, Tomasi J, Barrone V, Mennucci B, Cossi M, Scalmani G, Rega N, Petersson

GA, 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 JE, Hratchian HP, Cross JB, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Ayala PY, Morokuma K, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Zakrzewski VG, Dapprich S, Daniel SAD, Strain MC, Farkas O, Malick DK, Rabuck AD, Raghavachari K, Foresman JB, Ortiz JV, Cui Q, Baboul AG, Clifford S, Cioslowski J, Stefanov BB, Liu G, Liashenko A, Piskorz P, Komaromi I, Martin RL, Fox DJ, Keith T, Al-Laham MA, Peng CY, Nanayakkara A, Challacombe M, Gill PMW, Johson B, Chen W, Wong MW, Gonzalez C, Pople JA. Gaussian 03. Revision E.01, Gaussian. Inc., Wallingford CT, 2005.

156. Mohamadi F, Richards NGJ, Guida WC, Liskamp R, Lipton M, Caufield C, Chang G, Hendrickson T, Still WC. Macromodel an Integrated Software System for Modeling Organic and Bioorganic Molecules Using Molecular Mechanics. *J. Comput. Chem.*1990; (11):440–467.

157. Jorgensen WL, Maxwell DS, Tirado-Rives J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J. Am. Chem. Soc.*1996; 118:11225–11236.

158. Schrödinger is a scientific leader in computational chemistry, providing software solutions and services for life sciences and materials research [Internet]. 2014 [acesso em 03 maio 2014]. Disponível em www.schrodinger.com.

159. Zhao Y, Truhlar DG. The M06 Suite of Density Functionals for Main Group Thermochemistry, Thermochemical Kinetics, Noncovalent Interactions, Excited States, and Transition Elements: Two New Functionals and Systematic Testing of Four M06 Functionals and 12 Other Functionals. *Theor. Chem. Acc.* 2008; (119):525–525.

-
160. Zhao Y, Truhlar DG. Exploring the limit of accuracy of the global hybrid meta density functional for main-group thermochemistry, kinetics and noncovalent interactions. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2008; 4(11):1849-1858.
161. Källberg Morten, Wang H, Wang S, Peng J, Wang Z, Lu H, Xu J. Template-based protein structure modeling using the {RaptorX} web server, *Nature Protocols*. 2012; 7(8):1754-1761.
162. Schymkowitz J, Borg J, Stricher F, Nys R, Rousseau F, Serrano L. The FoldX web server: an online force field. *Nucleic Acids Research*. 2012; 33(7): 176-181.
163. Jorgensen WL, Maxwell DS, Tirado-Rives J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* 1996; 118:1225–11236.
164. Lee C, W. Yang, R.G. Parr. DFT method applied in conduidade polymers. *Phys. Rev. B*. 1988; 37: 785-792.
165. Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature reviews. Drug discovery*. 2004; 3(11):935–949.
166. Lang PT, Aynechi T, Moustakas D, Shoichet B, Kuntz ID, Brooijmans N, Oshiro CM. Molecular docking and structure-based design, in drug discovery research: new frontiers in the post-genomic era. John Wiley & Sons: Hoboken; 2007. 345p.
167. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*. 1998; 19(14):1639-1662.

168. Bard AJ, Faulkner LR. Electrochemical methods: Fundamentals and applications. John Willey & Sons. 1980.

169. Davoglio RA. Eletrossíntese, caracterização e testes de compósitos de polipirrol e poli (DMcT) sobre fibra de carbono como catodos de baterias secundárias e eletrodos de supercapacitores [tese de doutorado]. São Carlos (SP): Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos; 2009.

170. Greef R, Peat R, Peter LM, Pletcher D, Robinson J. Instrumental Methods in Electrochemistry. 1985; 1(2):435-443.

171. Bredas JL, Street GB. Polarons, bipolarons and solitons in conducting polymers. Accounts of Chemical Research. 1985; 18:309-315.

172. Turner A, Karube I, Wilson G. Biosensors: fundamentals and applications. Oxford: Oxford University Press; 1988.

173. Deslouis C, El Moustafid T, Musiani M. M, Tribollet B. Mixed ionic-electronic conduction of a conducting polymer film. Ac impedance study of polypyrrole. Electrochim. Acta. 1996; 41:1343-1352.

174. Bidóia ED. Um estudo do elemento de fase constante e da teoria de fractais relacionado à interface platina policristalina/solução [tese]. São Carlos (SP): Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar; 1991.

175. Becker D, Teender KJ. The impedance of fast charge transfer reactions on boron doped diamond electrodes. Electrochim. Acta. 2003; 49(29):231-239.

176. Dalmolin C. Preparação e caracterização de eletrodos de polímeros condutores sobre carbono vítreo reticulado (RVC) para aplicação em baterias secundárias [tese]. São Carlos (SP): Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar; 2006.

177. Mendez S, Curro JG, McCoy JD, Lopez GP. *Macromolecules*. 2005; 38(1):168-174.

178. Lovric M, Komorsky-Lovric S, Murray RW. Adsorption effects in square-wave voltammetry of totally irreversible redox reactions. *Electrochimica Acta*. 1988; 33(4):739-745.

179. Lovric M, Komorsky-Lovric S. Theory of reverse scan square-wave voltammetry influenced by the kinetics of reactant adsorption. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1988; 4: 248-239.

180. De Souza D, Machado SAS. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. *Química Nova*. 2003; 26:81-89.

181. Bockris JOM. Diffusion Coefficient of strong electrolytes. *J. Chem. Phys.* 1956, 24, 817-823.

182. Ferreira DC. Estudo teórico das reações de eletropolimerização dos ácidos 3-hidrofenilacético e 3-hidroxibenzóico e caracterização experimental do poli (ácido 3-hidroxibenzóico) [dissertação]. Uberlândia (MG): Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia; 2009.

183. Greenham NC, Friend RH. Semiconductor device physics of conjugated polymers, solid state physics. Henry Ehrenreich and Frans Spaepen; 1995.

184. Allen J. Bard, L. R. F. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. 2nd ed. John Wiley & Sons; 2000.

185. Janietz S, Bradley DDC, Grell M, Giebeler C, Inbasekaran M, Woo EP. Electrochemical determination of the ionization potential and electron affinity of poly (9,9-dioctylfluorene). *Applied Physics Letters*. 1998; 73(17):2453-2455.

186. Hummel RE. Electronic properties of materials, 2nd ed. Springer-Verlag Berlin: Heidelberg; 1992.

187. L.S. Roma et al, Appl. Phys. Lett. 1996; 105 (23): 10614-10619.

188. La-Scalea MA, Serrano SHP, Gutz IGR. DNA-modified electrodes: a new alternative for electroanalysis. Química Nova. 1999; 22(3):417-424.

189. Palecek E. From polarography of DNA to microanalysis with nucleic acid-modified electrodes. Electroanalysis. 1996; 8(1):7-14.

190. Ferreira DC, Rodrigues LP, Madurro JM, Brito-Madurro AG, Oliveira Júnior RTS, Abrahão Júnior O. Graphite Electrodes Modified with poly (3-hydroxybenzoic acid) for oligonucleotides sensors. International Journal of Electrochemical Science. 2014; 9:6246-6257.

191. Oliveira-Brett AM, Piedade JAP, Silva LA, Disculescu VC. Voltammetric determination of all DNA nucleotides. Analytical Biochemistry. 2004; 332:321-329.

192. Silva FB, Vieira SN, Goulart LR, Boodts JFC, Brito-Madurro AG, Madurro JM. Electrochemical investigation of nucleotide-DNA hybridization on poly (4-methoxyphenethylamine). International journal of molecular sciences. 2008; 9(7):1173-1187.

193. Pividori MI, Merkoci A, Alegret S. Biosensors and modern biospecific analytical techniques. Biosens Bioelectron. 2000; 15:291-303.

194. Lost RM, Madurro JM, Brito-Madurro AG, Nantes IL, Crespilho FN. Strategies of nano-manipulation for application in electrochemical biosensors. Int. J. Electrochem. Sci. 2011; 6:2965-2997.

-
195. Tlili C, Korri-Youssoufi H, Ponsonnet L, Martelet C, Jaffrezic-Renault NJ. Electrochemical impedance probing of DNA hybridisation on oligonucleotide-functionalised polypyrrole. *Talanta*. 2005; 68(1):131-137.
196. Allred DR, McGuire TC, Palmer GH, Leib SR, Harkins TM, McElwain TF, Barbet AF. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990; 87:3220-3224.
197. Alleman AR, Kamper SM, Viseshakul N, Barbet AF. Analysis of the *Anaplasma marginale* genome by pulsed-field electrophoresis. *Journal of general microbiology*. 1993; 139:2439-2444.
198. Eanache TA, Oliveira B. Peptide methionine sulfoxidase reductase A (MsrA): Direct electrochemical oxidation on carbon electrodes. *Bioelectrochemistry*. 2013; 89:11-18.
199. Tlili C, Korri-Youssoufi H, Ponsonnet L, Martelet C, Jaffrezic-Renault NJ. Electrochemical impedance probing of DNA hybridisation on oligonucleotide-functionalised polypyrrole. *Talanta*. 2005; 68(1):131-137.
200. Atkins P. *Princípios de Química: questionando a vida moderna e o meio ambiente*. 3. ed., Porto Alegre (RS): Bookman, 2010. 965 p.
201. Dalmolin C, Canobre SC, Biaggio SR, Rocha-Filho RC, Bocchi N. Electropolymerization of polyaniline on high surface area carbon substrates. *J. Electroanal. Chem*. 2005; 578(9):9-15.
202. Costa Neto PLO. *Estatística Básica*. 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2002. 345p.

-
203. Eriks IS, Palmer GH, McGuire TC, Allred DR, Barbet AF. Detection and quantitation of *Anaplasma marginale* in carrier cattle by using a nucleic acid probe. *J. Clin. Microbiol.* 1989; 27(2):279-284
204. Vidotto O, Marana ERM. Anaplasmosse bovina: aspectos epidemiológicos, clínicos e controle. *Semina: Ci.Agr.* 1999; 20(1):98-106.
205. Hu S, Lu Q, Xu Y. Biosensors based on direct electron transfer of protein. *Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications.* 2008; 3: 531-581.
206. D'Orazio P. Biosensors in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta.* 2003; 334(1-2):41-69.
207. Siswansyah DD. Prevalence of theileriosis, babesiosis and anaplasmosis in Australia. *J.S. Afr. vet. Med. Assoc.* 2008; 22(39):50-54.
208. Homola J, Koudela I, Yee SS. Surface plasmon resonance sensors based on diffraction gratings and prism couplers: sensitivity comparison. *Sensors and Actuators B.* 1999; 54: 16-24.
209. Damos F S, Mendes R K, Kubota L T. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. *Química Nova.* 2004; 27 (6): 970-979.
210. Brahim S, Narinesingh D, Guiseppi-Elie A. Polypyrrole-hydrogel composites for the construction of clinically important biosensors. *Biosensors and Bioelectronics.* 2002; 17:53-59.
211. Razola SS, Ruiz BL, Diez NM, Kauffmann JM. Hydrogen peroxidase sensitive amperometric biosensor based on horseradish Peroxidase entrapped in a polypyrrole electrode. *Biosensors and Bioelectron.* 2002; 17:921-928.

212. Tatsuma T, Gandaira M, Watanabe T. Peroxidase-incorporated Polypyrrole membrane electrodes. *Anal. Chem.* 1992; 64:1183-1187.

213. Pereira AC, Santos A, Kubota LT. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Química Nova.* 2002; 25:1012-102.

214. Ahujaa T, Mir I A, Kumara D, Rajesh. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. *Biomaterials.* 2007; 28(5): 791-805.