



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

**Preparação, caracterização e aplicação da plataforma baseada em
óxido de grafeno reduzido e poli(ácido 3-hidroxifenilacético) para
diagnóstico do vírus da dengue**

Doutoranda: Jussara Vieira da Silva

Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

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

UBERLÂNDIA – MG

2017

JUSSARA VIEIRA DA SILVA

**Preparação, caracterização e aplicação da plataforma baseada em
óxido de grafeno reduzido e poli(ácido 3-hidroxifenilacético) para
diagnóstico do vírus da dengue**

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

UBERLÂNDIA - MG

2017

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

S586p
2017

Silva, Jussara Vieira da, 1981-
Preparação, caracterização e aplicação da plataforma baseada em
óxido de grafeno reduzido e poli(ácido 3-hidroxifenilacético) para
diagnóstico do vírus da dengue / Jussara Vieira da Silva. - 2017.
133 f. : il.

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

1. Química - Teses. 2. Dengue - Diagnóstico - Teses. 3. Grafeno -
Teses. 4. Biossensores - Teses. I. Madurro, João Marcos. II. Brito-
Madurro, Ana Graci. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa
de Pós-Graduação em Química. IV. Título.



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



**Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química,
do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM QUÍMICA, NÚMERO 61/PPQUI.**

DATA: 20/02/2017

DISCENTE: Jussara Vieira da Silva

MATRÍCULA: 11313QMI005

TÍTULO DO TRABALHO: Preparação, caracterização e aplicação da plataforma baseada em óxido de grafeno reduzido e poli(ácido 3 - hidroxifenilacético) para diagnóstico do vírus da dengue.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Eletroquímica Aplicada

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Desenvolvimento de biossensores para rápida e específica diagnose da dengue.

Às quatorze horas do dia vinte de fevereiro do ano dois mil e dezessete, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, Bloco 5I, Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Iolanda Cruz Vieira, da Universidade Federal de Santa Catarina, Tulio Matencio, da Universidade Federal de Minas Gerais, André Luiz dos Santos e Ana Carolina Silva Siquieroli, da Universidade Federal de Uberlândia 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(a) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e a provou o(a) candidata(o). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será O mesmo

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 00 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Profª. Dra. Iolanda Cruz Vieira – UFSC

Prof. Dr. André Luiz dos Santos – UFU

Prof. Dr. Tulio Matencio –
UFMG

Profª Dra. Ana Carolina Silva Siquieroli – UFU

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

DEDICATÓRIA

*A Deus que é digno de toda honra e glória.
Ao meu querido marido Jairo Gonçalves
Pinheiro, aos meus Pais e irmãos por
acreditarem em meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela oportunidade e sabedoria para desenvolver este trabalho, e assim posso dizer *Ebenézer* “Até aqui me ajudou o Senhor”.

Ao meu marido Jairo Gonçalves Pinheiro por todo carinho, amizade, incentivo paciência e amor. Te amo.

Ao meus pais José esteves Silva e Maria da Glória Vieira Silva e aos meus irmãos Tadeu, Iara, Moisés, José Manoel e Ezequiel, pelo apoio e força durante esse tempo, amo muito vocês.

Ao meu irmão Ezequiel Silva e Daniel Pereira Rocha pelo incentivo, confiança e suporte no início dessa jornada, obrigada.

Aos meus sobrinhos, pelo amor e carinho.

À família Gonçalves Pinheiro por me acolheram com amor, obrigada pelo incentivo.

A todos do grupo de pesquisa LAFIP que me acolheram e me ajudaram, Ana Cristina, Bárbara Costa, Danielle, Deusmaque, Fábio, Felipe, Fellipy, Héden, Heliane, João Afonso, José Manuel, Leandro, Lídia, Lívia, Lucas Ferreira, Luciano, Patrick, Priscila, Rafaela e Rafael.

À minha família da fé, Igreja Batista do Amor, por todo conhecimento, amor, paciência e paz.

Aos membros da Banca pelo aceite na participação e pelas contribuições no aprimoramento deste trabalho.

À CAPES e FAPEMIG pela concessão das bolsas de estudos.

À todos do Instituto e Pós-Graduação em Química que sempre foram solistas.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram neste trabalho.

Ao Prof. João Marcos Madurro e a Profa. Ana Graci Brito-Madurro por me aceitarem e pela confiança depositada na minha pessoa para executar esse trabalho. Vocês me deram a oportunidade de realizar um grande sonho. Sou imensamente grata por tudo.

A todos estes, meu muito obrigada!

“E ainda que tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria”...

1 Coríntios 13.2

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xi
LISTA DE TABELAS	xvii
Resumo.....	xviii
ABSTRACT	xix
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 INCIDÊNCIA GLOBAL	1
1.2 Patogênese, sintomas e diagnóstico.....	4
1.3. Biossensores.....	8
1.3.1 Biossensores baseados em peptídeos	10
1.4. Técnicas de imobilização sobre o transdutor	12
1.5 Eletrodos modificados com filmes poliméricos.....	15
1.6 Nanocompósitos	20
1.7 Grafeno	20
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	29
3.1 Reagentes e soluções.....	29
3.2 Amostras biológicas	31
3.2.1 Oligonucleotídeos	31
3.2.2 Peptídeo mimético DV e soro humano	31
3.3 Aparatos e limpeza dos materiais	32
3.4. Procedimentos	34
3.4.1 Síntese e caracterização do óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido	35
3.4.2 Desenvolvimento e caracterização da plataforma baseada em óxido de grafeno reduzido e poli(ácido 3-hidroxifenilacético).....	38
3.4.3 Aplicação da plataforma para imobilização e detecção de oligonucleotídeos	40

3.4.4 Desenvolvimento e caracterização de um biossensor para diagnóstico da dengue.....	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1. Caracterização do óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido	48
4.1.2 Estudos de Infravermelho e Análise Elementar	48
4.1.3 Estudos por MEV e AFM	53
4.2. Caracterização do eletrodo de ouro modificado com OG-r e poli(3HFA)	55
4.2.1 Modificação do eletrodo de ouro com OG e OG-r.....	55
4.2.2 Obtenção do compósito polimérico baseado em OG-r e poli (3-HFA)	61
4.2.3 Caracterização eletroquímica do Au/ OG-r/poli(3-HFA).....	64
4.2.4 Estudos de Microscopia de Força Atômica	66
4.2.5 Estudos de estabilidade	67
4.3 Investigação da imobilização e detecção de Oligonucleotídeos	70
4.3.1 Detecção direta.....	70
4.3.2 Detecção indireta	74
4.4 Desenvolvimento e caracterização de um biossensor para diagnóstico da dengue	76
4.4.1 Imobilização do Peptídeo Mimético (DV)	76
4.4.2 Investigação da imobilização do peptídeo mimético (DV) e interação do mesmo com amostra real	79
4.4.3 Caracterizações de biofuncionalização com o peptídeo mimético (DV)	84
4.4.4 Estudo da sensibilidade e seletividade do biossensor	88
5 CONCLUSÕES	98
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

LISTA DE ABREVIATURAS

AFM	Microscopia de Força Atômica
A_p	Amplitude de pulso
BE	Brometo de etídio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EIE	Espectroscopia de impedância eletroquímica
FT-IR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
I_p	Corrente de pico
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NHS	N-hidroxissuccinimida
nm	nanômetro
OG	Óxido de Grafeno
OG-r	Óxido de Grafeno reduzido
OMS	Organização mundial da saúde
pI	Ponto isoelétrico
PM	Peptídeo mimético de sequência (ACLLRNASTCA)
poli(3-HFA)	Poli(ácido 3 – hidroxifenilacético)
R_s	Resistência ao transporte de íons
RNA	Ácido ribonucleico
R_{tc}	Resistência à transferência de carga
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
sDNA	DNA de fita simples
SPR	Ressonância de Plasmóns de superfície
Sulfo-NHS	N-hidroxisulfosuccinimida
T	Transmitância
v	Velocidade de varredura (mV s^{-1})
VC	Voltametria cíclica
VPD	Voltametria de pulso diferencial
UFC	Unidade formadora de colônias

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	Casos Prováveis, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2014 ^a , 2015 ^b , 2016 ^c (dados correspondentes à atualização nas datas: ^a 13/07/2015; ^b 27/09/2016; ^c 12/12/2016).....	2
FIGURA 2 -	Processo de infecção pelo vírus da dengue.....	4
FIGURA 3 -	Esquema representativo de um biossensor.....	8
FIGURA 4 -	<i>Biopanning</i> de uma biblioteca de exibição de fagos para selecionar a ligação do fago a um alvo imobilizado.....	11
FIGURA 5 -	Representação esquemática da formação da ligação amida através da reação catalisada por carbodiimida usando o sistema EDC/sulfo-NHS.....	14
FIGURA 6 -	Estruturas de polímeros condutores típicos empregados em biossensores.....	17
FIGURA 7 -	Monômero ácido 3- hidroxifenilacético.....	18
FIGURA 8 -	Mecanismo de eletropolimerização do poli(3-HFA).....	19
FIGURA 9 -	Estrutura do grafeno.....	21
FIGURA 10 -	Modelo estrutural do óxido de grafeno.....	24
FIGURA 11 -	Aplicações de compósitos baseados entre polímeros e derivados do grafeno.....	25
FIGURA 12 -	Imagem fotográfica da célula eletroquímica utilizada nos experimentos com indicação onde são colocados os eletrodos de trabalho (ET), referência (ER) e auxiliar (EA).....	33
FIGURA 13 -	Voltamograma cíclico do eletrodo de ouro em solução de H ₂ SO ₄ 0,5 mol L ⁻¹ , a 50 mVs ⁻¹ , entre 0,1 e 1,5V.....	34
FIGURA 14	Representação esquemática da metodologia empregada para a síntese do óxido de grafite.....	36
FIGURA 15 -	Imagem fotográfica do eletrodo de ouro (24 quilates, Ø = 3 mm)....	38
FIGURA 16 -	Representação esquemática do processo de obtenção do Au/OG-r/poli(3-HFA).....	39
FIGURA 17 -	Pareamento Watson-Crick de bases e os grupos eletroativos. (□) sítios de redução primária (o) sítios de oxidação primária. A= adenina, T= timina, C=citosina e G= guanina.....	41

FIGURA 18 -	Representação esquemática da metodologia de imobilização e detecção de oligonucleotídeos.....	43
FIGURA 19 -	Representação esquemática da imobilização do peptídeo sobre o Au/OG-r/poli(3-HFA) e interação com o anticorpo IgM presente em amostra de soro.....	47
FIGURA 20 -	Espectros de infravermelhos obtidos em pastilhas de KBr para: (a) grafite, (b) óxido de grafite e (c) óxido de grafeno reduzido.....	49
FIGURA 21 -	Figura demonstrativa das reações para obtenção do OG-r. Os modelos estruturais do óxido de grafite e OG-r são apenas ilustrativos.....	52
FIGURA 22 -	Figura demonstrativa da reação de redução dos grupos epóxido com hidrazina.....	53
FIGURA 23 -	Imagens de AFM para as folhas do OG esfoliado e altura do perfil em diferentes posições da superfície.....	53
FIGURA 24 -	Imagens de MEV do (a) grafite e (b) óxido de grafeno reduzido.....	54
FIGURA 25 -	Imagem fotográfica da dispersão aquosa do OG e OG-r.....	55
FIGURA 26 -	Imagem fotográfica do eletrodo de ouro sem modificação (Au) e modificado com OG-r (Au/OG-r).....	56
FIGURA 27 -	Voltamogramas cíclicos para (a) eletrodo de ouro sem modificação e modificado com diferentes dispersões de OG-r e (b) Gráfico de barra da quantidade de carga das diferentes dispersões. Eletrólito: H_2SO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$); $V = 100 \text{ mV s}^{-1}$	57
FIGURA 28 -	A) Diagrama de Nyquist B) Circuito equivalente que serve de modelo para explicar os dados experimentais. RS: resistência da solução; Rct: resistência à transferência de carga; W: impedância de Warburg; CDL: capacitância.....	58
FIGURA 29 -	(a) Diagramas de Nyquist e (b) voltamogramas cíclicos para: Au, Au/OG e Au/OG-r. Eletrólito: solução aquosa de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ contendo KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; Frequência: 10 KHz a $0,1 \text{ Hz}$; $V = 50 \text{ mV s}^{-1}$	59
FIGURA 30 -	Imagens de MEV para (a) superfície de ouro sem modificação e (b) modificada com OG-r.....	60

- FIGURA 31** - Voltamogramas cíclicos referentes à polimerização eletroquímica do ácido 3-hidroxifenilacético (25 mmol L^{-1} , em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) para (a) Au e (b) Au/OG-r. Total de 10 ciclos de varredura a 50 mV s^{-1}**62**
- FIGURA 32** - Voltamogramas cíclicos da primeira varredura de potencial para: (—) Au/poli(3-HFA) e (---) Au/OG-r/poli(3-HFA).....**63**
- FIGURA 33** - Voltamogramas cíclicos comparativos para (—) Au, (—) Au/poli(3-HFA) e (—) Au/OG-r/poli(3-HFA) em H_2SO_4 $0,01 \text{ M}$. $V=100 \text{ mVs}^{-1}$**64**
- FIGURA 34** - Voltamogramas cíclicos para (—) Au, (—) Au/poli(3-HFA) e (—) Au/OG-r/poli(3-HFA) em de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ contendo KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. $V=50 \text{ mVs}^{-1}$**65**
- FIGURA 35** - Imagens de AFM para (a) superfície de ouro sem modificação e (b) após a modificação com Au/OG-r/poli(3-HFA).....**66**
- FIGURA 36** - Porcentagem de carga relativa do Au/OG-r/poli(3-HFA) em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, a 100 mV s^{-1} para (a) varredura anódica e (b) varredura catódica.....**67**
- FIGURA 37** - Gráficos de barra referentes à carga versus tempo de armazenamento do Au/OG-r/poli3-HFA) para (a) varredura anódica e (b) varredura catódica, em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, 100 mV s^{-1}**69**
- FIGURA 38** - Voltametria de pulso diferencial do (a) Au/poli(3HFA) e (b) Au/OG-r/poli(3HFA) contendo a sonda poli(GA) (—) antes e (---) após a hibridização com o alvo poli(CT). Em (c) gráfico de barra referente às cargas envolvidas nos processos. Eletrólito: solução tampão fosfato $\text{pH}=7,4$**71**
- FIGURA 39** - Comparação esquemática da imobilização de oligonucleotídeo sobre a superfície do eletrodo (a) ante e (b) após a formação da dupla hélice.....**72**
- FIGURA 40** - (a) Voltamogramas de pulso diferencial do Au/OG-r/poli(3-HFA) contendo a sonda poli(GA) ($1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) antes e após a hibridização com diferentes concentrações de poli(CT) ($0,01$, $0,1$, 1 e $1,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). (b) Curva de calibração das diferentes concentrações. Eletrólito suporte: solução tampão fosfato $\text{pH}=7,4$**73**

- FIGURA 41 -** Voltamogramas de pulso diferencial do brometo de etídio sobre (a) Au/poli(3-HFA) e (b) Au/OG-r/poli(3-HFA), contendo a sonda poli(GA) (—) antes e (---) após a hibridização como alvo complementar poli(CT). Em (c) gráfico de barra referente às cargas envolvidas nos processos. Eletrólito suporte: solução tampão fosfato pH=7,4.....**74**
- FIGURA 42 -** Imagens representativas do brometo de etídio intercalado em (a) fita simples do DNA (b) após a formação da dupla hélice de DNA.....**76**
- FIGURA 43 -** Voltamograma de pulso diferencial do Au/OG-r/poli(3-HFA) após a imobilização do Peptídeo mimético DV(1 µg/mL). Eletrólito suporte: solução tampão fosfato pH=7,4.....**77**
- FIGURA 44 -** Voltamograma de pulso diferencial do Au/OG-r/poli(3-HFA) após a imobilização do Peptídeo mimético DV (1 µg/mL), cisteamina (100 µmol L⁻¹) e aminoácido cisteína (100 µmol L⁻¹). Eletrólito suporte: solução tampão fosfato pH=7,4.....**78**
- FIGURA 45 -** Au/OG-r/poli(3-HFA) após a imobilização do PMDV para: (a) resposta de corrente do tempo de ativação das carboxilas com EDC/NHS; (b) resposta de corrente do tempo de imobilização do PMDV (1 µg/mL); (c) voltamogramas de pulso diferencial (—) antes e (---) após a lavagem com etanolamina. Eletrólito suporte: solução tampão fosfato pH=7,4.....**80**
- FIGURA 46 -** Voltamograma de pulso diferencial do Au/OG-r/poli(3-HFA)-PMDV após a interação com anticorpos de uma amostra do soro positivo (diluição 1:100) em diferentes tempos (30, 40, 50 e 60 minutos). Inserido, resposta de corrente dos processos. Eletrólito suporte: solução tampão fosfato pH=7,4.....**81**
- FIGURA 47 -** Voltamograma de pulso diferencial do Au/OG-r/poli(3-HFA) após a imobilização do peptídeo mimético (DV) (1µg/mL) sem ativação das carboxilas com EDC/NHS e, após a interação do peptídeo mimético (DV) com amostras de soro positivo e negativo (diluição 1:100, tempo 40 minutos). Eletrólito suporte: solução tampão fosfato pH=7,4.....**82**

- FIGURA 48 -** Voltamograma de pulso diferencial do eletrodo de ouro modificado com OG-r após imobilização do peptídeo mimético DV ($1\mu\text{g/mL}$, 30 minutos). Eletrólito suporte: solução tampão fosfato $\text{pH}=7,4$**83**
- FIGURA 49 -** Voltamogramas cíclicos referentes ao 1º ciclo de varredura obtido para: Au (—), Au/ OG-r/poli(3-HFA) (—) e Au/ OG-r/poli(3-HFA)/PMDV (—). Eletrólito suporte: solução de ferro/ferricianeto de potássio $5,0\text{ mmol L}^{-1}$ contendo KCl $0,1\text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH}=6,5$. $V=50\text{ mV s}^{-1}$**84**
- FIGURA 50 -** Diagramas de Nyquist para Au, Au (●), Au/ OG-r/poli(3-HFA) (●) e Au/ OG-r/poli(3-HFA)/PMDV (●) obtidos a potencial de circuito aberto. Os espectros foram obtidos com a frequência variando de 100 KHz a 10^{-1} KHz . Inserido: circuito equivalente usado para a simulação dos dados experimentais da impedância. Eletrólito suporte: solução de ferro/ferricianeto de potássio $5,0\text{ mmol L}^{-1}$ contendo KCl $0,1\text{ molmol L}^{-1}$, $\text{pH } 6,5$**86**
- FIGURA 51 -** Imagens de AFM para Au/OG-r/poli(3-HFA) (a) antes e (b) após a imobilização do peptídeo mimético (DV).....**87**
- FIGURA 52 -** (a) Voltamogramas de pulso diferencial do Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV como diferentes diluições de um *pool* de amostras de soro positivo. (b) Curva de calibração das diferentes diluições ($n=3$). Eletrólito suporte: solução tampão fosfato $\text{pH}=7,4$**89**
- FIGURA 53 -** (a) Voltamogramas cíclicos (b) Diagramas de Nyquist em solução de ferro/ferricianeto de potássio $5,0\text{ mmol L}^{-1}$ contendo KCl $0,1\text{ molmol L}^{-1}$, $\text{pH } 6,5$. (c) Voltamogramas de pulso diferencial em solução tampão fosfato $\text{pH}=7,4$. Para: (—) Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV, (—) Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV + soro+ e (—) Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV + soro-. Inserido em B, circuito equivalente usado para a simulação dos dados experimentais da impedância. Inserido em C, resposta de corrente dos diferentes sistemas.....**92**

- FIGURA 54 -** Imagens de AFM de (a) Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV e, após a interação com (b) soro positivo e (c) interação com soro negativo. Diluição 1:100, tempo de interação 40 minutos.....**94**
- FIGURA 55 -** Variação da corrente em função do tempo de estocagem em dias. Todas as medidas foram realizadas com a mesma amostra de soro.**96**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Casos graves, com sinais de alarme e óbitos por dengue confirmados, até a Semana Epidemiológica 32, em 2015 e 2016, por região	3
TABELA 2 -	Limites de detecção para biossensores da dengue.....	7
TABELA 3 -	Métodos de oxidação do grafite para óxido de grafite.....	22
TABELA 4 -	Reagentes utilizados nos experimentos, com as correspondentes abreviação ou fórmula química e empresa de fabricação.....	30
TABELA 5 -	Valores obtidos das velocidades de varredura (v) e Amplitudes de pulso (Ap), utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial.	44
TABELA 6 -	Posição dos picos e bandas de absorção obtida por FT-IR e suas atribuições para: grafite, OG e OG-r.....	50
TABELA 7 -	Dados da Análise elementar realizada por combustão para OG e OG-r.....	51
TABELA 8 -	Parâmetros obtidos por simulação aos dados de EIE para Au, Au/OG-r/poli(3-HFA) e Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV1.....	86
TABELA 9 -	Parâmetros obtidos por simulação aos dados de EIE para Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV1, Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV1/Soro+, Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV1/ Soro-.....	93
TABELA 10 -	Valores de rugosidade de diferentes superfícies.....	94

RESUMO

Silva, J. V. **Preparação, caracterização e aplicação da plataforma baseada em óxido de grafeno reduzido e poli(ácido 3-hidroxifenilacético) para diagnóstico do vírus da dengue.** Tese de Doutorado em Química, Instituto de Química-UFU, 2017.

A dengue é uma doença infecciosa aguda transmitida pela picada do mosquito *Aedes aegypti* infectado. Essa doença é considerada um dos principais problemas de saúde pública do mundo. A evolução da dengue é rápida e os sintomas são inespecíficos podendo ser confundidos com os de outras doenças infecciosas. Neste caso, um diagnóstico clínico é difícil sendo necessário um diagnóstico laboratorial. Os biossensores são uma alternativa interessante devido à possibilidade de produzir dispositivos de baixo custo, sensíveis, miniaturizados e simples para diagnóstico descentralizado. Neste trabalho, foi explorada uma plataforma baseada em óxido de grafeno reduzido (OG-r) e poli(ácido 3-hidroxifenilacético), a qual foi empregada para diagnóstico do vírus da dengue do tipo 3, por voltametria de pulso diferencial. O óxido de grafeno (OG) e óxido de grafeno reduzido (OG-r) foram obtidos a partir da oxidação do grafite pelo método de Hummers e redução química com hidrazina, respectivamente. As modificações químicas dos materiais foram confirmadas por espectroscopia no infravermelho. Imagens de microscopia de força atômica (AFM) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelaram que o OG apresenta uma espessura de cerca de 1,27 nm e que o OG-r tem uma estrutura enrugada. Estudos de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) evidenciaram que o OG-r apresenta propriedades eletroquímicas superiores ao OG e o eletrodo de ouro sem modificação. O eletrodo modificado com OG-r favorece a formação de um nanocompósito polimérico com propriedades eletroquímicas superiores, quando comparado ao eletrodo sem modificação. A plataforma apresentou boa estabilidade eletroquímica após estocagem durante 120 dias. Além disso, apresentou eficiência para imobilização e hibridização de oligonucleotídeos, tanto pela oxidação eletroquímica direta da guanina quanto por oxidação indireta usando o intercalador eletroativo (brometo de etídio). Esses resultados mostraram que a plataforma pode ser aplicada para o desenvolvimento de genossensores. O peptídeo mimético foi imobilizado covalentemente sobre a plataforma. Esse processo foi confirmado por VC, EIE e AFM. O biossensor reconheceu anticorpos IgM presentes em amostras de soro de pacientes infectados com o vírus da dengue em altas diluições (1:1.000 e 1:10.000), evidenciando a sensibilidade do sistema. Além disso, foi capaz de discriminar qualitativamente amostras de soro de pacientes com dengue dos controles saudáveis, por diferentes técnicas de detecção. O biossensor manteve-se funcional após 40 dias de estocagem, mantendo 90,1 % da sua capacidade inicial. Devido à alta sensibilidade do sistema e a utilização de amostras reais, o biossensor é promissor para sua aplicabilidade em diagnósticos clínicos específicos, na fase crítica da doença e em tempo real.

Palavras chave: dengue, grafeno, ácido 3-hidroxifenilacético, peptídeo mimético, nanocompósito polimérico, biossensor eletroquímico.

ABSTRACT

Silva, J. V. **Preparation, characterization and application of the platform based on reduced graphene oxide and poly (3-hydroxyphenylacetic acid) for the diagnosis of dengue virus**. Thesis in Chemistry, Institute of Chemistry - UFU, 2017.

Dengue is an acute infectious disease transmitted by the sting of the infected mosquito *Aedes aegypti*. It is considered one of the main public health problem worldwide. The evolution of dengue is fast and the symptoms are unspecific and can be mistaken with other infectious illness. In this case, clinical diagnosis is difficult, making necessary a medical laboratory. Biosensors are an interesting alternative due to the possibility of producing low-cost, sensitive, miniaturized and simple devices for decentralized diagnosis. This work was explored a platform based on reduced graphene oxide (OG-r) and poly (3-hydroxyphenylacetic acid), for diagnosis of dengue virus type 3 by differential pulse voltammetry. Graphene oxide (OG) and OG-r were obtained from the oxidation of graphite by the Hummers method and chemical reduction with hydrazine, respectively. The chemical modifications of the materials were confirmed by Infrared Spectroscopy. Images of atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM) revealed that the OG has a thickness of 1.27 nm and that the OG-r has a wrinkled structure. Cyclic voltammetry (VC) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) showed that the OG-r presents electrochemical properties superior to the OG and the gold electrode without modification. The electrode modified with OG-r provides the formation of a polymeric nanocomposite with superior electrochemical properties, in comparison to the electrode without modification. The platform presented good electrochemical stability after a storage time of 120 days. In addition, it exhibited high efficiency for immobilization and oligonucleotide hybridization by both direct electrochemical oxidation of guanine and indirect oxidation using the electroactive intercalator (ethidium bromide). These results showed that the platform can be applied to the development of genosensors. The mimetic peptide was immobilized covalently on the platform and this process was confirmed by CV, EIE and AFM. The biosensor recognized IgM antibodies present in serum samples from patients infected with dengue virus at high dilutions (1:1000 and 1:10000), evidencing the high sensitivity of the system. In addition, it was able to qualitatively discriminate serum samples from dengue patients from healthy controls by different detection techniques. The biosensor remained functional after 40 days of storage, maintaining 90.1% of its initial capacity. Thus, due to the high sensitivity of the system and the use of real samples, this biosensor becomes promising for specific clinical diagnoses, can be used in the critical phase of the disease and in real time.

Keywords: dengue, graphene, 3-hydroxyphenylacetic acid, mimetic peptide, polymeric nanocomposite, electrochemical biosensor.

1 INTRODUÇÃO

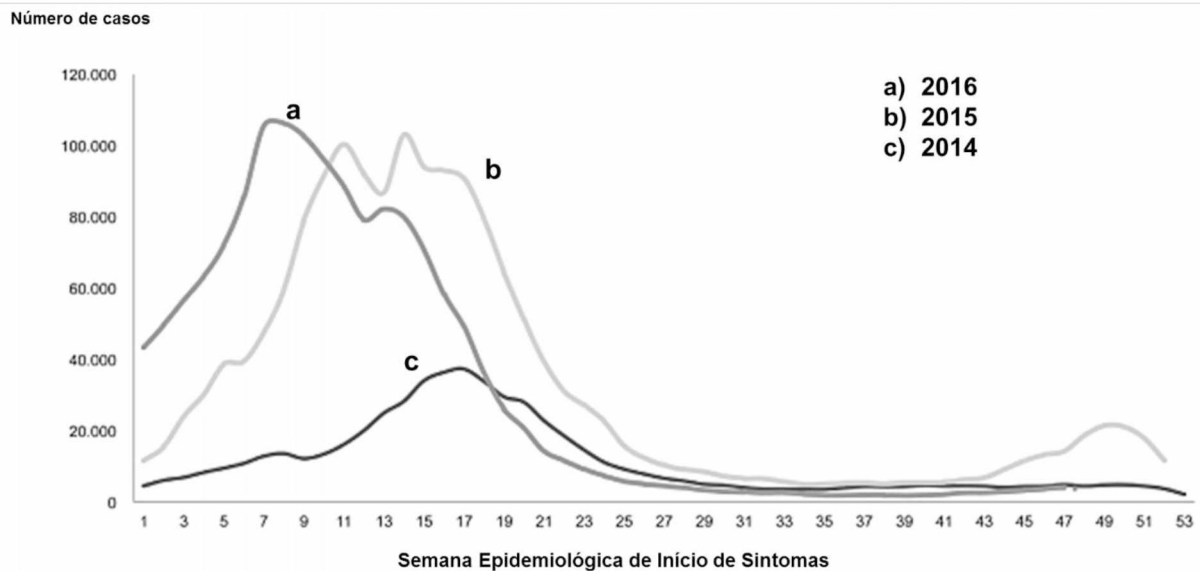
A dengue é uma doença viral que pertence ao gênero *Flavivirus* e à família *Flaviviridae*. Ela é transmitida pela picada da fêmea do mosquito *Aedes aegypti* infectada com o vírus cujo genoma é constituído de um RNA de cadeia simples. O vírus da dengue é uma das arboviroses (virose transmitidas por artrópodes hematófagos) mais importantes do mundo, causada por 4 sorotipos antigenicamente diferentes (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), que provocam a mesma doença no ser humano. A severidade da infecção em um paciente com dengue é influenciada por antecedentes genéticos do mesmo, pela idade, histórico de infecções prévias por dengue e a linhagem e o sorotipo do vírus infectante (HALSTEAD, 2007). A doença pode se manifestar de forma mais simples conhecida como dengue clássica e de formas mais graves, como a dengue hemorrágica, sendo que a síndrome do choque por dengue pode levar o paciente a óbito (ASHLEY, 2011).

1.1 INCIDÊNCIA GLOBAL

A doença tem chamado atenção pois, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, de 2010 a 2013 houve um aumento de aproximadamente 3 milhões de casos nas regiões das Américas, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental. A prevalência mundial da dengue tem crescido dramaticamente nas últimas décadas. Cerca de 3,9 bilhões de pessoas em 128 países (56% da população mundial) vivem em área de risco da dengue (WHO, 2016). Estima-se que ocorram aproximadamente 390 milhões de casos anualmente dos quais 2 milhões de casos graves resultam em milhares de mortes (SINAWANG *et al.*, 2016).

No Brasil, a transmissão do vírus vem ocorrendo continuamente desde 1982/1983, intercalando-se com a ocorrência de epidemias e estando associada com a introdução de novos sorotipos em áreas íntegras. No ano de 2010, já havia sido notificada a circulação dos 4 sorotipos no país (SEGURADO; CASSENTE; LUNA, 2016). Um dos maiores surtos no país ocorreu em 2013, com aproximadamente 2 milhões de casos notificados. Em 2015 de acordo com o 47º Boletim Epidemiológico nº 38, da 1ª até a 52ª semana epidemiológica foram registrados 1.688.888 casos prováveis, e em 2014, 589.107 (BRASIL, 2016).

Figura 1: Casos prováveis, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2014^a, 2015^b, 2016^c (dados correspondentes à atualização nas datas: ^a13/07/2015; ^b27/09/2016; ^c12/12/2016)



Fonte: Boletim Epidemiológico, 2016

O 47º Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde mostrou recentemente que em 2016 até a Semana Epidemiológica (SE) 49 (3/1/2016 a 10/12/2016) foram registrados 1.487.924 casos prováveis de dengue no país (Figura 1). Nesse período, os maiores números de casos foram registrados na região sudeste com 855.425 casos; correspondente a 57,5%. Além disso, foram confirmados 826 casos de dengue grave, 8.116 casos de dengue com sinais de alarme e confirmados 609 óbitos. Neste mesmo período de 2015 foram confirmados 972 óbitos (Tabela 1). O Boletim Epidemiológico informa ainda que, existem 406 casos de dengue grave ou dengue com sinais de alarme e 621 óbitos sob investigação que podem ser confirmados ou descartados (BRASIL, 2016).

Tabela 1: Casos graves, com sinais de alarme e óbitos por dengue confirmados, até a Semana Epidemiológica 49, em 2015 e 2016, por região.

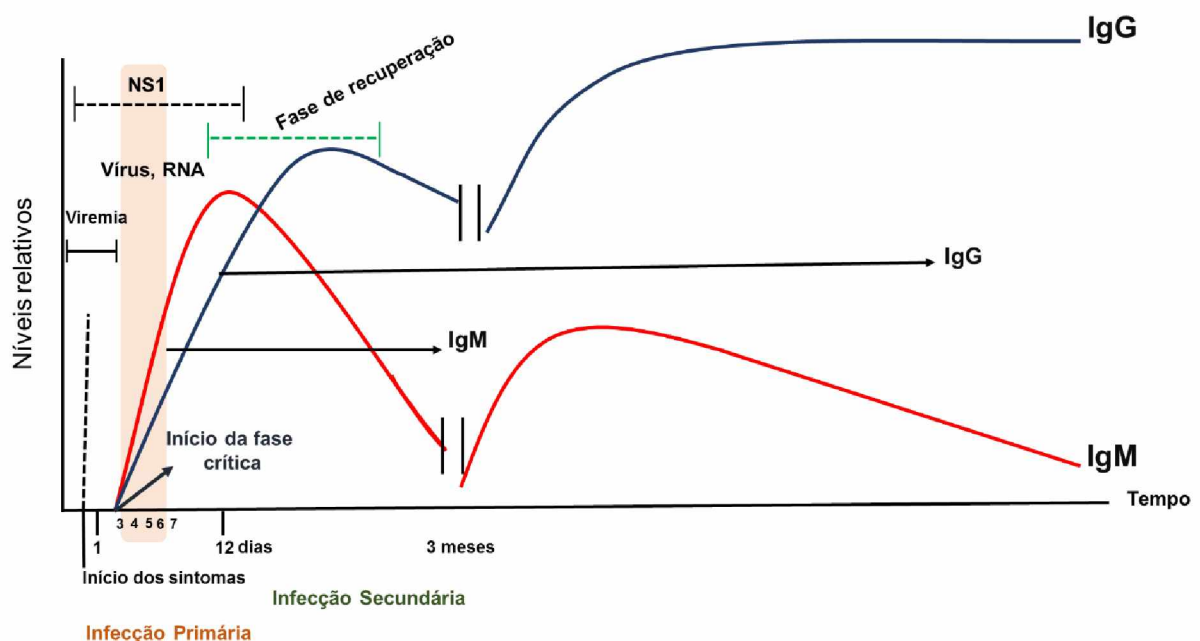
Região/ Unidade da Federação	Casos confirmados (n)				Óbitos confirmados (n)	
	2015 ^a		2016 ^b		2015 ^a	2016 ^b
	Dengue grave	Dengue com sinais de alarme	Dengue grave	Dengue com sinais de alarme		
Norte	45	118	12	87	19	4
Acre	0	2	0	0	0	0
Amapá	16	32	2	16	2	1
Amazonas	3	9	2	8	3	1
Pará	12	36	2	36	5	0
Rondônia	5	12	6	10	3	2
Roraima	0	10	0	3	0	0
Tocantins	9	17	0	14	6	0
Nordeste	269	1,157	93	416	149	89
Alagoas	15	98	8	14	6	7
Bahia	29	43	4	13	14	5
Ceará	121	671	44	188	68	28
Maranhão	26	44	11	33	11	12
Paraíba	11	77	8	52	6	7
Pernambuco	33	132	8	61	32	14
Piauí	19	44	5	6	2	1
Rio Grande do Norte	10	46	5	48	8	15
Sergipe	5	2	0	1	2	0
Sudeste	928	15,505	433	3,728	631	379
Espírito Santo	82	667	39	362	25	17
Minas gerais	127	1,023	264	1,848	73	246
Rio de Janeiro	53	418	22	367	30	15
São Paulo	666	13,397	108	1,151	503	101
Sul	99	546	128	621	25	66
Paraná	96	425	119	525	23	63
Rio Grande do Sul	2	9	7	34	2	1
Santa Catarina	1	112	2	62	0	2
Centro-Oeste	339	3,829	160	3,264	148	71
Distrito Federal	30	75	39	449	25	22
Goiás	282	3,393	98	2,526	98	27
Mato Grosso	13	59	6	12	8	5
Mato Grosso do Sul	14	302	17	277	17	17
Brasil	1,680	21,155	826	8,116	972	609

Fonte: Autor, 2016. Adaptado de Boletim Epidemiológico

1.2 PATOGÊNESE, SINTOMAS E DIAGNÓSTICO

Atualmente, existem muitos esforços para criar um único ensaio para diagnosticar os 4 sorotipos do vírus da dengue, o qual deve ser rápido, sensível e de baixo custo. Entretanto, este objetivo ainda não foi alcançado. A compreensão das condições clínicas do paciente com dengue ainda é muito importante para um diagnóstico preciso. Existem duas fases no diagnóstico da dengue (Figura 2), a primeira é conhecida como infecção primária, ou seja, a fase febril quando o paciente está com a viremia; a segunda fase (infecção secundária) ocorre quando o paciente começa a formar anticorpos específicos de dengue (RATHAKRISHNAN; SEKARAN, 2013). Observa-se na figura 2 que o vírus (juntamente com seu material genético (RNA) e o antígeno característico (proteína NS1)) pode ser encontrado no organismo no período febril (viremia) e se estender até o final da fase crítica. A produção de anticorpos (IgM e IgG) se inicia na fase crítica e atinge o pico na fase de recuperação, permanecendo em níveis reduzidos no organismo podendo ter seus níveis aumentados rapidamente após uma reinfecção.

Figura 2: Processo de infecção pelo vírus da dengue.



Fonte: Autor, 2016. Adaptado de Rathakrishnan A.

Após uma pessoa ser picada, ocorre o período de incubação do vírus que varia entre 3 a 7 dias. No período de infecção primária, o indivíduo desenvolve altos níveis do anticorpo IgM (3 a 5 dias) e, na infecção secundária após 7-10 dias, altos níveis de IgG são detectados (MOI *et al.*, 2013). No período da infecção primária, o paciente pode ou não apresentar sintomas. Entretanto, a infecção viral comumente inicia com períodos febris, durando de 2 a 3 dias, seguido de sintomas não específicos como cefaleia, mialgia, artralgia, prostração, náuseas, anorexia, dor retro-orbital, prurido cutâneo, exantema e vômitos. Os sintomas podem variar entre cada pessoa e também com a idade, sendo a presença de dor abdominal mais comum em crianças e, em adultos, manifestações hemorrágicas.

Após o período febril, o paciente pode apresentar sintomas mais graves característicos da dengue hemorrágica, como por exemplo, hepatomegalia, febre muito alta ($> 39^{\circ}\text{C}$), colapso circulatório e manifestações hemorrágicas (SRIKIATKHACHORN, 2009). O quadro pode se agravar e o paciente progride para um estado de choque, proveniente da síndrome do choque por dengue, neste caso alguns sintomas comuns são a queda ou ausência de pressão arterial, acompanhado de inquietação, palidez e perda de consciência. Em casos graves o paciente pode vir a óbito (GULATI *et al.*, 2016).

Nesse sentido, apenas as informações clínicas dificultam um diagnóstico preciso da doença uma vez que os mesmos são inespecíficos e podem imitar um largo espectro de doenças febris, incluindo: *chikungunya* e mononucleose infecciosa, além de outras infecções por enterovírus, riquetsia, *parvovirus* B19, sarampo, rubéola, malária, leptospirose e sepse bacteriana. Além disso, a dengue hemorrágica pode imitar a meningite meningocócica, infecções por hantavírus e outras febres hemorrágicas virais.

Testes laboratoriais fazem-se necessários para um diagnóstico definitivo, consistindo de métodos diretos e indiretos. Os métodos diretos incluem o isolamento do vírus, detecção do genoma e a detecção de antígenos do vírus. Já os métodos indiretos consistem na sorologia para a detecção de anticorpos específicos (IgG ou IgM). Nos métodos diretos, o diagnóstico pode ser realizado em amostras de sangue ou tecido coletados até sete dias após o início do período febril. Já nos métodos indiretos, são necessários pelo menos cinco dias para apresentarem positividade (PEELING *et al.*, 2010).

Nesse sentido, alguns métodos comumente usados para confirmar a infecção pela dengue são: a transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR), alterações nos níveis de anticorpos IgM e IgG, e antígenos do vírus da dengue, pela proteína NS1, detectados através do exame de imunofluorescência (ELISA) (LINARES *et al.*, 2013; TEOH *et al.*, 2015).

O diagnóstico através da PCR é muito utilizado nos primeiros dias na fase da viremia, devido a baixos níveis dos anticorpos. Apesar de sua acurácia e permitir um diagnóstico precoce, esse método consome muito tempo e podem ser realizados apenas em uma curta janela de viremia, ou seja, até o quinto dia da doença. Além disso, este método é passível de contaminação com *amplicons*, podendo apresentar resultados falso-positivos (GUZMÁN; KOURI, 2002; GUZMAN *et al.*, 2002). Em adição, a metodologia demanda pessoal e equipamento especializado, inviabilizando o uso em campo (FRY *et al.*, 2011).

O método de ELISA utiliza marcadores que requerem um procedimento de preparação da amostra menos elaborada do que a de PCR. Entretanto, os testes apresentam baixa especificidade e sensibilidade, quando comparada à PCR. Além disso, o método não é muito específico devido a possíveis reações cruzadas com outros Flavivirus (TELES; PRAZERES; LIMA-FILHO, 2005).

O método utilizando a proteína NS1 é amplamente utilizado dentre todas as proteínas, pois este antígeno se encontra livre no soro de pacientes antes do início dos sintomas até cinco dias depois, viabilizando um diagnóstico precoce (ALCON *et al.*, 2002). Entretanto esse método se torna limitado durante a infecção secundária, pois a detecção da proteína fica prejudicada pela formação de imunocomplexos de IgG com o vírus (PEELING *et al.*, 2010).

Nesse contexto, a busca por outras metodologias que visam um diagnóstico precoce e com acurácia têm crescido nos últimos anos, como mostra a Tabela 2:

Tabela 2: Limites de detecção para biossensores da dengue

Transdutor	Analito (alvo)	Limite de detecção (LD)	Amostra	Referências
Piezoelétrico	sDNA	2 PFU/mL	Sangue	(CHEN <i>et al.</i> , 2009)
	NS1	0,74 µg/mL	Soro	(WU, T. Z. <i>et al.</i> , 2005)
	NS1	1-10 µg/mL	Sangue	(TAI <i>et al.</i> , 2006)
Óptico	NS1	5.73 pg/mm ²	Plasma Sanguíneo	(WONG <i>et al.</i> , 2016)
	IgM	12 pg/mm ²	Plasma sanguíneo	(WONG <i>et al.</i> , 2014)
	IgM	-	Soro	(JAHANSHAH <i>et al.</i> , 2014)
	IgM	-	Soro	(KUMBHAT <i>et al.</i> , 2010)
Eletroquímico	sDNA	7.12 nmol/L	-	(SILVA, T. A. R. <i>et al.</i> , 2009)
	IgG	-	Soro	(LUNA, D. M. N. <i>et al.</i> , 2015)
	NS1	12 ng/mL	Soro	(DIAS <i>et al.</i> , 2013)
	RNA	1 fmol/L	-	(JIN, S.-A. <i>et al.</i> , 2016)
	NS1	0,5 ng/mL	-	(SINAWANG <i>et al.</i> , 2016)

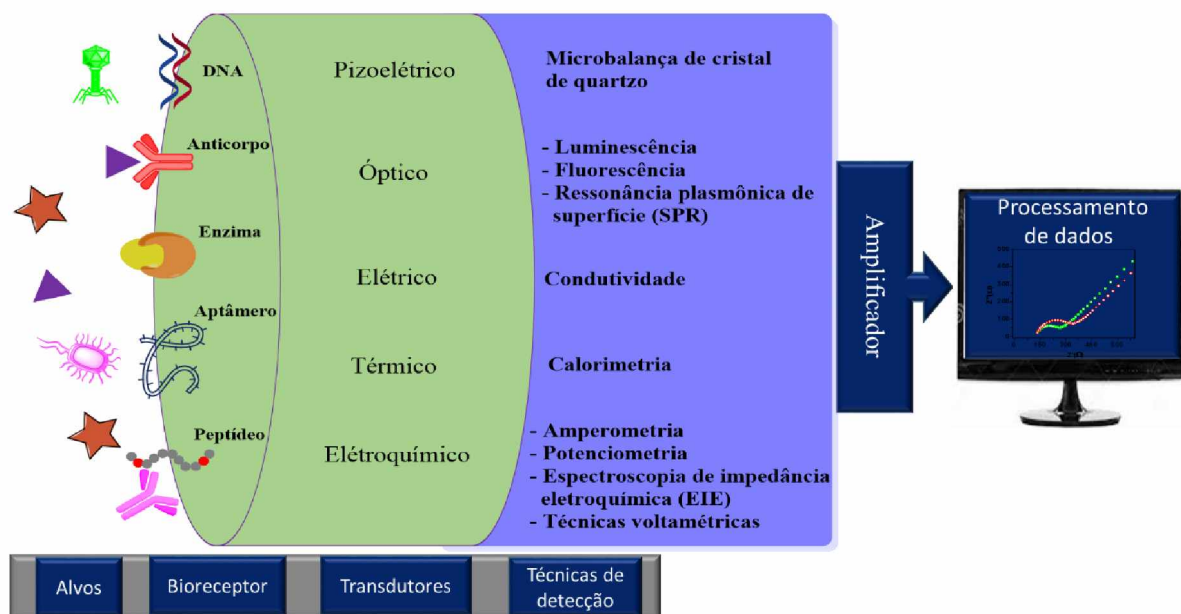
Fonte: Autor, 2016.

Diante dessas evidências, faz-se necessário ainda um teste diagnóstico que seja: específico, de baixo custo, rápido, de fácil execução, com alta sensibilidade e estável a temperatura ambiente (para trabalhos de campo). Dentro dessa perspectiva, os biossensores surgem como alternativa promissora, pois consistem das características necessárias para diagnóstico de doenças.

1.3. BIOSSENSORES

Os biossensores são ferramentas analíticas com algum elemento biológico incorporado (denominado biorreceptor) que, em contato com um transdutor, são capazes de converter o evento de reconhecimento em um sinal mensurável (TURNER, 2013). São constituídos de três elementos principais, o biorreceptor, o transdutor e o sistema de processamento de sinal (Figura 3).

Figura 3: Esquema representativo de um biossensor



Fonte: Autor, 2016.

A principal função do biorreceptor é fornecer ao sistema um grau de seletividade elevado em relação ao analito, mesmo dentro de amostras complexas (THEVENOT *et al.*, 2001). Neste caso, os biossensores são classificados de acordo com o componente biológico imobilizado, sendo chamado de enzimáticos, quando o componente biológico é uma enzima; genossensores, quando as biomoléculas são oligonucleotídeos; microbiológicos, quando o componente é representado por fungos, bactérias, organelas vegetais e animais dentre outros e imunossensores, quando as biomoléculas são antígenos ou anticorpos. Em adição, uma classe denominada biossensores miméticos, utilizam moléculas artificiais ou sintéticas como elemento de reconhecimento biológico que mimetizam uma biomolécula natural. Biossensores que

utilizam aptâmeros ou peptídeos como biorreceptores são comumente incluídos nessa classificação (PERUMAL; HASHIM, 2014).

A reação entre o analito e biorreceptor promove mudanças químicas, tais como geração de um novo produto químico, liberação de calor, fluxo de elétrons e alterações do pH ou da massa. O sinal bioquímico é convertido pelo transdutor, amplificado e enviado para um processador de dados, sendo possível ser visualizado e armazenado (PERUMAL; HASHIM, 2014). Vários sistemas de transdução podem ser utilizados para o desenvolvimento dos biossensores como por exemplo, óptico, pizoelétrico, elétrico, térmico e eletroquímico.

Dentre os transdutores citados, os sensores e biossensores eletroquímicos têm chamado a atenção, pois viabilizam dispositivos de fácil manuseio, baixo custo e medidas em tempo real. Além disso, são particularmente adequados para miniaturização e portabilidade, viabilizando o uso de poucas quantidades de amostra. Incluem também vantagens como capacidade de multiplexação, alta sensibilidade e especificidade de bioreconhecimento (JIN, S.-A. *et al.*, 2016). Eles podem eliminar, reduzir ou ainda simplificar o pré-tratamento de amostras. Os principais campos de aplicação são: diagnóstico de doenças (SOUTO *et al.*, 2013), segurança alimentar (MCGRATH *et al.*, 2013), monitoramento ambiental (WANG, X.; LU; CHEN, 2014) e análise forense (YANEZ-SEDENO *et al.*, 2014).

Neste tipo de dispositivo, o componente biológico é imobilizado diretamente no transdutor eletroquímico. As técnicas eletroquímicas utilizadas no desenvolvimento dos biossensores geram sinais como corrente, potencial e resistência. Esses sinais apresentam relação direta com o analito, sendo possível fazer análises quantitativas e qualitativas (ARREDONDO *et al.*, 2012). Neste trabalho, foram utilizadas as técnicas de voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e espectroscopia de impedância eletroquímica. Esse conjunto de técnicas pode nos fornecer informações sobre reações que ocorrem na interface eletrodo-solução. Como por exemplo, é possível acompanhar processos de imobilização do componente biológico bem como o evento de bioreconhecimento (SINAWANG *et al.*, 2016).

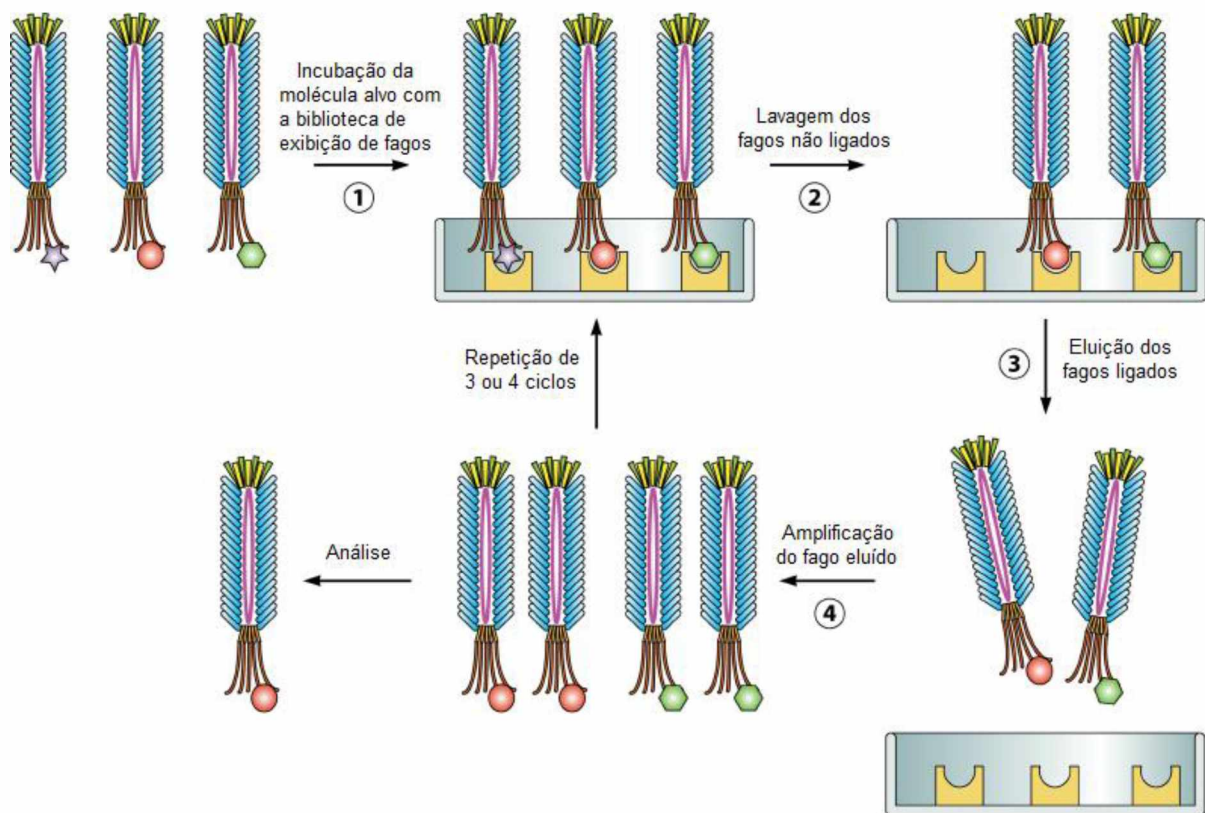
Dentro dessa perspectiva, o uso de biomarcadores (biorreceptor) que garantam a sensibilidade, seletividade, especificidade e estabilidade são fundamentais para o desenvolvimento dos biossensores.

1.3.1 Biossensores baseados em peptídeos

Peptídeos são pequenos polímeros formados a partir de aminoácidos unidos por intermédio de ligações peptídicas, estabelecidas entre um grupo α -amino de um aminoácido e um grupo α -carboxílico de outro aminoácido (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2012). Atualmente, peptídeos miméticos podem ser sintetizados por *phage display*, que é uma técnica de clonagem utilizada em biologia molecular, comumente empregada para produzir moléculas sintéticas que são equivalentes a biomoléculas naturais. Assim, é possível selecionar e separar vetores de clonagem gerados a partir de bibliotecas genômicas, juntamente com seu produto gênico como, por exemplo, os peptídeos. Através de fagos infecciosos filamentosos, a técnica permite rastrear os clones devido à ligação do peptídeo de interesse com o vetor de clonagem que o expressou (WILSON; WALKER, 2010).

Phage display tem sido empregado com a finalidade de identificar ligantes por meio de interações moleculares e obter informações sobre a relação receptor-ligante. As proteínas ou peptídeos expressos na superfície do fago possibilitam a seleção da sequência baseada na afinidade de ligação com o alvo por um processo de seleção *in vitro* denominado *biopanning* (PARMLEY; SMITH, 1985; SMITH, 1988). Dessa maneira, uma biblioteca é gerada com os alvos de interesse e o sistema funciona pela incorporação do alvo em um suporte sólido. Em seguida, o alvo é incubado com uma população de fagos. Neste caso, os fagos contendo peptídeos que apresentam afinidade pelo alvo são capturados. No processo de lavagem, os fagos não ligantes são eliminados e os específicos permanecem ligados para posterior eluição. Um conjunto de fagos específicos é amplificado em ciclos posteriores de seleção biológica, incluindo ligação, eluição e amplificação (Figura 4). Esse processo promove o enriquecimento dos peptídeos com sequências específicas para reconhecimento do alvo. Depois de três ou quatro ciclos, os clones selecionados são caracterizados individualmente por sequenciamento de DNA, *Western blotting* ou ELISA (SMITH, 1985).

Figura 4: *Biopanning* de uma biblioteca de exibição de fagos para selecionar a ligação do fago a um alvo imobilizado (HUANG; BISHOP-HURLEY; COOPER, 2012).



Fonte: HUANG; BISHOP-HURLEY; COOPER, 2012

No *biopanning* são selecionados fagos ligantes aos anticorpos e portanto, miméticos aos antígenos proteicos da doença de interesse (HUANG; BISHOP-HURLEY; COOPER, 2012).

Nesse sentido, os peptídeos ligantes representam uma excelente oportunidade no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos como receptores artificiais, devido à várias vantagens como: (LADNER *et al.*, 2004; LI, R. *et al.*, 2013; YANG, J. *et al.*, 2014).

- (1) Comparado a outros componentes biológicos os peptídeos são moléculas pequenas de fácil síntese e baixo custo;
- (2) Unidades peptídicas reconhecem seus alvos de maneira específica;
- (3) Podem se ligar na molécula alvo *in vivo* ou *in vitro*;
- (4) O reconhecimento do alvo é raramente comprometido;
- (5) Podem ser quimicamente modificados para se ligarem a alvos específicos.

Um número crescente de sistemas biomiméticos baseados em peptídeos têm sido relatados na literatura, com uma ampla variedade de analitos alvo e campos de aplicação (PAVAN; BERTI, 2012).

Liu *et al.* (2016) desenvolveram um biossensor eletroquímico sem marcadores (*label-free*) por meio da imobilização de um peptídeo sobre um eletrodo de ouro. O processo de imobilização foi realizado via resíduo de cisteína. Foi mostrado que o biossensor detectou bactérias patogênicas, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*, diferenciando as mortas das vivas.

Algumas estratégias são adotadas visando viabilizar a detecção dos alvos, como por exemplo, a conjugação dos peptídeos com marcadores redox. Li *et al.* (2014) demonstraram um biossensor impedimétrico para detecção de uma cepa patogênica de *Escherichia coli*, a partir da imobilização de peptídeo conjugado com ferroceno. O sistema foi seletivo entre espécies e cepas e apresentou faixa linear de resposta de 10^3 a 10^7 UFC mL⁻¹. Valencia *et al.* (2016) desenvolveram um imunossensor para a detecção de anticorpos do HPV, um peptídeo ligado a um resíduo de 6-amino-hexanóico e ferroceno foi imobilizado sobre eletrodo de ouro. O biossensor foi capaz de discriminar pacientes infectados e controle negativo.

A obtenção de peptídeos miméticos específicos para diagnosticar o vírus da dengue, a partir de biossensores eletroquímicos, se torna uma alternativa interessante, já que a reação entre peptídeos e anticorpos IgM pode viabilizar um diagnóstico precoce, pois é detectável nos primeiros dias da doença. Nesse sentido, um ponto crucial na construção dos biossensores é garantir a imobilização do biorreceptor na superfície eletródica, uma vez que esta etapa irá garantir o sucesso de funcionamento do biossensor.

1.4. TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO SOBRE O TRANSDUTOR

O principal aspecto a ser observado numa metodologia de imobilização é evitar a perda do componente biológico por lixiviação e manter a atividade da biomolécula na superfície do transdutor. Além disso, é preciso garantir a preservação dos sítios ativos para interação com a molécula alvo.

A adsorção física (fisissorção) é um método comumente empregado devido à simplicidade, uma vez que não exige modificação química, se tornando rápido e de

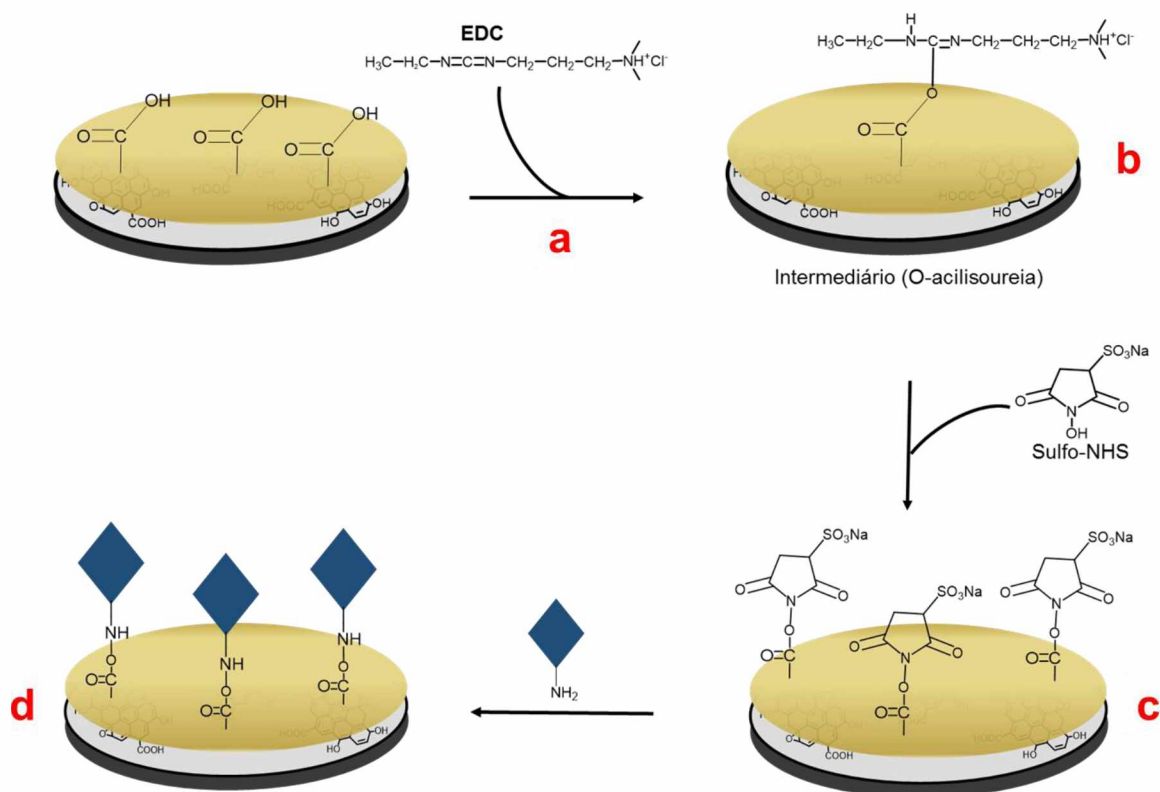
baixo custo. O método consiste da interação do componente biológico e o transdutor através da formação de forças atrativas de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interações iônicas. Contudo, esse método possui desvantagens como a possibilidade de dessorção da biomolécula devido a fracas interações, bem como a imobilização pode ocorrer com uma orientação desfavorável na superfície do suporte/eletrodo (SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012).

O método de oclusão ou confinamento da biomolécula é comumente realizado em matrizes poliméricas. O aprisionamento ocorre durante o processo de reticulação de um polímero insolúvel, onde a biomolécula fica presa nos espaços formados na rede polimérica. A desvantagem associada a esse método está na possibilidade de perda da reatividade da biomolécula, não estando mais disponível para a interação com o alvo (UR REHMAN *et al.*, 2016).

A imobilização por meio de ligação covalente (quimissorção) é largamente utilizada no desenvolvimento de biossensores, especialmente para imobilização de anticorpos (SOUTO *et al.*, 2013) e peptídeos (LI, Y. *et al.*, 2014). O processo ocorre entre grupos funcionais da biomolécula (exemplos: amino, hidroxila, carboxila e tiol, em cadeias laterais) e grupos reativos disponíveis na superfície do suporte/eletrodo (exemplos: amino, hidroxila, carboxilas e tiol). De modo geral, este método envolve duas etapas: ativação dos grupos funcionais presentes no suporte/eletrodo com um reagente específico (bi ou multifuncional), seguido de adição da biomolécula para formação da ligação covalente. Alternativamente, os grupos funcionais da biomolécula podem ser ativados e, em seguida, formar a ligação covalente com os grupos funcionais do suporte/eletrodo. A dificuldade deste último é formação de ligações covalentes entre duas biomoléculas ou mais. Os métodos que utilizam a imobilização por ligação covalente raramente permitem lixiviação da molécula biológica (XIA, N. *et al.*, 2013).

Uma estratégia muito utilizada no método de ligação covalente é a formação de ligação covalente amida ou éster entre grupos carboxila e grupos amino ou hidroxila respectivamente (Figura 5). A ativação utilizando reagentes carbodiimidas são amplamente empregadas (VASHIST, 2012).

Figura 5: Representação esquemática da formação da ligação amida através da reação catalisada por carbodiimida usando o sistema EDC/sulfo-NHS. (a) ativação das carboxilas com EDC, (b) formação do intermediário (O-acilisoureia), (c) éster reativo e (d) ligação amida com molécula biológica.



Fonte: Autor, 2016

O EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)) é uma carbodiimida largamente empregada em reações aquosas (Figura 5a). É um agente de ligação de comprimento zero, pois não são mantidos na estrutura após a imobilização. O objetivo das carbodiimidas é ativar grupos carboxila, formando um intermediário reativo aciluréia que reage com um nucleófilo fraco (Figura 5b). A reação acontece normalmente em duas etapas. A primeira etapa envolve a ativação dos grupos carboxílicos, formando um éster ativado o-aciluréia (intermediário), seguido de reação. Entretanto, a reatividade do intermediário é muito alta e em meio aquoso o mesmo sofre hidrólise, retornando a ácido carboxílico caso não haja nenhum outro nucleófilo no meio. Para evitar esse efeito, um composto hidroxilado ativo é usado juntamente com a carbodiimida, formando um derivado de éster reativo (Figura 5c). Este último é estável por vários minutos a horas. N-hidroxissuccinimida (NHS) ou sulfo-NHS tem sido

utilizado para esse propósito. Tanto o EDC quanto o NHS atuam como agentes tamponantes com um pH em torno de 5-6, possibilitando condições favoráveis para a formação do éster NHS. Outros reagentes como nitrofenol e seus derivados podem ser usados para a formação dos ésteres, entretanto o NHS é preferido devido à sua baixa toxicidade, alta solubilidade em água e ótima reatividade para os dois estágios de acoplamento (HERMANSON, 2008).

As técnicas citadas acima são exploradas de várias maneiras no desenvolvimento de biossensores. O principal objetivo é buscar estratégias com simplicidade e baixo custo. Por isso, o grupo de pesquisa (Laboratório de Filmes Poliméricos - LAFIP), onde foi desenvolvido este trabalho, têm se dedicado a modificar quimicamente eletrodos com polímeros condutores, visando gerar um ambiente favorável para imobilização de biomoléculas.

1.5 ELETRODOS MODIFICADOS COM FILMES POLIMÉRICOS

Um dos grandes desafios dos sensores eletroquímicos é gerar dispositivos que sejam altamente sensíveis, seletivos e estáveis, visando sua utilização na indústria para aplicações clínicas (como diagnóstico), farmacêutica, ambiental, etc. Muitas dificuldades são encontradas como: imobilização do material biológico, passivação de eletrodos, discriminação de amostras e cinética de transferência de elétrons lenta, dentre outras. Uma alternativa encontrada pela comunidade científica para minimizar essas dificuldades e, conseqüentemente, aumentar a eficiência dos sensores eletroquímicos, foi modificar quimicamente superfícies eletródicas. Assim, é possível manipular e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução, propiciando características que podem contornar muitos problemas apresentados pelos sensores eletroquímicos tradicionais (MURRAY *et al.* 1987).

Atualmente, muitas metodologias são empregadas para a modificação de eletrodos, incluindo adsorção física de substâncias que possuem grupos funcionais desejáveis, ligação covalente de espécies químicas e cobertura com filmes poliméricos (BUDNIKOV, 2008; SHAIDAROVA; SOUZA, 1997). Dentre esses, os filmes poliméricos chamam a atenção, pois permitem controlar a quantidade de monocamadas da espécie ativa sobre o eletrodo, ampliando a resposta eletroquímica. Neste caso, o mesmo deve ser condutor ou permeável ao eletrólito e à espécie de

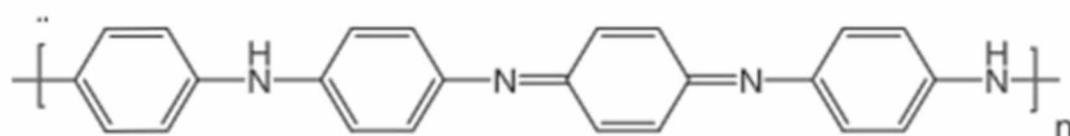
interesse. Dessa maneira, pode-se fazer uso das suas propriedades elétricas e óticas para obter informações em um sinal analiticamente mensurável (SOUZA, 1997).

Os sensores que fazem uso de eletrodos modificados com polímeros conjugados podem ser ferramentas de baixo custo na quantificação e qualificação de uma variedade de substâncias biológicas e químicas, em aplicações que variam desde o controle de qualidade de bebidas e alimentos ao diagnóstico clínico (KIM *et al.*, 2015; BAGHERYAN *et al.*, 2016; DO NASCIMENTO *et al.*, 2017). De modo geral, as principais vantagens dos polímeros conjugados aplicados em biosensoriamento são:

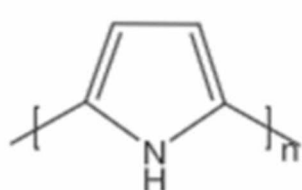
- (1) Uma variedade de polímeros conjugados podem ser usados;
- (2) Podem ser utilizados materiais de baixo custo além das técnicas empregadas para obtenção dos mesmos serem comparativamente mais baratas;
- (3) Podem ser aplicados para produção de sensores altamente sensíveis e específicos;
- (4) Suas propriedades podem ser controladas a fim de formar uma camada sensotiva para uma ampla faixa de reposta de analitos diversificados;
- (5) Espécies biológicas podem ser imobilizadas produzindo biossensores, e neste caso pode ser usado para diagnóstico de doenças (MALHOTRA; CHAUBEY; SINGH, 2006).

Os polímeros condutores são uma classe de polímeros funcionais que apresentam uma configuração de ligações simples e duplas alternadas ao longo da cadeia, as quais são responsáveis pela condução eletrônica. Uma cadeia altamente conjugada pode conferir propriedades químicas reversíveis, eletroquímicas e físicas controladas pelo processo de dopagem e desdopagem, o que faz com que estes polímeros sejam atrativos como materiais transdutores em vários dispositivos de sensoriamento. Assim, a variação da condutividade causada pelo processo de dopagem e desdopagem (entrada e saída de contra íons) é largamente usada em sensores, baseados em polímeros condutores. Todavia, testes com moléculas alvo podem aumentar ou reduzir o número e a mobilidade do transportador da carga, alterando a condutividade. Algumas estruturas típicas de polímeros condutores são apresentadas na Figura 6 (XIA, L.; WEI; WAN, 2010).

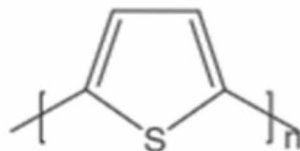
Figura 6: Estruturas de polímeros condutores típicos empregados em biossensores.



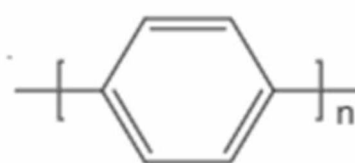
Polianilina



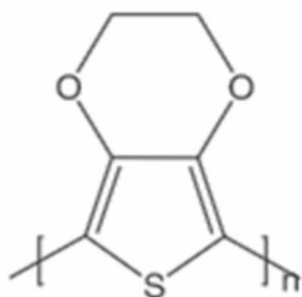
Polipirrol



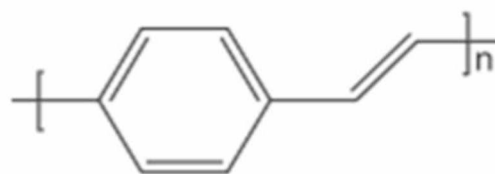
Politiofeno



Poliparafenileno



Poli(3,4-etilenodioxitiofeno)



Poliparafenileno-vinileno

Fonte: Lin Xia, 2010 (XIA, L.; WEI; WAN, 2010).

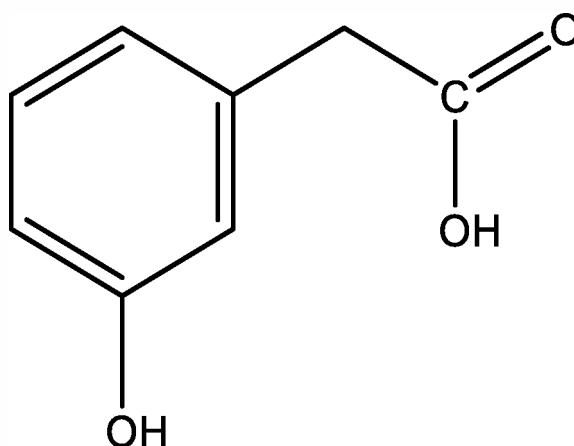
Um método comumente empregado na síntese dos polímeros condutores é a eletropolimerização, a qual produz o material diretamente na superfície do eletrodo. É uma metodologia simples e rápida, pois geralmente é realizada à temperatura ambiente e na maioria das vezes não necessita de uma etapa de purificação (BLACHA; KRUKIEWICZ; ŽAK, 2011).

O interesse em polímeros eletropolimerizados, utilizando monômeros aromáticos funcionalizados, tem sido alvo de estudo pelo grupo de pesquisa LAFIP. Os filmes poliméricos eletro-gerados preservam os grupos funcionais, facilitando a interação com moléculas biológicas, viabilizando a construção de biossensores. Nesse sentido, tem se destacado polímeros derivados de éteres alquil-arílicos e fenóis. Recentemente, o poli(ácido 3-hidroxifenilacético) [poli(3-HFA)] tem sido alvo

de estudo, devido à possibilidade de ser utilizado como matriz para a construção de biossensores.

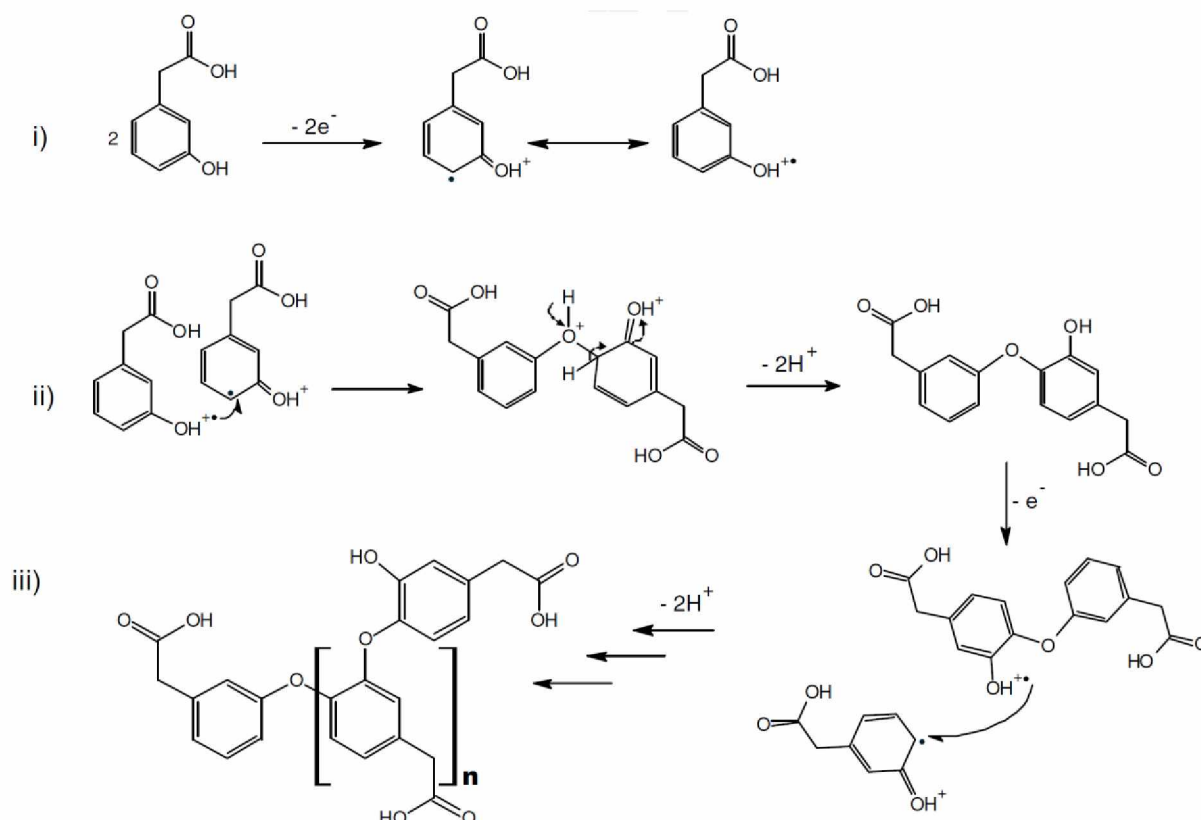
A Figura 7 mostra a estrutura do monômero ácido 3-hidroxifenilacético, que é um material eletroquimicamente ativo, sendo que os grupos funcionais presentes em sua estrutura favorecem a sua solubilidade em solventes polares.

Figura 7: Monômero ácido 3-hidroxifenilacético



Fonte: Autor, 2016

A hidroxila fenólica pode ser oxidada, gerando um cátion radical, dando origem à espécie reativa, com a propagação e formação de cadeias de poliéteres aromáticos com grupos carboxílicos livres. A Figura 8 mostra o mecanismo proposto na literatura para eletropolimerização do ácido 3-hidroxifenilacético.

Figura 8: Mecanismo de eletropolimerização do poli(3-HFA)

(i) Eletrooxidação, (ii) acoplamento, (iii) terminação.

Fonte: Rodrigues, *et al.*, 2014

Destaca-se que este polímero apresentou estabilidade em testes eletroquímicos e ainda foi eficiente para imobilização e detecção de oligonucleotídeos (RODRIGUES, *et al.*, 2014), incorporação de peptídeo para detecção de *Anaplasma marginale* (SANTOS, *et al.*, 2012) e imobilização de antígenos para detecção da enzima α -amilase salivar humana (SANTOS, *et al.*, 2012). Recentemente tem-se buscado estratégias para melhorar a propriedades desses filmes poliméricos, nas quais se destaca a incorporação de materiais nanoestruturados, formando assim os nanocompósitos poliméricos.

1.6 NANOCOMPÓSITOS

Os compósitos compreendem uma classe de materiais composta por duas ou mais substâncias com propriedades químicas e físicas diferentes. Quando essas substâncias são combinadas, o compósito passa a ter propriedades únicas, as quais não são possíveis de serem obtidas a partir de seus componentes individuais. Quando pelo menos um dos componentes do compósito possui uma dimensão em escala nanométrica, o material passa a ser denominado nanocompósito (SILVA, *et al.*, 2013). Devido às características dos nanocompósitos, eles têm sido aplicados em diversas áreas, incluindo medicamentos usando nanocápsulas (MERINO *et al.*, 2015), produção de plásticos que retardam a chama (IDUMAH; HASSAN; AFFAM, 2015), tratamento de água (SUBRAMANI; JACANGELO, 2015), embalagem de alimentos (BUMBUDSANPHAROKÉ; KO, 2015), dispositivos eletrônicos (RATH; KUNDU, 2015), cirurgias e transplantes de órgãos (CROWLEY; BIRCHALL; SEIFALIAN, 2015), dentre outras.

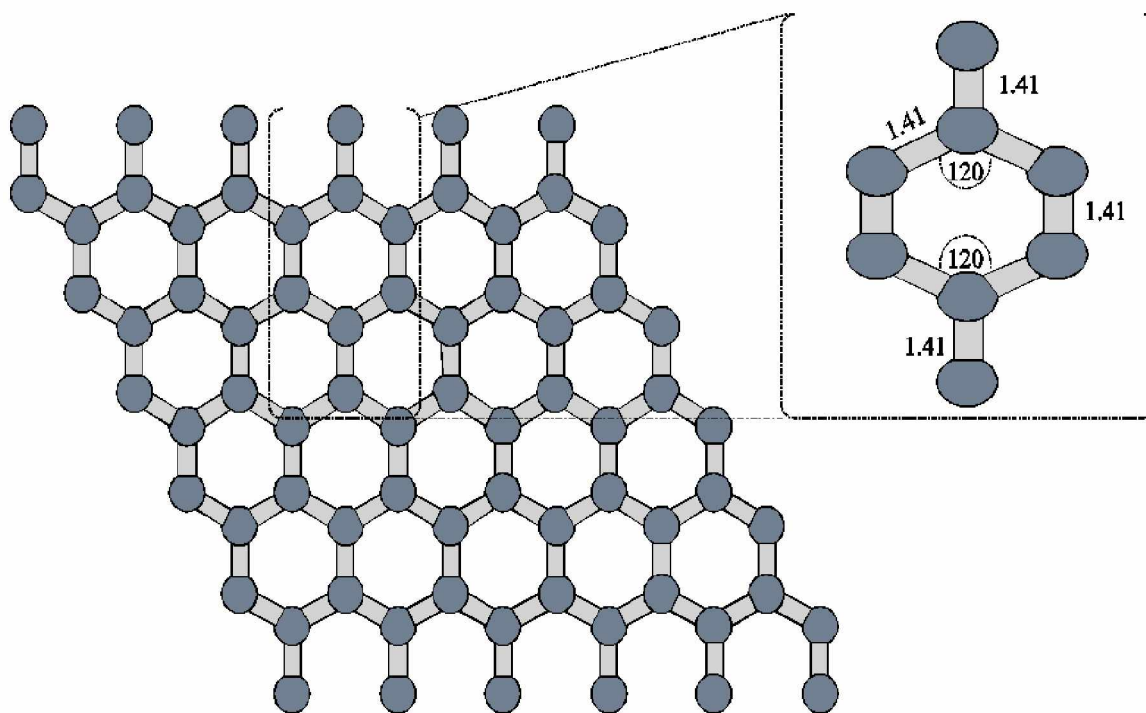
Nos últimos anos, houve um interesse nos nanocompósitos poliméricos tanto na indústria como no meio acadêmico, devido ao sinergismo proveniente dos materiais com melhorias multifuncionais, abrindo espaço para novas aplicações. O grupo Toyota foi um dos primeiros a fazer uso de nanopartículas para aplicações práticas, comercializando um nanocompósito em que uma matriz de Nylon-6 foi reforçada com o mineral montmorilonita (MMT) (NGUYEN; BAIRD, 2006). A combinação da matriz polimérica com reforços inorgânicos pode melhorar as propriedades mecânicas do material, tais como resistência mecânica, rigidez, resistência ao impacto e tenacidade, mantendo a processabilidade do material (HU *et al.*, 2014). Na busca por novos materiais com propriedades superiores, o grafeno e/ou seus derivados como óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido têm se destacado devido às suas propriedades únicas.

1.7 GRAFENO

O grafeno é constituído por uma estrutura hexagonal de átomos de carbono com hibridização sp^2 numa rede bi-dimensional e uma espessura de um átomo de carbono (Figura 9). Este material foi isolado pela primeira vez por André Geim e Konstantin Novoselov, utilizando uma fita adesiva convencional e um lápis a partir de

um processo chamado exfoliação mecânica (ou método Scotch-Tape) (NOVOSELOV *et al.*, 2004).

Figura 9: Estrutura do grafeno



Fonte: ALZHRANI, 2011

Grafeno é considerado um material transparente, pois deixa passar 97,7% da luz visível e pode esticar em até 20% sem ser rompido (LEE *et al.*, 2008). E ainda, possui excelentes propriedades mecânicas, térmicas, ópticas, elétricas (ALLEN; TUNG; KANER) e ainda boa biocompatibilidade (JIN, L. *et al.*, 2016). Sua alta condutividade térmica ($\sim 5.000 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$) favorece uma excelente mobilidade de transportadores de cargas a temperatura ambiente ($200.000 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e além disso, exibe uma elevada área superficial ($\sim 2.600 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) (BALANDIN *et al.*, 2008; BOLOTIN *et al.*, 2008; XIANG; YU; JARONIEC, 2012; YEY *et al.*, 2013). Devido às suas propriedades únicas, o grafeno tem sido aplicado em diversas áreas tais como: supercapacitores (SUN *et al.*, 2015), eletrocatalise (SHI *et al.*, 2015), biomedicina (PODILA *et al.*, 2013) e sensores químicos e biológicos (VASHIST, 2012).

O grafeno pode ser obtido por vários métodos como: clivagem mecânica do grafite (NOVOSELOV *et al.*, 2004), crescimento epitaxial (BERGER *et al.*, 2006), deposição química a vapor (LI, X. *et al.*, 2009) e redução térmica, eletroquímica ou química do óxido de grafeno (CHNG; PUMERA, 2011; WANG, *et al.*, 2010; WANG, *et*

al., 2009). Dentre esses métodos, a clivagem mecânica é atualmente o mais eficaz e confiável para produzir grafeno de alta qualidade. Através da deposição química a vapor também é possível obter um material com excelentes propriedades físicas. Entretanto estes métodos são limitados devido à dificuldade de produção em larga escala (BAE *et al.*, 2010). O material obtido a partir do crescimento epitaxial também é de boa qualidade, entretanto exige condições de alto vácuo, além de equipamento de alto custo (OBRAZTSOV, 2009). Atualmente, os métodos para a redução do óxido de grafeno se destacam como a principal estratégia para produzir um material em larga escala com propriedades similares ao grafeno.

O óxido de grafeno (OG) é um derivado do grafeno obtido a partir da oxidação química do grafite. Os primeiros procedimentos para a síntese do OG foram desenvolvidos há várias décadas por Brodie (BRODIE, 1859), Staudenmeier (STAUDENMAIER, 1898) e Hummers (HUMMERS; OFFERMAN, 1958) (Tabela 3).

Tabela 3: Métodos de oxidação do grafite

	Brodie	Staudenmaier	Hummers
Ano	1859	1898	1958
Oxidantes	KClO ₃ , HNO ₃	KClO ₃ (ou NaClO ₄), HNO ₃ , H ₂ SO ₄	NaNO ₃ , KMnO ₄ , H ₂ SO ₄
Tempo de reação	3-4 dias	1-2 dias	9-10 h
Referências	(BRODIE, 1859)	(STAUDENMAIER, 1898)	(HUMMERS; OFFERMAN, 1958)

Fonte: Autor, adaptado de Compton, 2010

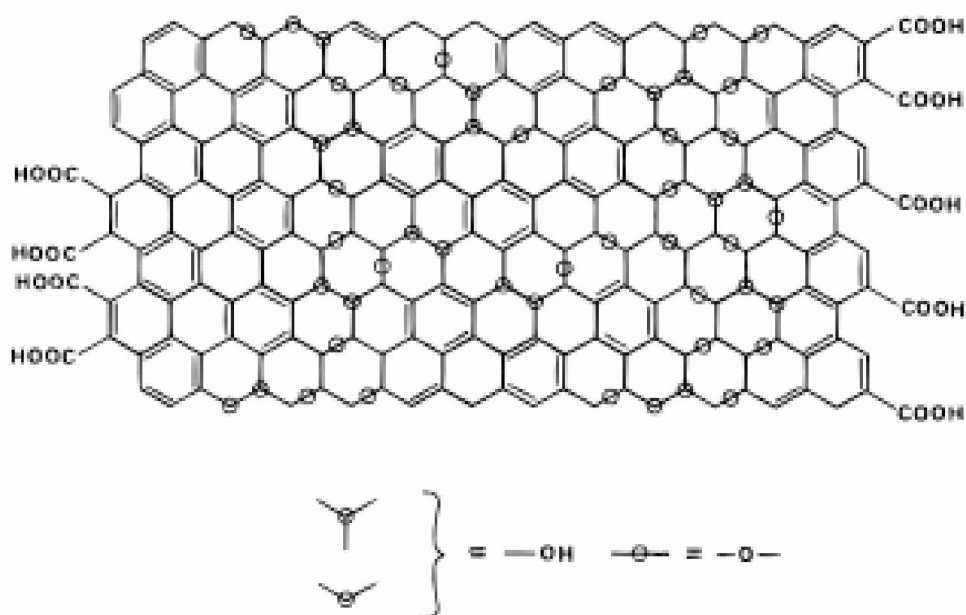
A extensão da oxidação do grafite, quantificada pela razão atômica C:O, vai depender do método de síntese, bem como do tempo da reação. O OG obtido pelo método de Staudenmaier normalmente é mais oxidado, entretanto a síntese inteira leva dias de reação. Infelizmente, tanto ele quanto o método Brodie produzem o gás ClO₂, o qual deve ser manuseado com cautela devido à sua alta toxicidade e tendência a se decompor no ar gerando explosões. Assim, o método de Hummers tem sido comumente empregado na pesquisa científica, devido não fazer uso do gás ClO₂ e o

tempo de reação ser relativamente curto. O inconveniente desse método é a potencial contaminação por excesso de permanganato, todavia esse reagente pode ser removido por tratamento com H_2O_2 seguido de lavagem.

No processo de oxidação do grafite, ocorre a quebra da estrutura hibridizada em sp^2 das folhas de grafeno empilhadas, gerando defeitos que manifestam como estruturas enrugadas (MCALLISTER *et al.*, 2007) e ainda o aumento da distância entre as folhas adjacentes do grafite. Essa distância depende da quantidade de água intercalada entre as folhas. Este fenômeno facilita a separação das folhas individuais de OG após a exposição à sonicação em água. Em meio básico, os grupos funcionais ficam carregados negativamente, promovendo uma estabilização do material em meio aquoso (BISSESSUR; SCULLY, 2007). Essa dispersão é a precursora para obter muitos materiais à base de óxido de grafeno e grafeno. Neste trabalho, denominaremos óxido de grafite o material oxidado e óxido de grafeno (OG) o material obtido após a sonicação.

A estrutura das folhas de óxido de grafeno tem sido debatida há décadas com incerteza, tanto no tipo quanto na distribuição de grupos funcionais contendo oxigênio, devido à estrutura não estequiométrica do material. O modelo mais usado atualmente foi proposto por Lerf *et al.*, 1998 (Figura 10).

Figura 10: Modelo estrutural do óxido de grafeno.



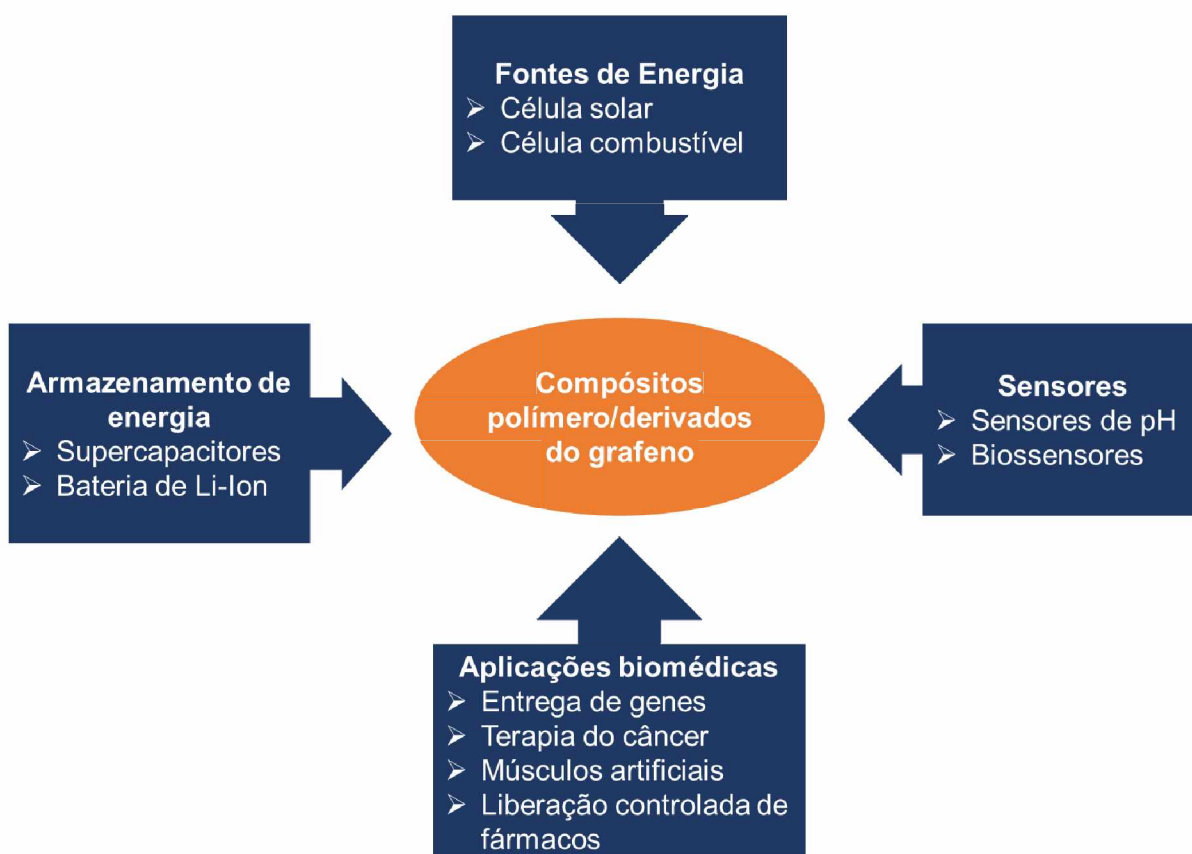
Fonte: LERF *et al.*, 1998.

Neste modelo, o plano basal e as extremidades são constituídos principalmente por grupos epóxidos e grupos carboxílicos, respectivamente. Outros grupos funcionais como hidroxilas e carbonilas também são encontrados na estrutura do material. No caso das hidroxilas, elas podem estar localizadas tanto nas extremidades quando no plano basal. Os grupos funcionais do OG facilitam a dispersão do mesmo em meio aquoso, entretanto, devido à quebra da aromaticidade o mesmo se torna não condutor. Por isso, muitas estratégias como citado acima são estudadas a fim de restaurar a condutividade elétrica do material, além de obter um material com propriedades similares ao grafeno puro.

O grupo de pesquisa LAFIP tem investido na produção do óxido de grafeno pelo método de Hummers e na sua redução eletroquímica ou química com hidrazina. Os dois métodos são de baixo custo, sendo que o eletroquímico viabiliza a redução diretamente na superfície do eletrodo. Por outro lado, a partir do método químico, é possível produzir o material reduzido em larga escala. Este trabalho dará enfoque para a redução química, devido a projetos futuros de dispositivos em larga escala. Além disso, a redução química com hidrazina é comumente empregada para a redução do OG, devido ser um método eficiente para a remoção dos grupos epóxido (PARK *et al.*, 2011; ZHU *et al.*, 2011).

Em geral, os derivados do grafeno (materiais obtidos a partir da redução do OG) mostram ser ótimos materiais na produção de nanocompósitos poliméricos. Os materiais apresentam excelentes propriedades mecânicas, ótima condutividade elétrica, transporte óptico único. Além disso, tem sido demonstrado que a introdução de pequenas frações dos derivados do grafeno pode melhorar drasticamente o desempenho mecânico de uma variedade de matrizes poliméricas. Sendo assim, esses materiais mostram ter potencial para melhorar as propriedades mecânicas, elétricas, térmicas e químicas das matrizes poliméricas, propiciando uma gama de aplicações, (Figura 11) (DAS; PRUSTY, 2013; HU *et al.*, 2014).

Figura 11: Aplicações de compósitos baseados entre polímeros e derivados do grafeno.



Fonte: Autor, adaptado de Das; Prusty, 2013.

Muitos biossensores têm sido desenvolvidos utilizando nanocompósitos poliméricos, devido às propriedades marcantes. Shan *et al.*, (2009) construíram o primeiro biossensor para glicose usando o nanocompósito polimérico baseado em

polivinilpirrolidona (PVP), grafeno e líquido iônico funcionalizado com polietilenoimina (PEI). O sistema mostrou boa bioatividade e potencial para fabricação de novos biossensores para glicose, com resposta linear até 14 mmol L⁻¹. Em outro estudo, Wu e colaboradores prepararam um filme nanocompósito consistindo de nanopartículas de platina, grafeno e quitosana. O biossensor apresentou sensibilidade e rapidez para quantificação de glicose (WU, H. *et al.*, 2009). Huang e colaboradores desenvolveram um biossensor eletroquímico para papiloma vírus humano (HPV), baseado em grafeno, nanobastões de ouro e politionina. O sistema apresentou um limite de detecção de 4.03 x10⁻¹⁴ mol L⁻¹ (HUANG, H. *et al.*, 2015). O biossensor também foi aplicado em amostra de soro, fornecendo potencial para aplicações clínicas. Recentemente, Navakul e colaboradores estudaram um biossensor eletroquímico para detecção do vírus da dengue, usando polímeros e grafeno, que alcançou um limite de detecção de 0,12 pfu/mL (NAVAKUL *et al.*, 2016).

Dentro dessa perspectiva, no presente estudo investigou-se as propriedades do óxido de grafeno reduzido e poli(ácido 3-hidroxifenilacético) visando desenvolver um biossensor eletroquímico para diagnóstico do vírus da dengue sorotipo 3.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem por objetivo geral desenvolver um nanocompósito polimérico baseado em óxido de grafeno reduzido e poli(ácido 3-hidroxifenilacético) para o diagnóstico do vírus da dengue sorotipo 3, por meio da imobilização de um peptídeo mimético.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar o OG a partir da oxidação química do grafite;
- Obtenção do OG-r a partir da redução química do OG com hidrazina;
- Caracterização dos materiais por espectroscopia de infravermelho, análise elementar, microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura;
- Modificação do eletrodo de ouro com OG e OG-r e, posterior caracterização eletroquímica dos mesmos (VC e EIE);
- Caracterização morfológica do Au/OG-r por MEV;
- Eletropolimerização do ácido 3-hidroxifenilacético sobre o eletrodo de ouro modificado com OG-r e sua posterior caracterização eletroquímica (VC e EIE) e morfológica (AFM);
- Avaliação da estabilidade do Au/OG-r/poli(3-HFA);
- Verificação da imobilização do oligonucleotídeo poli(GA) e a detecção do alvo complementar poli(CT) sobre o eletrodo modificado, utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial;
- Imobilização covalente do peptídeo mimético a antígeno do vírus da dengue (DV) sobre o Au/OG-r/poli(3-HFA) previamente ativado por EDC/NHS e monitoramento da ligação por voltametria de pulso diferencial;
- Avaliação da interação entre o peptídeo mimético a antígeno do vírus da dengue (DV) e anticorpos IgM presentes em amostra de soro, pela técnica de voltametria de pulso diferencial;
- Avaliação do efeito da variação de diluição a partir de um *pool* de soro e construção de uma curva de calibração;

- Caracterização do biossensor produzido antes e após a interação com alvo complementar (soro positivo) e não complementar (soro negativo) por voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial, espectroscopia de impedância eletroquímica e microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliação da aplicabilidade do biossensor desenvolvido com amostra de soro de pacientes saudáveis;
- Estudo da estabilidade do biossensor por um período de armazenamento.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os reagentes foram de grau analítico e utilizados como adquiridos. Todas as soluções foram preparadas usando água ultra purificada em sistema Millipore Milli-Q e autoclavada quando utilizada para preparo de soluções tampão. Todas as soluções foram preparadas previamente antes da realização dos experimentos evitando-se estocagem. A Tabela 3 mostra os reagentes utilizados no desenvolvimento do trabalho.

As soluções de bloqueio BSA (0,5%) e glicina 50 mmol L⁻¹ foram preparadas em solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,4).

As medidas de EIE (10 kHz a 0,1 Hz, a potencial de circuito aberto) e as caracterizações por VC (-0,5 V a 0,8 V, a 50 mV s⁻¹) foram realizadas em solução aquosa de 0,10 mol L⁻¹ de KCl contendo K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆.3H₂O 5,0 mmol L⁻¹.

Os experimentos em que não foram indicadas a temperatura foram realizados a temperatura ambiente (25 ± 1°C).

Tabela 4: Reagentes utilizados nos experimentos, com as correspondentes abreviação ou fórmula química e empresa de fabricação.

Reagente	Abreviação e/ou Fórmula Química	Empresa
Pó de grafite (99%), Ácido 3- hidroxifenilacético (98%) Permanganato de potássio (99%) Ácido sulfúrico (98%) 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida N-hidroxisuccinimida (98%) Albumina de Soro Bovina Cisteamina ($\geq 95\%$)	3-HFA KMNO ₄ H ₂ SO ₄ EDC NHS BSA C ₂ H ₇ NS	Sigma-Aldrich
Hidrato de hidrazina (65%) Etanolamina (P.A.)	N ₂ H ₄ EA	Dinâmica
Fosfato de sódio monobásico anidro (98%) Fosfato de sódio bibásico anidro (P.A) Cloreto de Potássio (P.A)	NaH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ KCl	Neon
Cloreto de Sódio (P.A) Brometo de Etídio (95%) Cisteína L (+) Cloridrato Anidra	NaCl BE C ₃ H ₇ NO ₂ S.HCl	Vetec
Hidróxido de Amônio (28%) Citrato de sódio Nitrato de Sódio Peróxido de hidrogênio (30%)	NH ₄ OH Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ NaNO ₃ H ₂ O ₂	Synth
Ferricianeto de potássio (99%)	K ₃ [Fe(CN) ₆]	Acros Organics
Ferrocianeto de potássio (99,5%)	K ₄ [Fe(CN) ₆] .3H ₂ O	Fluka

Fonte: Autor, 2016

3.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

3.2.1 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos, sonda poli(GA) (5'-GGGGGGGGGAAAAAAAAA-3') e alvo poli(CT) (5'-TTTTTTTTTCCCCCCCC-3') foram obtidos liofilizados da Invitrogen Life Technologies Inc. Soluções estoque dos oligonucleotídeos foram preparadas em solução tampão citrato de sódio (SSC) (citrato de sódio 0,03 mol L⁻¹/NaCl 0,3 mol L⁻¹). As diluições foram realizadas previamente ao uso utilizando o mesmo tampão de estocagem.

3.2.2 Peptídeo mimético DV e soro humano

O peptídeo mimético a antígenos do vírus da dengue (DV) de sequência ACLLRNASTCA foi selecionado por (OLIVEIRA, 2012) e sintetizado quimicamente pela empresa Peptide 2.0 (Peptide 2.0 Inc., Chantilly, VA, USA). Para a obtenção do peptídeo mimético utilizou-se uma biblioteca randômica de peptídeos de sete aminoácidos ("Ph.D -7 10 mer - New England Biolabs") fusionados na proteína III do capsídeo de fagos filamentosos e reconhecido por anticorpos IgY de galinhas previamente imunizadas com proteínas virais totais do vírus dengue sorotipo 3. Os fagos que apresentaram maior reatividade dos clones contra soro pelo teste ELISA (representados pelos maiores índices de ELISA) foram selecionados. Após o sequenciamento e tradução das sequências proteicas em aminoácidos, a sequência escolhida foi sintetizada quimicamente. Neste caso, o peptídeo LLRANST apresentou similaridade com proteínas de comunidades biológicas previamente conhecidas e com probabilidades de ocorrência ao acaso muito baixa, sugerindo que o fago foi selecionado especificamente para os sítios alvos.

O uso da sequência linear simples, apenas dos sete resíduos de aminoácidos, não permite o estudo detalhado da molécula e nem sua aderência a suportes sólidos como o fundo de placas de ELISA. Por isso, foram realizadas algumas modificações na sequência LLRANST: a adição de alanina e cisteína (AC) no início e no final da molécula foi efetuada a fim de se manter a conformação e também para se mimetizar a maneira pela qual o peptídeo se encontrava disposto no fago. O peptídeo mimético a antígenos do vírus da dengue apresenta 97% de grau de

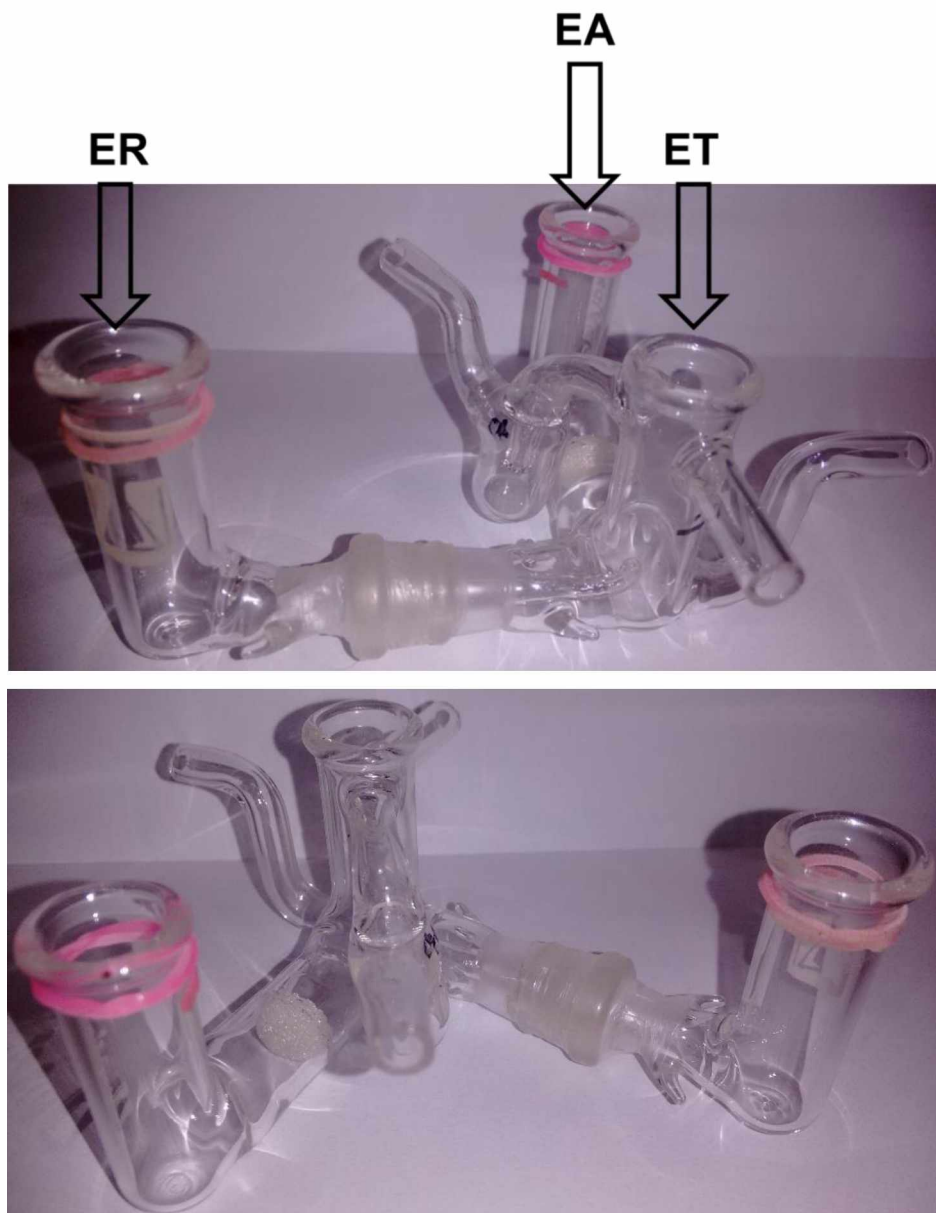
pureza. Sua solução estoque foi preparada em água ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). As amostras de soro humano foram coletadas no ambulatório de Dengue da UFTM e Unidade básica de Saúde da Abadia da Prefeitura, Uberaba, MG. Todas as amostras foram submetidas ao teste de imunocromatografia de NS1 (Dengue EDEN NS1 Test - Bioeasy) e sorologia IgM (Dengue IgM Capture Elisa - Pan Bio) para dengue. Apenas amostras positivas em ambos os ensaios fizeram parte do trabalho. Além disso, foram utilizadas amostras de soros de voluntários saudáveis não infectados, cuja negatividade foi confirmada pelos mesmos testes sorológicos. A coleta dessas amostras foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM (CEP-UFTM) com protocolo número 871.

Todas as amostras foram armazenadas a -20°C e diluídas em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4) imediatamente antes do uso. Um *pool* preparado a partir de 10 alíquotas distintas foi utilizado para a construção da curva de calibração. Uma alíquota do *pool* foi conduzida à medicina diagnóstica chamada IPAC (localizada em Uberlândia) para fazer a dosagem da Imunoglobulina M presentes na amostra do soro. Escolheu-se fazer a dosagem apenas deste anticorpo devido ao peptídeo mimético (DV) ser específico para anticorpos IgM.

3.3 APARATOS E LIMPEZA DOS MATERIAIS

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato autolab PGSTAT 302N, acoplado a um computador contendo os softwares GPES 4.9, FRA e módulo NOVA (1.10). Para análise e confecção dos gráficos foi utilizado o software Origin®. Os experimentos foram realizados em uma célula de três compartimentos com capacidade para 10 mL (Figura 12). Foram utilizados eletrodo de ouro modificado (área de $0,0314 \text{ cm}^2$) como eletrodo de trabalho, prata e cloreto de prata [Ag/AgCl ($\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$)] como eletrodo de referência e fio de platina como eletrodo auxiliar. A limpeza dos materiais usados (célula eletroquímica e vidrarias) foi realizada com água e sabão neutro seguido por enxague com solução 10% v/v de ácido nítrico e posterior lavagem com água destilada.

Figura 12: Imagem fotográfica da célula eletroquímica utilizada nos experimentos com indicação onde são colocados os eletrodos de trabalho (ET), referência (ER) e auxiliar (EA).

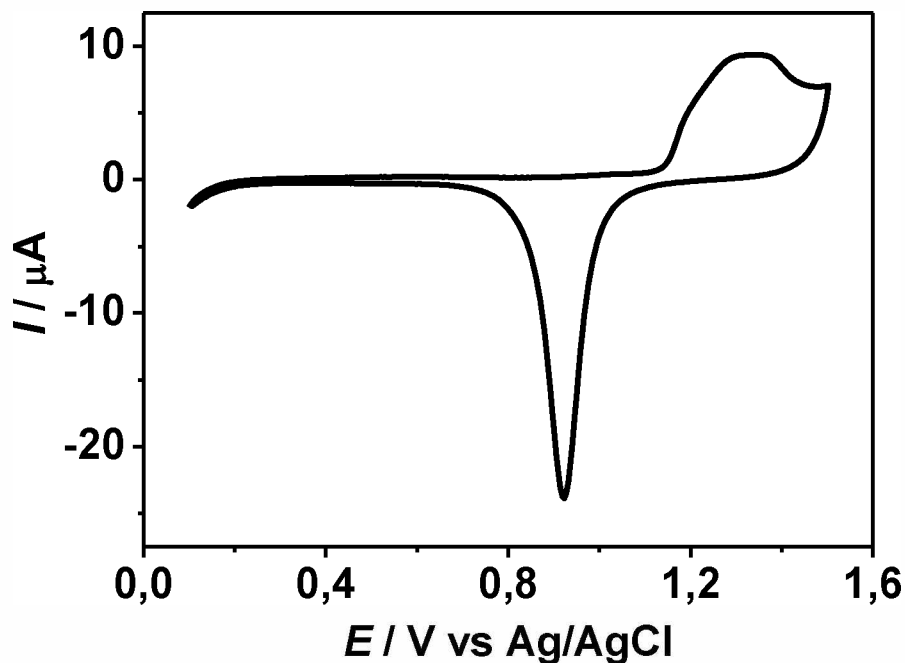


Fonte: Autor, 2016

Previamente ao uso, o eletrodo de ouro foi limpo por tratamento com ultrassom em solução água e etanol (1:1), seguido de polimento em suspensão de alumina (0,3 micrômetros). Posteriormente à limpeza mecânica, o eletrodo foi submetido à ciclagem de potencial entre 0,1 V e 1,5 V em solução de H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} . As correntes de pico anódica (i_a) e catódica (i_c) observadas na Figura 13 em aproximadamente 1,3 e 0,92 V são características da oxidação do ouro a óxidos de

ouro e redução dos óxidos a ouro elementar, respectivamente. Um perfil mostrado da Figura 13 foi escolhido como padrão para a realização dos experimentos.

Figura 13: Voltamograma cíclico do eletrodo de ouro em solução de H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} , a 50 mVs^{-1} , entre 0,1 e 1,5V.



Fonte: Autor, 2016.

3.4. PROCEDIMENTOS

As metodologias empregadas para a realização deste trabalho foram divididas em 4 partes:

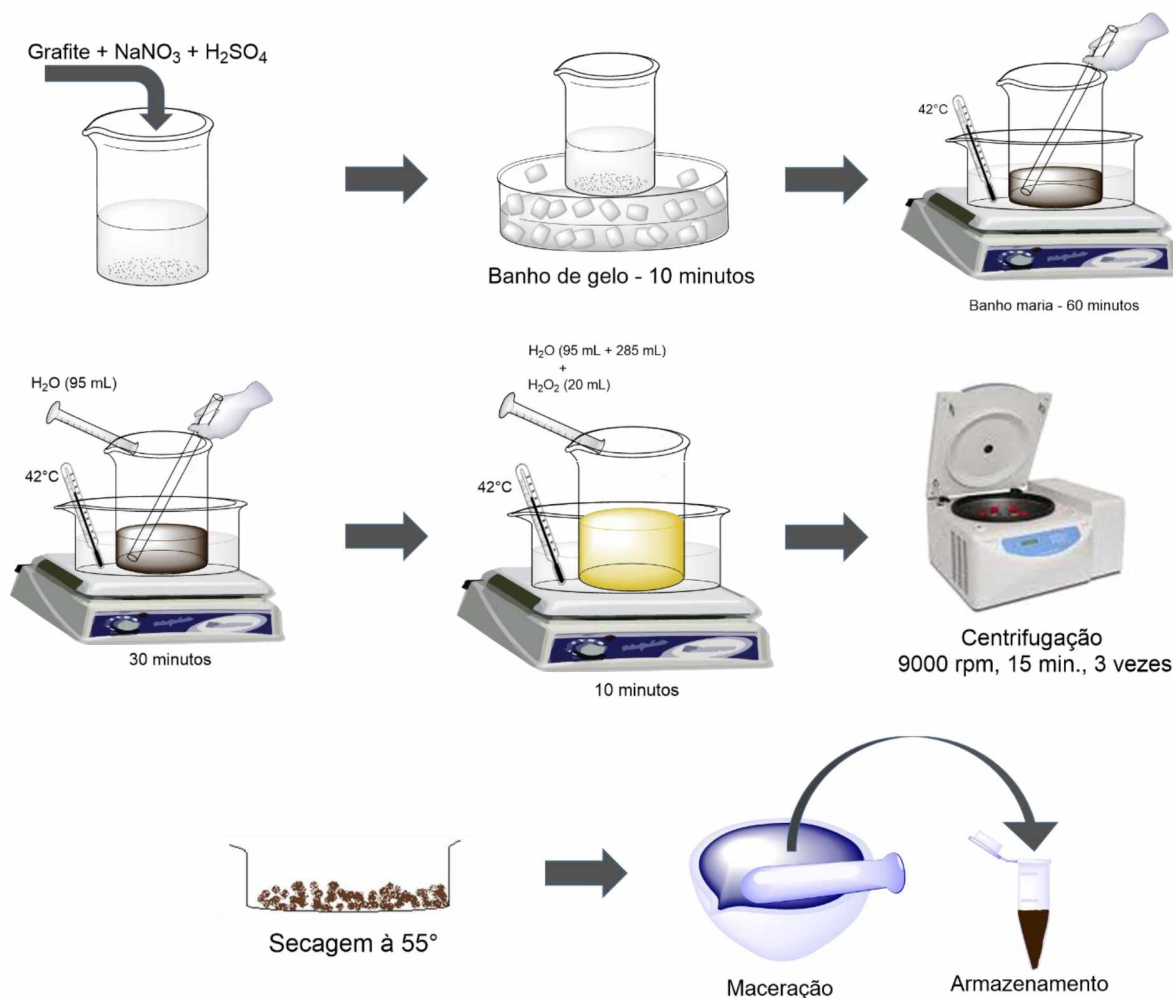
- 1) Síntese e caracterização do óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido;
- 2) Desenvolvimento e caracterização da plataforma baseada em óxido de grafeno reduzido e poli(ácido 3-hidroxifenilacético);
- 3) Aplicação da plataforma para imobilização e detecção de oligonucleotídeos;
- 4) Desenvolvimento e caracterização de um biossensor para diagnóstico da dengue.

3.4.1 Síntese e caracterização do óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido

3.4.1.2 Obtenção do óxido de grafite

O óxido de grafite foi obtido a partir do método de Hummers (HUMMERS; OFFERMAN, 1958) com pequenas modificações. Inicialmente, em um béquer de 1 litro foram adicionados 50 mL de ácido sulfúrico, 2 gramas de grafite e 2 gramas de nitrato de sódio. Essa mistura foi transferida para um banho de gelo, seguido da adição de 6 gramas de permanganato de potássio, o qual foi adicionado vagarosamente para evitar aquecimento. O sistema foi mantido em repouso por 10 minutos e, em seguida, foi transferido para um banho maria a 42° C e mantido sob agitação por 60 minutos. Em sequência, foram adicionados 95 mL de água deionizada e mantido sob agitação por mais 30 minutos, seguido de adição com 285 mL de água deionizada. Foram adicionados ainda 20 mL de peróxido de hidrogênio (30% v/v) visando consumir o excesso de agente oxidante. O sistema foi agitado por mais 10 minutos e resfriado a temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi centrifugada numa rotação de 9000 rpm por 15 minutos por três vezes e o material sedimentado foi lavado com água deionizada. O material obtido foi seco a 50°C, macerado e armazenado em eppendorf para uso posterior. A Figura 14, mostra de forma resumida a metodologia descrita acima.

Figura 14: Representação esquemática da metodologia empregada para a síntese do óxido de grafite.



Fonte: Autor, 2016.

3.4.1.3 Obtenção do óxido de grafeno reduzido

Para a obtenção do óxido de grafeno reduzido (OG-r), 100 mg do óxido de grafite foi disperso em 100 mL de água deionizada e sonicado por duas horas. Após a dispersão, o material foi nomeado óxido de grafeno (OG). A solução foi basificada com hidróxido de amônio até atingir $\text{pH} = 10$. Em seguida foram adicionados 500 μL de hidrato de hidrazina e, a solução foi agitada vagorosamente a 95°C por uma hora em banho maria. É comum observar um material de cor preta depositar no fundo do béquer após 30 minutos de agitação. O sistema foi resfriado à temperatura ambiente e depois foi centrifugado a 9000 rpm durante 15 minutos por três vezes e lavado com

água deionizada. O material obtido foi seco a 50°C, macerado e estocado em *ependorf* para uso posterior.

3.4.1.4 Caracterização dos materiais

Análises por infravermelho foram realizadas para verificar as modificações químicas ocorridas no processo de oxidação do grafite e subsequente redução do óxido de grafeno. Os espectros foram registrados na região de 4500 a 400 cm^{-1} utilizando-se um espectrofotômetro Shimadzu Prestige-21. O material a ser analisado foi prensado em pastilha de KBr a 1%. As bandas de vibração foram associadas aos principais grupos químicos presentes nas amostras. Previamente às medidas, o material foi mantido sob vácuo por 24 horas.

A espessura do óxido de grafeno foi verificada através de microscopia de força atômica (AFM) utilizando um equipamento da Shimadzu, modelo SPM 9600. Para este procedimento foi preparada uma solução aquosa de óxido de grafeno (1 mg/mL) e colocada sob ultrassom por 2 horas. Uma gota do sobrenadante foi gotejada em mica recém clivada e seca com nitrogênio ultrapuro.

A morfologia das superfícies do grafite e do óxido de grafeno reduzido foi avaliada por imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando o equipamento Zeiss EVO/MA10. Para obtenção das imagens, foram preparadas dispersões dos materiais em acetona (1 mg/mL) e, uma gota da dispersão foi gotejada sobre o porta-amostras (*stub*). Após a total evaporação do solvente, o substrato foi mantido sob pressão reduzida até o momento da medida.

O percentual de carbono, hidrogênio e nitrogênio foi verificado por análise elementar, utilizando um equipamento Perkin-Elmer Series II CHNS/O analyzer 2400.

A caracterização eletroquímica do OG e OG-r foi realizada por voltametria cíclica numa faixa de potencial de -0,5 V a 0,8 V, a 50 mV s^{-1} , bem como por espectroscopia de impedância eletroquímica, num intervalo de frequência de 0,01 Hz a 10 kHz, em potencial de circuito aberto.

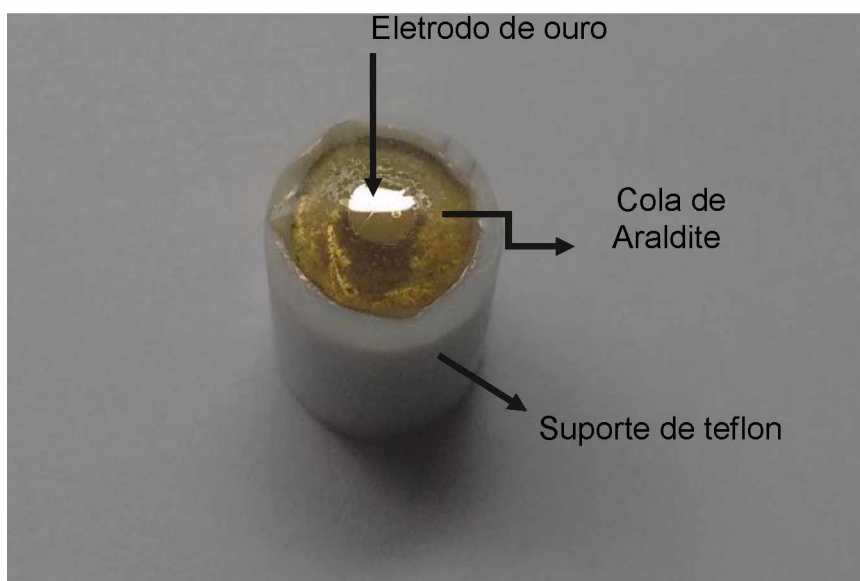
3.4.2 Desenvolvimento e caracterização da plataforma baseada em óxido de grafeno reduzido e poli(ácido 3-hidroxifenilacético)

3.4.2.1 Modificação do eletrodo de ouro com OG e OG-r

Uma dispersão aquosa do OG ou OG-r (1 mg/mL) foi tratada por ultrassom durante duas horas e mantida em repouso por 10 minutos. Em seguida, 5 μL do sobrenadante foram gotejados na superfície do eletrodo e seco a 50 °C. Os eletrodos foram nomeados Au/OG e Au/OG-r. Foi estudado o volume de OG-r gotejado na superfície do eletrodo (2, 3, 4, 5 ou 6 μL) e avaliada a resposta por voltametria cíclica, 10 ciclos de potencial, numa faixa entre 0,2 V e 0,8 V, a 100 mV s^{-1} , em solução de H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} . Os perfis eletroquímicos dos eletrodos Au, Au/OG e Au/OG-r foram avaliados a partir da sonda aniônica $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ por VC e EIS. A dispersão do OG-r foi mantida a 4°C para usos posteriores.

A morfologia de um eletrodo de ouro, bem como do eletrodo modificado com OG-r foi analisada por MEV. Este experimento foi realizado utilizando uma superfície de ouro 24 quilates ($\varnothing = 3 \text{ mm}$) (Figura 15).

Figura 15: Imagem fotográfica do eletrodo de ouro (24 quilates, $\varnothing = 3 \text{ mm}$).

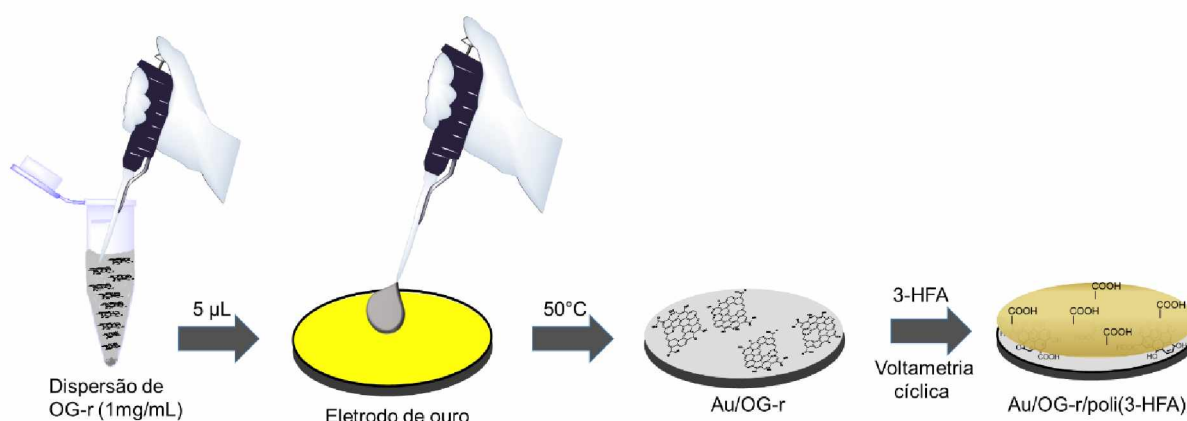


Fonte: Autor, 2016

3.4.2.2 Obtenção do compósito polimérico baseado em OG-r e poli(3-HFA)

O eletrodo modificado com OG-r foi colocado na célula de três compartimentos, contendo uma solução do monômero ácido 3-hidroxifenilacético (25 mmol L⁻¹ em ácido sulfúrico 0,5 mol.L⁻¹). O crescimento do filme foi conduzido através da polimerização eletroquímica por voltametria cíclica mediante a realização de 10 ciclos de potencial, numa faixa entre -0,3 V e 1,2 V, sendo iniciado a partir de 0,1 V, velocidade de 50 mV s⁻¹. O eletrodo foi nomeado Au/OG-r/poli (3-HFA). A Figura 16 ilustra experimentalmente a modificação do eletrodo de ouro com OG-r e subsequente polimerização eletroquímica do poli(3-HFA).

Figura 16: Representação esquemática do processo de obtenção do Au/OG-r/poli(3-HFA)



Fonte: Autor, 2016.

3.4.2.3 Caracterização do Au/ OG-r/poli(3-HFA)

Após a eletropolimerização, foram efetuados 3 ciclos de potencial em solução de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹ (entre 0 V e 1,2 V, à 50 mV s⁻¹), visando a remoção de monômero residual na superfície do eletrodo e a obtenção do perfil eletroquímico do material formado. O perfil eletroquímico do compósito polimérico obtido foi utilizado como padrão para estudos posteriores.

O Au/OG-r/poli(3-HFA) foi caracterizado por EIE e VC avaliando o perfil da sonda aniônica Fe(CN)₆^{3-/4-}. Além disso, a morfologia dos eletrodos Au e Au/OG-r/poli(3-HFA) foi estudada por AFM.

3.4.2.4 Estudo de estabilidade do Au/ OG-r/poli(3-HFA)

A estabilidade do compósito polimérico foi avaliada por um período de quatro meses. Após a obtenção do Au/OG-r/poli(3-HFA), os eletrodos foram mantidos à $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, em intervalos de 15 dias, os mesmos foram submetidos à 10 ciclos de varredura, com faixa entre 0 V e 1,2 V à 100 mV s^{-1} , em H_2SO_4 $0,5\text{ mol L}^{-1}$. As cargas e correntes de pico anódico e catódico referentes ao último ciclo de potencial foram avaliadas.

A estabilidade eletroquímica foi analisada a partir de 50 varreduras de potencial, utilizando os mesmos parâmetros descritos anteriormente.

3.4.3 Aplicação da plataforma para imobilização e detecção de oligonucleotídeos

3.4.3.1 Imobilização e hibridização de oligonucleotídeos

Sobre a superfície do eletrodo modificado OG-r/poli(3-HFA), foram gotejados $5\text{ }\mu\text{L}$ da sonda poli(GA) ($1\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$). O solvente foi evaporado num dessecador por 15 minutos. Posteriormente, o eletrodo foi lavado com solução tampão fosfato $0,1\text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7$, sob agitação, por 6 segundos, objetivando remover as sondas que não foram completamente adsorvidas. Em seguida, $5\text{ }\mu\text{L}$ de uma solução de BSA (0,5 %) foi gotejada sobre a superfície por 30 minutos a 37°C , com intuito de bloquear possíveis interações inespecíficas. Depois do bloqueio, o eletrodo foi lavado como descrito anteriormente, para a retirada da BSA em excesso e seco com gás nitrogênio. Por fim, foram gotejados $5\text{ }\mu\text{L}$ do alvo complementar poli (CT) ($1\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$) e mantido em contato por 15 minutos à 37°C para promover a hibridização. O eletrodo foi lavado como descrito anteriormente, seco com nitrogênio ultrapuro e reservado.

A resposta do eletrodo sensibilizado com poli(GA) foi avaliada para diferentes concentrações do alvo poli(CT) ($1,0 \times 10^{-8}$, $1,0 \times 10^{-7}$, $1,0 \times 10^{-6}$, $1,5 \times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$). Neste caso, o eletrodo foi incubado com $5\text{ }\mu\text{L}$ do alvo por 15 minutos a 37°C , seguido de lavagem com solução tampão fosfato para remoção do excesso de poli(CT).

Ressalta-se que o intuito desses experimentos foi mostrar a imobilização do poli (GA) sobre o Au/OG-r/poli(3-HFA) e a hibridização com o alvo complementar (poli CT), visando com isso demonstrar potencialidades dessa nova plataforma para o desenvolvimento de genossensores.

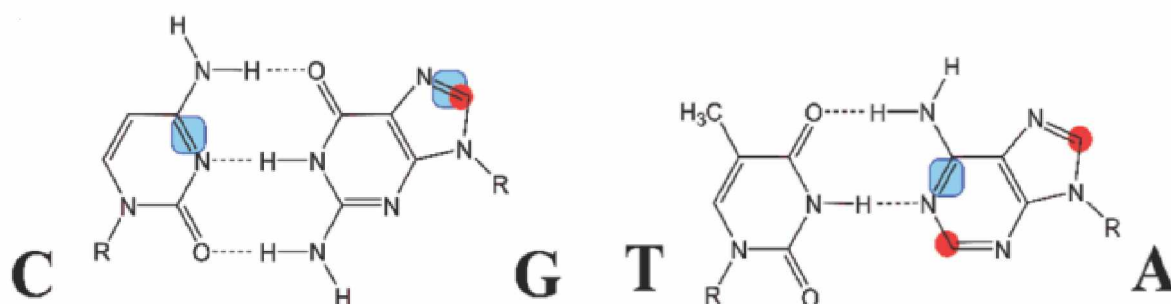
3.4.3.2 Detecção dos eletrodos sensibilizados com oligonucleotídeos

A detecção da sonda e do alvo pode ser realizada de forma direta ou indireta. A detecção direta ocorre a partir do monitoramento dos picos de oxidação das bases nitrogenadas presentes na sonda, antes e após a hibridização. Já a detecção indireta pode ser realizada a partir da oxidação/redução de um intercalador de DNA (FERREIRA, *et al.*, 2014).

Neste trabalho foram utilizadas as duas metodologias. O sinal foi monitorado por voltametria de pulso diferencial (VPD) com amplitude de pulso de 70 mV, intervalo de pulso: 0,2 s e velocidade de varredura de 30 mV s⁻¹, em solução tampão fosfato pH=7,4.

Na detecção direta, a imobilização e o fenômeno de hibridização são baseados nos sítios de oxidação das bases nitrogenadas presentes ao longo do oligonucleotídeo utilizado. Os sítios de oxidação e redução para as bases nitrogenadas são mostrados na Figura 17.

Figura 17: Pareamento Watson-Crick de bases e os grupos eletroativos. (□) sítios de redução primária (●) sítios de oxidação primária. A= adenina, T= timina, C= citosina e G= guanina (PALECEK; BARTOSIK, 2012).



Fonte: Palecek, 2012.

A detecção direta foi realizada a partir do pico de oxidação da base nitrogenada guanosina numa faixa de potencial entre 0,4 V e 1,2 V. O percentual de hibridização foi estimado a partir dos valores de carga:

$$\Delta Q(\%) = \frac{Q_{antes} - Q_{depois}}{Q_{antes}} \times 100 \quad (1)$$

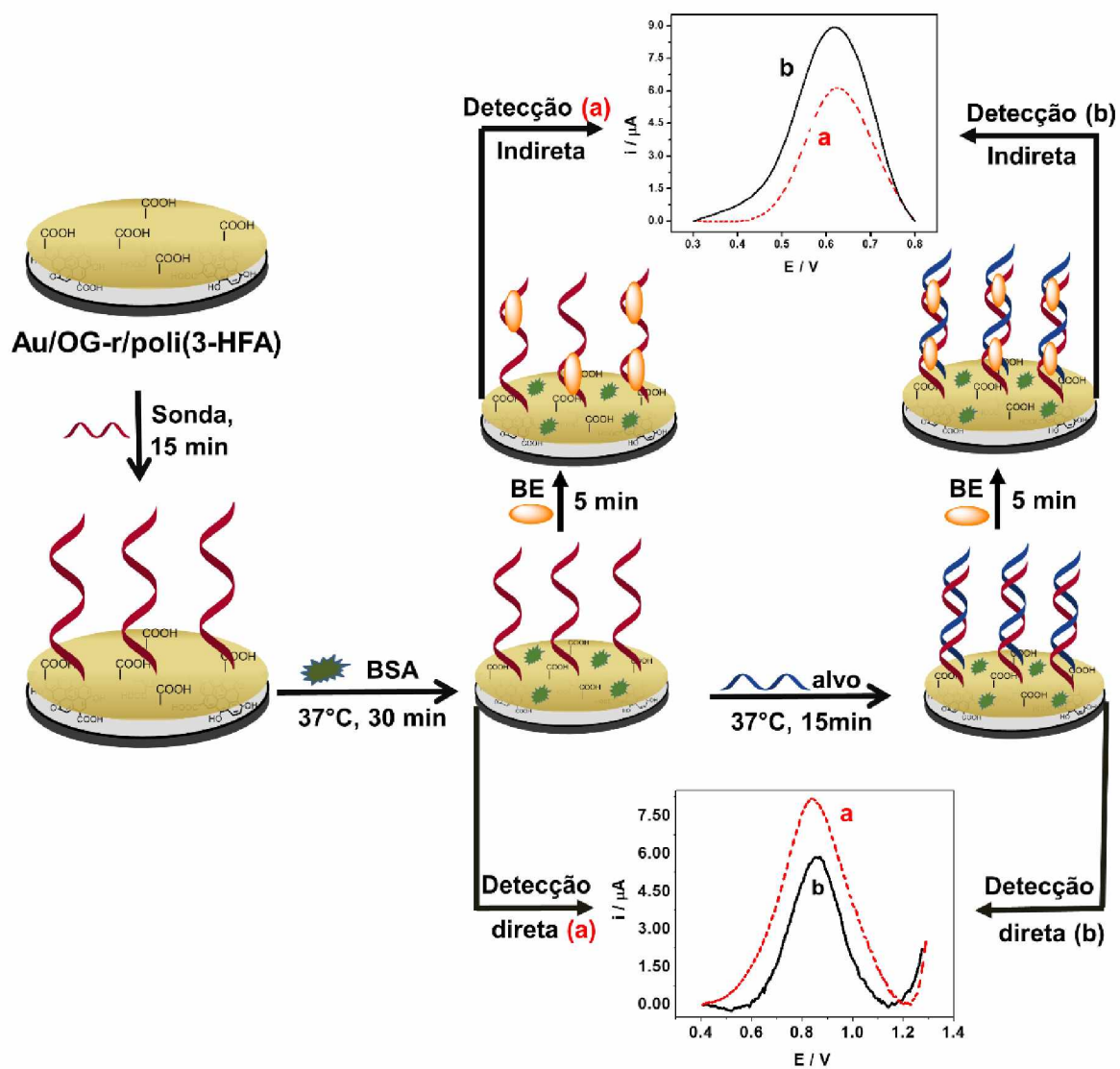
Onde Q_{antes} e Q_{depois} são os valores de carga da VPD detectados antes e após a incubação com o poli(CT), respectivamente.

Já na detecção indireta, o brometo de etídio (BE) ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi utilizado como intercalador. O BE interage de forma mais eficiente com a dupla fita do DNA, tornando-se uma alternativa para detecção indireta no evento de hibridização. Neste caso, tanto após a imobilização da sonda quanto após a hibridização com o alvo, os eletrodos foram mantidos em contato com o BE por 10 minutos, a temperatura ambiente, seguido de lavagem com solução tampão fosfato sob agitação por 6 segundos, e reservado. O pico de oxidação do BE foi monitorado numa faixa de potencial 0,3 V e 0,8 V. O percentual da quantidade de material hibridizado foi calculado de acordo com a fórmula (valores de carga):

$$\Delta Q(\%) = \frac{Q_{depois} - Q_{antes}}{Q_{depois}} \times 100 \quad (2)$$

Onde: Q_{depois} e Q_{antes} são os valores de carga referente à VPD da oxidação do BE depois e antes da incubação com o alvo complementar. A Figura 18 mostra os exemplos de preparo das seções 3.4.3.1 e 3.4.3.2.

Figura 18: Representação esquemática da metodologia de imobilização e detecção de oligonucleotídeos.



Fonte: Autor, 2016.

3.4.4 Desenvolvimento e caracterização de um biossensor para diagnóstico da dengue.

3.4.4.1 Detecção do sensor biológico

O monitoramento do sinal de resposta do peptídeo e da interação com soro humano foi realizado pela técnica de voltametria de pulso diferencial em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH}=7,4$). Os parâmetros da técnica foram otimizados a partir do sinal de resposta da imobilização do peptídeo (Tabela 5). Os melhores resultados foram encontrados para amplitude de pulso de 70 mV e velocidade de varredura de 30 mV s^{-1} (valores em negrito na Tabela 5). Os voltamogramas foram obtidos a partir do gotejamento do peptídeo ($3 \text{ } \mu\text{L}$, $1 \text{ } \mu\text{g/mL}$ em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$) sobre a plataforma, sendo mantido em contato por 40 minutos.

Tabela 5: Valores obtidos das velocidades de varredura (v) e Amplitudes de pulso (A_p), utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial.

$A_p \text{ (mV)}$	30	40	50	60	70	80
$I_p (\mu\text{A})$	2,09	4,4	5,08	5,43	7,88	5,43
$v \text{ (mV s}^{-1}\text{)}$	10	20	30	40	50	
$I_p (\mu\text{A})$	3,07	2,43	5,07	3,85	4,37	

Fonte: Autor, 2016

O peptídeo empregado neste trabalho contém em sua sequência o resíduo de aminoácido cisteína (**ACLLRNASTCA**). Este aminoácido possui o grupamento $-\text{SH}$ que apresenta pico de oxidação em eletrodos sólidos, tornando assim, uma alternativa para monitoramento de sinal no desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos. Nesse caso, o monitoramento do sinal foi avaliado numa faixa de potencial entre 0 V e 0,8 V. Os dados foram analisados após subtração do sinal de corrente da linha base.

As etapas de construção do biossensor foram caracterizadas pelas técnicas de VPD, VC e EIS avaliando o comportamento da sonda redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$. A morfologia das superfícies foi verificada por AFM.

3.4.4.2 Imobilização do peptídeo mimético (DV)

O peptídeo foi imobilizado sobre a superfície do eletrodo modificado com o compósito polimérico via ligação covalente, através da ativação das carboxilas da superfície com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (100 mmol.L^{-1})/N-hidroxisuccinimida (NHS) (100 mmol.L^{-1}). Uma vez obtida a linha base, $3 \mu\text{L}$ de uma mistura aquosa de EDC/NHS foram gotejados sobre a superfície do eletrodo e, após 10 minutos de ativação, o mesmo foi lavado em água por 15 segundos. Os tempos de 5, 10 e 15 minutos foram testados para a ativação das carboxilas. Em seguida, $3 \mu\text{L}$ do peptídeo ($1 \mu\text{g/mL}$, em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$) foram gotejados sobre o eletrodo e mantido por 30 minutos. Posteriormente o mesmo foi lavado com solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$ por 15 segundos, para remoção dos peptídeos que não interagiram com a superfície funcionalizada do eletrodo. Foram avaliados diferentes tempos de imobilização (15, 20, 30 e 40 minutos). Após a imobilização do peptídeo, foram gotejados $3 \mu\text{L}$ de uma solução de etanolamina ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) por 5 minutos para remover ligações residuais provenientes da ligação do EDC/NHS, seguido de lavagem por imersão em água por 15 segundos (SOUTO *et al.*, 2013). Posteriormente, o eletrodo foi incubado com glicina (50 mmol.L^{-1} em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$) por uma hora para bloquear ligações e sítios inespecíficos, seguido de lavagem em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$ por 15 segundos, seco e reservado (Figura 18). O soro albumina bovina (BSA) não foi escolhido como agente de bloqueio no desenvolvimento do biossensor, pois o mesmo é uma proteína conhecida por apresentar aminoácidos cisteína em sua estrutura. Como o objetivo do trabalho é desenvolver um diagnóstico por meio da oxidação do aminoácido cisteína presente na estrutura do peptídeo mimético DV, o BSA se torna inviável para estes propósitos.

Visando verificar o pico de oxidação do peptídeo, foram avaliados os sinais eletroquímicos do aminoácido cisteína livre ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e da cisteamina ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Sobre o eletrodo modificado com o nanocompósito polimérico foram gotejados $3 \mu\text{L}$ de cada uma destas soluções. Após 30 minutos, os eletrodos foram lavados por

15 segundos em solução tampão fosfato. O monitoramento do sinal foi realizado nas mesmas condições do peptídeo.

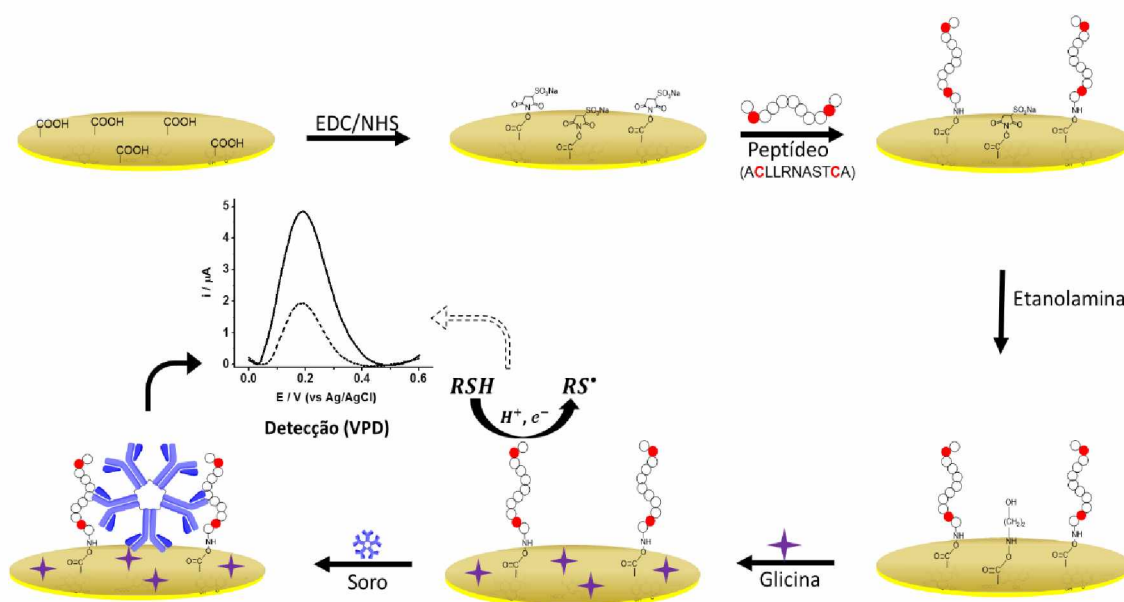
3.4.4.3 Detecção da reação entre o peptídeo mimético (DV) e amostra real

Este estudo foi realizado a partir de um *pool* de amostras de soro positivo de 10 pacientes contaminados com o vírus da dengue. O Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV1 foi incubado com 5 μ L de diferentes diluições do *pool*: 1:50, 1:100, 1:250, 1:500, 1:750, 1:1.000 e 1:10.000 por 40 minutos, seguido de lavagem com solução tampão fosfato para remoção do excesso. Através das respostas do sinal das diluições montou-se a curva de calibração do sensor biológico. O tempo necessário para a interação entre o peptídeo e o soro (30, 40, 50 ou 60 minutos) foi estudado nessa etapa.

Para verificar a seletividade do peptídeo, o mesmo foi incubado com 5 μ L de amostra de soro negativo em diluição de 1:100 por 40 minutos, seguido de lavagem com solução tampão fosfato por 15 segundos. Este parâmetro foi avaliado pelas técnicas de VC, VPD, EIE e AFM.

As etapas de construção do biossensor foram avaliadas por AFM, EIE, VC e VPD. Os resultados de EIE foram tratados a partir da simulação do espectro de impedância com circuitos elétricos, através do software NOVA1.1. A Figura 19 mostra de forma resumida as etapas de preparo do biossensor.

Figura 19: Representação esquemática da imobilização do peptídeo sobre o Au/OG-r/poli(3-HFA) e interação com o anticorpo IgM presente em amostra de soro.



Fonte: Autor, 2016.

3.4.4.4 Estudo de estabilidade do biossensor

A fim de estudar o comportamento do biossensor frente ao armazenamento, foi avaliada sua resposta eletroquímica após interação com o *pool* de amostra positiva em diluição 1:100 por voltametria de pulso diferencial em solução tampão fosfato pH=7,4. Depois da primeira leitura (dia zero), as subseqüentes medidas foram realizadas após 10, 20, 30 e 40 dias. O armazenamento foi realizado a 8°C, em recipientes fechados e secos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

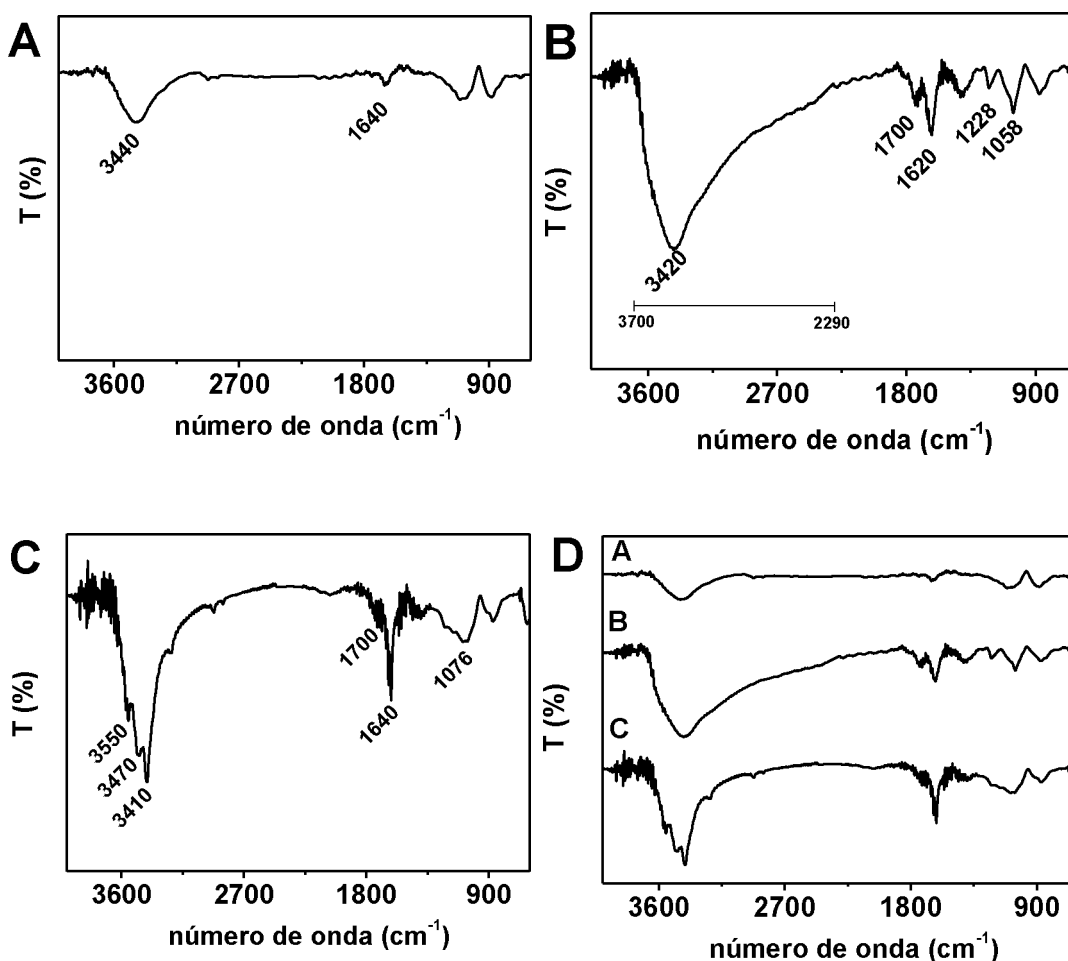
Os resultados experimentais serão apresentados na mesma sequência em que foram realizados os procedimentos. Vale ressaltar que a síntese e caracterização dos materiais OG e OG-r, bem como a caracterização da plataforma baseada em OG-r e poli(3-HFA) (superfície transdutora), são imprescindíveis para o desenvolvimento do biossensor para diagnóstico da dengue. Conhecer o sistema fornece respaldo experimental para garantir um bio-direcionamento da sonda, visando uma boa estabilidade, seletividade e sensibilidade do biossensor. Além disso, uma plataforma bem estabelecida é um passo importante para criar dispositivos com intuito de inserção no mercado.

4.1. CARACTERIZAÇÃO DO ÓXIDO DE GRAFENO E ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO

4.1.2 Estudos de Infravermelho e Análise Elementar

Inicialmente foram verificadas as modificações químicas nos processos de síntese por infravermelho com transformada de Fourier. A Figura 20 mostra os espectros de FT-IR para o grafite, OG e OG-r.

Figura 20: Espectros de infravermelho obtidos em pastilhas de KBr para: (a) grafite, (b) óxido de grafite, (c) óxido de grafeno reduzido e (d) sobreposição de a, b e c.



Fonte: Autor, 2016

O grafite apresenta algumas bandas características em 3440 e 1640 cm^{-1} , atribuídas a estiramento de vibração do grupo -OH e de ligação dupla entre carbonos (-C=C-) de anéis aromáticos. A banda da hidroxila pode ser oriunda da oxidação do grafite com o ar, bem como pode advir de umidade referente ao procedimento realizado em pastilha de KBr (SHESHMANI; AMINI, 2013; XU; YUAN; WANG, 2014).

Após a oxidação do grafite, o espectro apresentou diferenças significativas, sendo observada uma banda intensa e larga que vai de aproximadamente 3700 a 2290 cm^{-1} referente à deformação axial O-H de ácidos carboxílicos. Um pico em 1700 cm^{-1} representa uma deformação axial -C=O , comumente encontrada em ácidos carboxílicos, entretanto também pode estar associada a carbonila de cetona e aldeídos. Outros picos também foram observados a 1228 cm^{-1} , atribuído a estiramento

C-OH, indicativo da presença de hidroxilas e a 1058 cm^{-1} referente a epóxidos (-C-O-C-) (YANG, JUAN *et al.*, 2012). Estes resultados indicam que o OG produzido possui vários grupos contendo oxigênio como epóxidos, hidroxilas, carbonilas e carboxilas.

Depois da reação com hidrato de hidrazina, os resultados mostraram que houve uma diminuição dos grupos contendo oxigênio, uma vez que houve uma diminuição da intensidade das bandas e/ou picos. Adicionalmente, apareceram picos de estiramento a 3560 , 3477 e 3410 cm^{-1} , sugerindo que grupos amino foram formados no material, possivelmente devido à reação da hidrazina com grupos epóxidos do óxido de grafeno (HUANG, K.-J. *et al.*, 2011). O pico referente à ligação dupla entre carbonos (-C=C-) mostrou-se mais intenso, indicando restauração das ligações π - π . Além disso, os resultados demonstram que os grupos carboxílicos foram parcialmente reduzidos a grupos hidroxila devido à intensidade da banda em 3420 cm^{-1} . As atribuições aos picos e bandas seguem na Tabela 6.

Tabela 6: Posição dos picos e bandas de absorção obtida por FT-IR e suas atribuições para: grafite, OG e OG-r.

Posição da banda ou pico / cm^{-1}			Processo atribuído	Referência
Grafite	OG	OG-r		
3440	3420		Deformação axial de O-H, sendo de carboxilas para OG e OG-r	(SHESHMANI; AMINI, 2013)
1640	1620	1640	Estiramento da ligação -C=C-	(JABARI SERESHT <i>et al.</i> , 2013)
	1700	1700	Deformação axial -C=O, ácidos carboxílicos	(SHESHMANI; AMINI, 2013)
	1228	1076	Deformação axial -C-O, característico de álcoois	(YANG, JUAN <i>et al.</i> , 2012)
	1050	1076	Estiramento -C-O-C-, característico de éter	(YANG, JUAN <i>et al.</i> , 2012)
3560, 3477, 3410			Deformação axial -N-H, característico de aminas	(HUANG, <i>et al.</i> , 2011)

Fonte: Autor, 2016.

A Tabela 7 mostra os resultados da análise elementar realizados por combustão. Os resultados evidenciaram um aumento na taxa dos átomos C/O no óxido de grafeno reduzido (1,97) comparado ao óxido de grafeno (0,8). Esses valores indicam que átomos de oxigênio foram removidos durante o processo de redução. Em adição, foram evidenciados átomos de nitrogênio numa taxa de (34,82), indicando que o processo de redução foi acompanhado pela incorporação desse átomo, devido à utilização da hidrazina (PARK *et al.*, 2011; STANKOVICH *et al.*, 2007)

Tabela 7: Dados da Análise elementar realizada por combustão para OG e OG-r

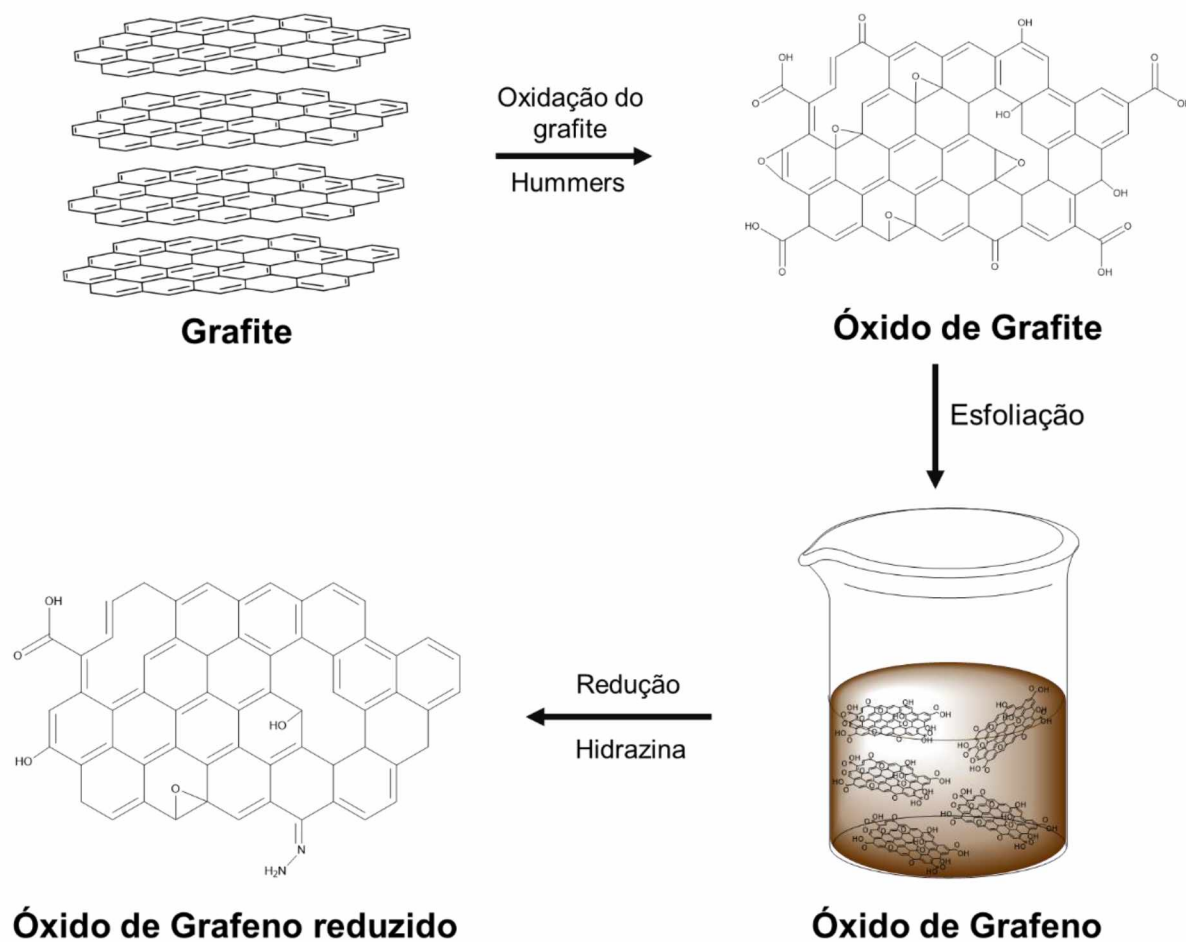
Identificação	%C	%H	%N	%O
OG	43,52	2,14	-0,03	54,34
OGr	64,07	1,68	1,84	32,41

Fonte: Autor, 2016.

Conforme relatado na seção 1.7, as estruturas químicas do OG e OG-r ainda não foram totalmente estabelecidas na literatura e muitos esforços têm sido empregados nessa área. A maior dificuldade está relacionada com a estrutura não estequiométrica do OG. Todavia, os resultados experimentais deste trabalho apontam que o OG apresenta os grupos funcionais epóxido, carboxila, carbonila e hidroxila. O OG-r apresenta grupos remanescentes de oxigênio. As evidências apontam para hidroxilas, carboxilas e carbonilas. O material pode conter ainda alguns grupos epóxidos.

A Figura 21 mostra um modelo ilustrativo das reações envolvidas no processo de obtenção do óxido de grafeno reduzido, bem como, algumas estruturas representativas dos materiais obtidos.

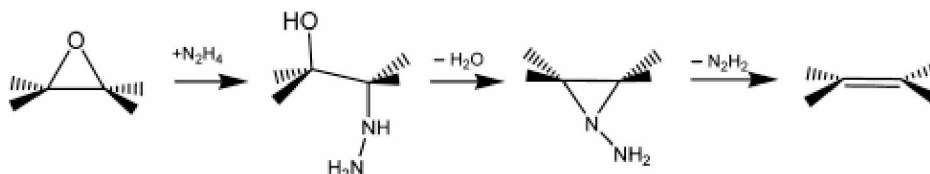
Figura 21: Figura demonstrativa das reações para obtenção do OG-r. Os modelos estruturais do óxido de grafite e OG-r são apenas ilustrativos.



Fonte: Autor, 2016

Os mecanismos exatos para a remoção dos grupos funcionais oxigenados por via química (por exemplo, hidrazina H_2N_4) ainda não são claros. Entretanto, alguns estudos evidenciaram que a hidrazina é eficiente para a remoção de grupos epóxido do OG (GAO; JANG; NAGASE, 2010). A reação pode ser descrita de acordo com a Figura 22.

Figura 22: Figura demonstrativa da reação de redução dos grupos epóxido com hidrazina.

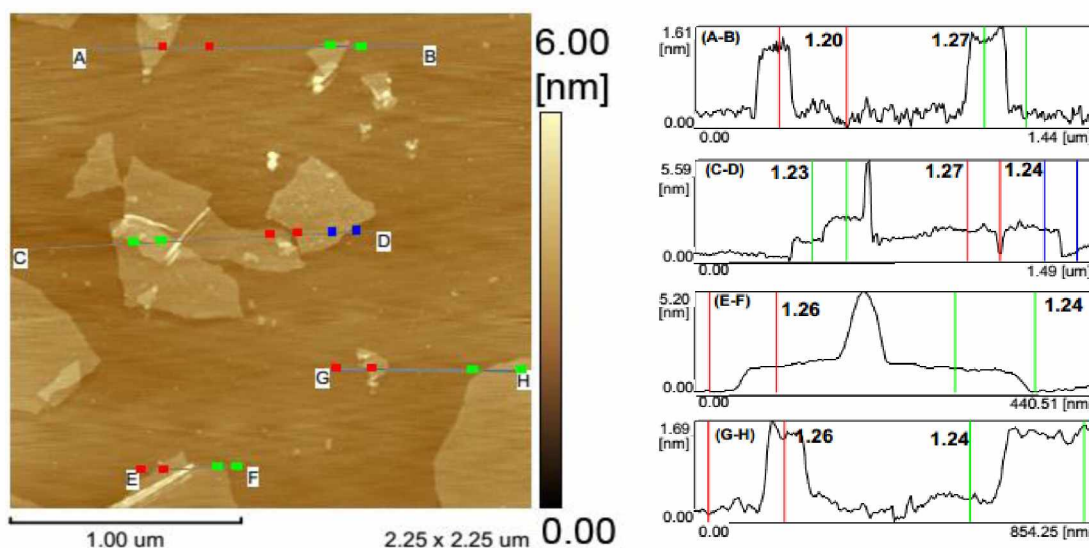


Fonte: Stankovich *et al.*, 2007

4.1.3 Estudos por MEV e AFM

A Figura 23 mostra a imagem da microscopia de força atômica e o perfil da altura (espessura) das folhas de OG.

Figura 23: Imagens de AFM para as folhas do OG esfoliado e altura do perfil em diferentes posições da superfície.



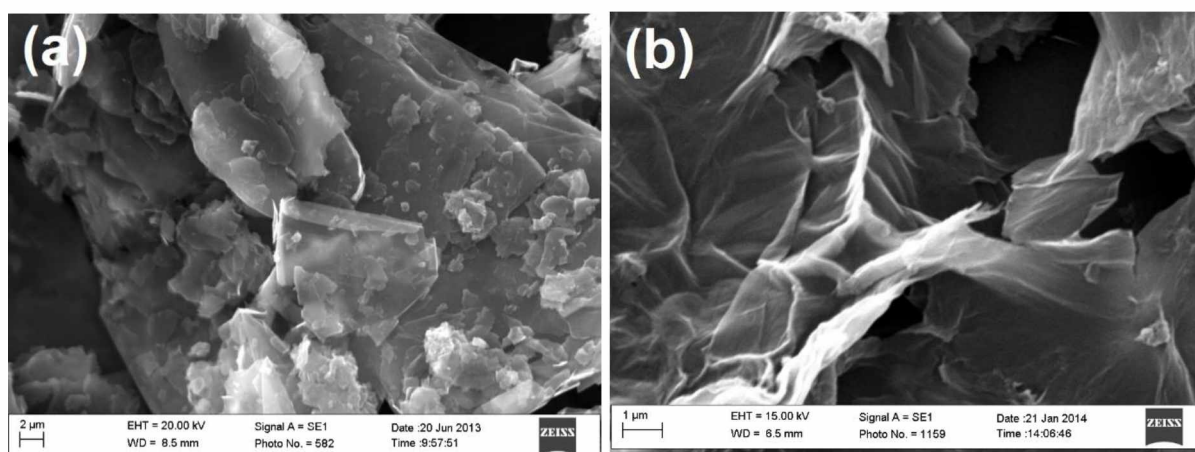
Fonte: Autor, 2016

Essas medidas revelaram que o material produzido tem uma espessura de aproximadamente 1,24 nm (WANG, D. *et al.*, 2010). Sabe-se que a espessura teórica de uma folha de grafeno é de aproximadamente 0,35 +/- 0,01 nm (GUPTA *et al.*, 2006; STANKOVICH *et al.*, 2007). Entretanto, é esperado que as folhas do OG sejam um pouco mais espessas, devido às ligações covalentes com os grupos funcionais de

oxigênio, logo acima e abaixo das folhas. Além disso, a espessura pode estar relacionada com a presença de duas ou mais folhas do material. Todavia, esses resultados indicam que o tratamento com ultrassom foi eficiente para a esfoliação do OG.

A Figura 24 mostra as imagens de microscopia eletrônica de varredura para o grafite e OG-r. Pode-se observar que o grafite (Figura 24 a) apresenta-se em formato de lâminas compactas e ordenadas de tamanhos variados e as extremidades apresentam um alto grau de ordenação. Ao analisar a microscopia do OG-r (Figura 24 b) observa-se que as folhas são enrugadas e com distribuição aleatória. Isso pode acontecer devido a um desvio dos átomos de carbono hibridizados em sp^2 que são totalmente planares na estrutura do grafeno puro (JABARI SERESHT *et al.*, 2013). Além disso, os grupos funcionais remanescentes (hidroxilas e carboxilas) podem promover ligação de hidrogênio, ocasionando esse desordenamento.

Figura 24: Imagens de MEV do (a) grafite e (b) óxido de grafeno reduzido.



Fonte: Autor, 2016

Não foi possível calcular a espessura de óxido de grafeno reduzido, entretanto, os resultados obtidos por AFM e MEV sugerem que o óxido de grafeno reduzido possui escala nanométrica.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DO ELETRODO DE OURO MODIFICADO COM OG-R E POLI(3HFA)

4.2.1 Modificação do eletrodo de ouro com OG e OG-r

Inicialmente, verificou-se a modificação do eletrodo de ouro com OG-r. Ressalta-se que essa etapa é fundamental para os processos subsequentes, uma vez que é necessário garantir a uniformidade da superfície para se obter reprodutibilidade no desenvolvimento do nanocompósito polimérico e biossensor. As etapas de esfoliação do OG bem como obtenção do OG-r, foram acompanhadas por fotografias como mostra a Figura 25. As imagens revelam que o OG tem cor marrom e, após o processo de redução, muda para preto, indicando o processo de re-grafitização do OG pela remoção dos grupos funcionais de oxigênio (KRISHNAMOORTHY; KIM; KIM, 2013). Visualmente, é possível perceber a homogeneidade da dispersão.

Figura 25. Imagem fotográfica da dispersão aquosa do OG e OG-r

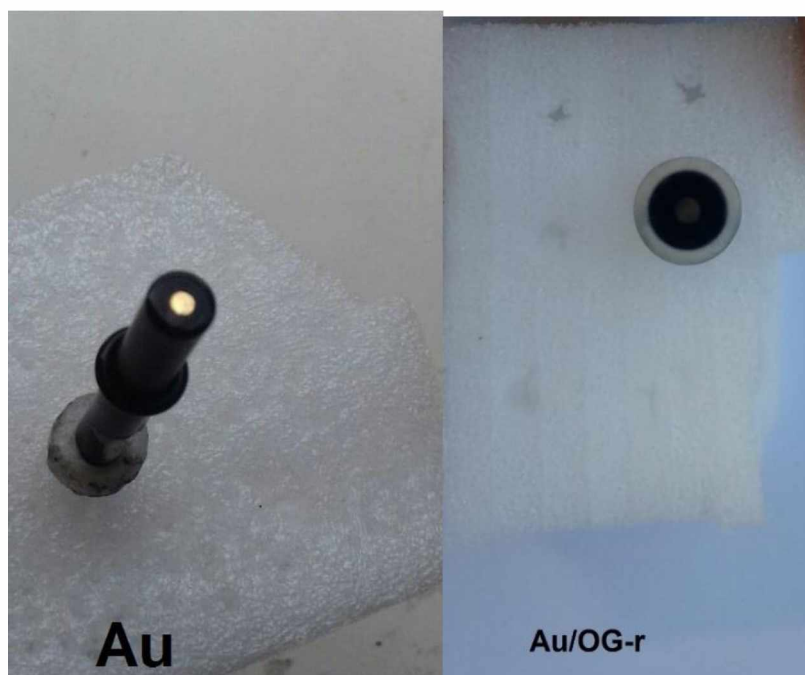


Fonte: Autor, 2016

A Figura 26 mostra a imagem fotográfica do eletrodo de ouro modificado com OG-r sob as condições estabelecidas. Destaca-se que as condições experimentais foram bem exploradas, devido à importância de se obter resultados

confiáveis e reprodutíveis. Pode-se observar uma cobertura homogênea do OG-r em toda a superfície do ouro.

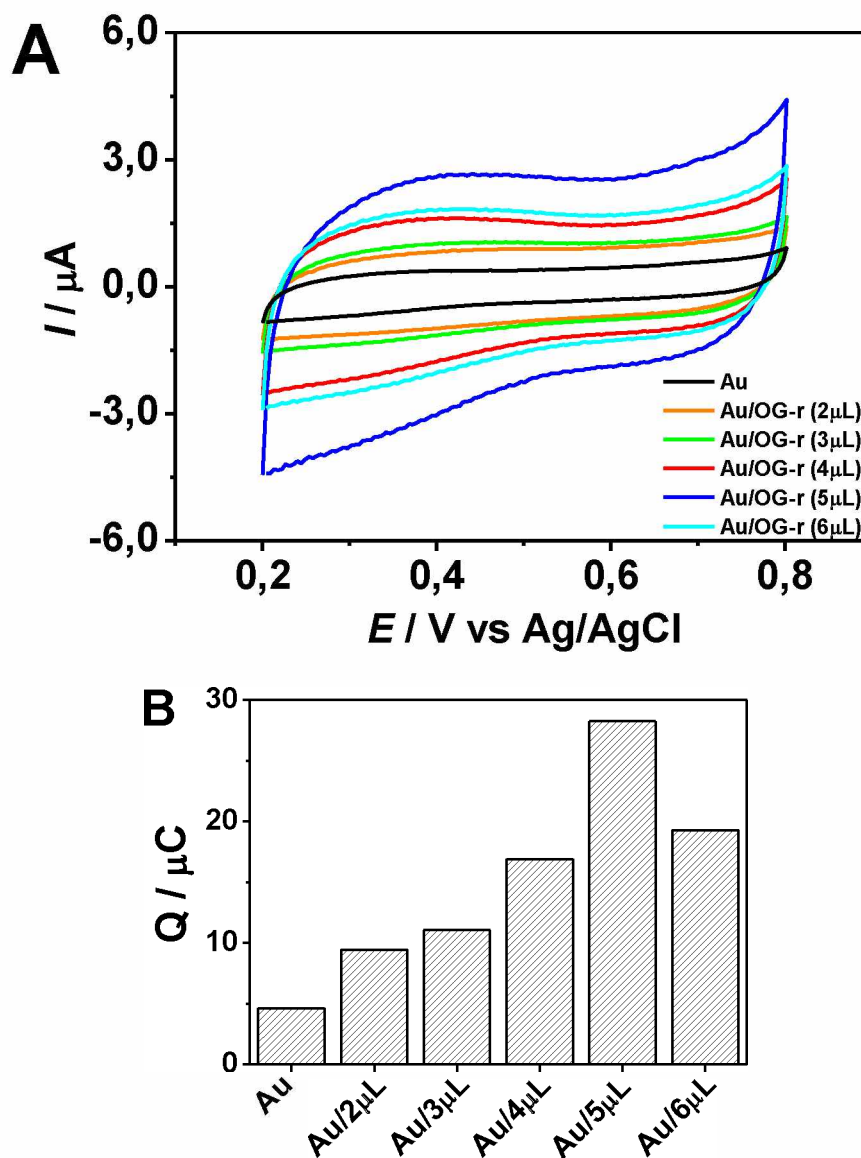
Figura 26. Imagem fotográfica do eletrodo de ouro sem modificação (Au) e modificado com OG-r (Au/OG-r)



Fonte: Autor, 2016

A Figura 27a mostra os voltamogramas cíclicos referentes à modificação do eletrodo de ouro com OG-r em diferentes dispersões (2, 3, 4, 5 e 6 μL). Os dados referem-se ao último ciclo de 10 varreduras de potencial. A Figura 27b mostra os histogramas referentes à carga.

Figura 27: Voltamogramas cíclicos para (a) eletrodo de ouro sem modificação e modificado com diferentes dispersões de OG-r e (b) Gráfico de barra da quantidade de carga das diferentes dispersões. Eletrólito: H_2SO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$); $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



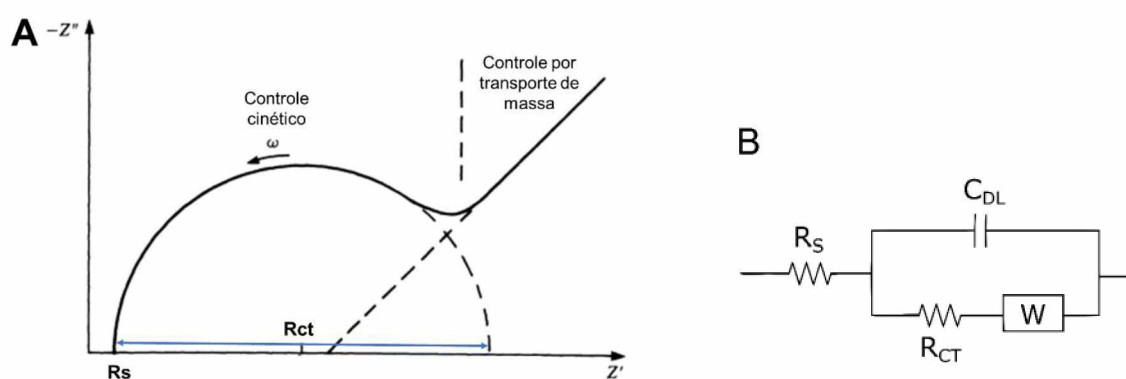
Fonte: Autor, 2016

Os resultados mostraram que os valores de corrente, bem como os valores de carga aumentaram até atingir uma quantidade de 5 μL da dispersão do OG-r, para quantidades acima de 5 μL , esses valores tenderam a diminuir. Isso indica que 5 μL da dispersão do OG-r foi o suficiente para obter uma fina cobertura sobre o eletrodo. Além disso, não foi observada uma cobertura homogênea da superfície para quantidades menores do que 5 μL . Os valores diminuiram para quantidades acima de

5 μL possivelmente devido à uma camada espessa sobre a superfície, provocando lixiviamento.

A fim de verificar as características eletroquímicas do OG e OG-r, os mesmos foram submetidos a medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria cíclica, em sonda redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$. A técnica de EIE é eficiente e muito utilizada para caracterizar interfaces envolvendo eletrodos quimicamente modificados. Ela permite a obtenção de informações de diferentes processos eletroquímicos que ocorrem nas superfícies dos eletrodos, sendo possível associar estes processos a componentes elétricos como resistores, capacitores ou indutores, de modo que o entendimento do sistema como um todo seja possibilitado. O diagrama de Nyquist é comumente utilizado para avaliar esses parâmetros (Figura 28). Os espectros obtidos incluem um semicírculo e uma região linear. O semicírculo corresponde ao processo de transferência eletrônica. Já a região linear refere-se a processos difusionais. O diâmetro do semicírculo, de forma geral, representa a magnitude da resistência à transferência eletrônica na superfície do eletrodo (R_{ct}) (SUNI, 2008).

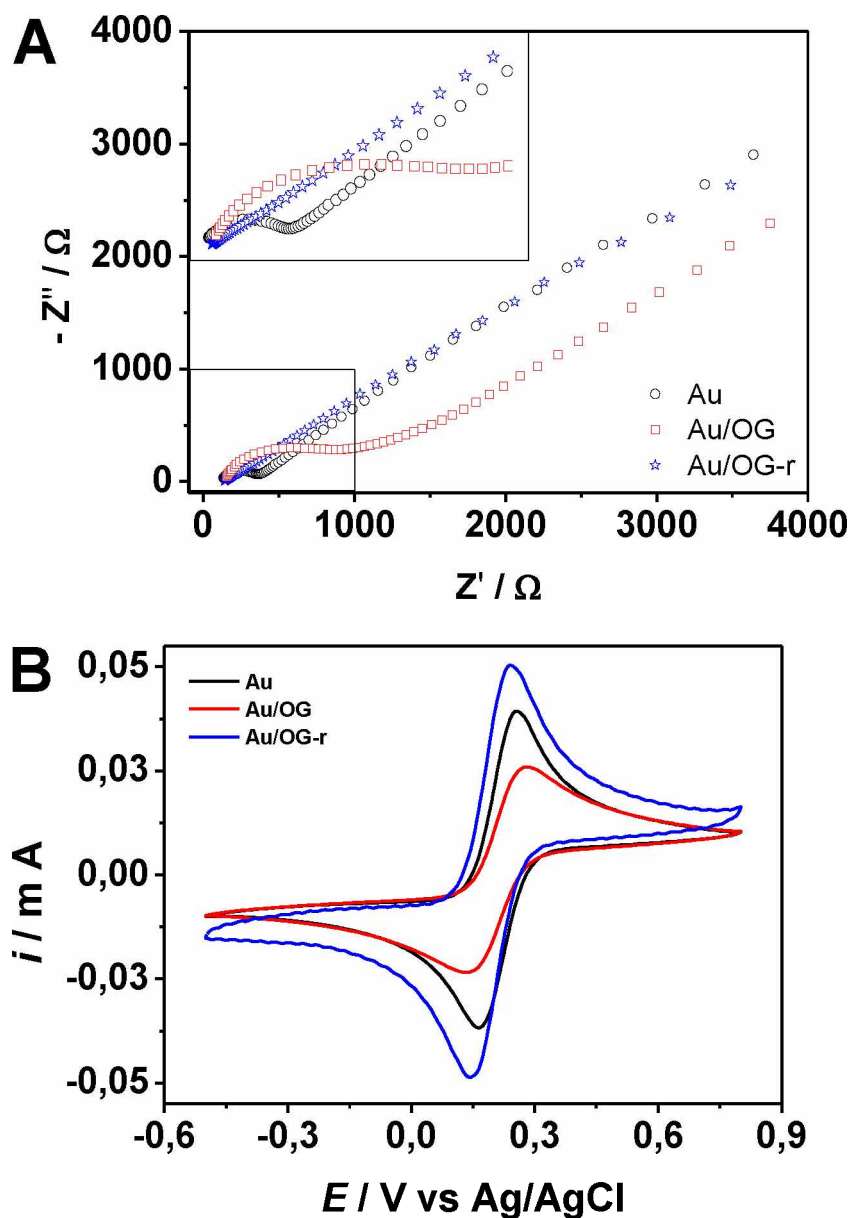
Figura 28: A) Diagrama de Nyquist B) Circuito equivalente que serve de modelo para explicar os dados experimentais. R_{S} : resistência da solução; R_{ct} : resistência à transferência de carga; W : impedância de Warburg; C_{DL} : capacitância.



Fonte: Autor, adaptado de Brett; Brett, 1994.

A Figura 29 mostra os diagramas de Nyquist e respectivos voltamogramas cíclicos para o eletrodo de ouro sem modificação e modificado com OG e OG-r.

Figura 29: (a) Diagramas de Nyquist e (b) voltamogramas cíclicos para: Au, Au/OG e Au/OG-r. Eletrólito: solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol L⁻¹; Frequência: 10 KHz a 0,1 Hz; V= 50 mV s⁻¹.



Fonte: Autor, 2016

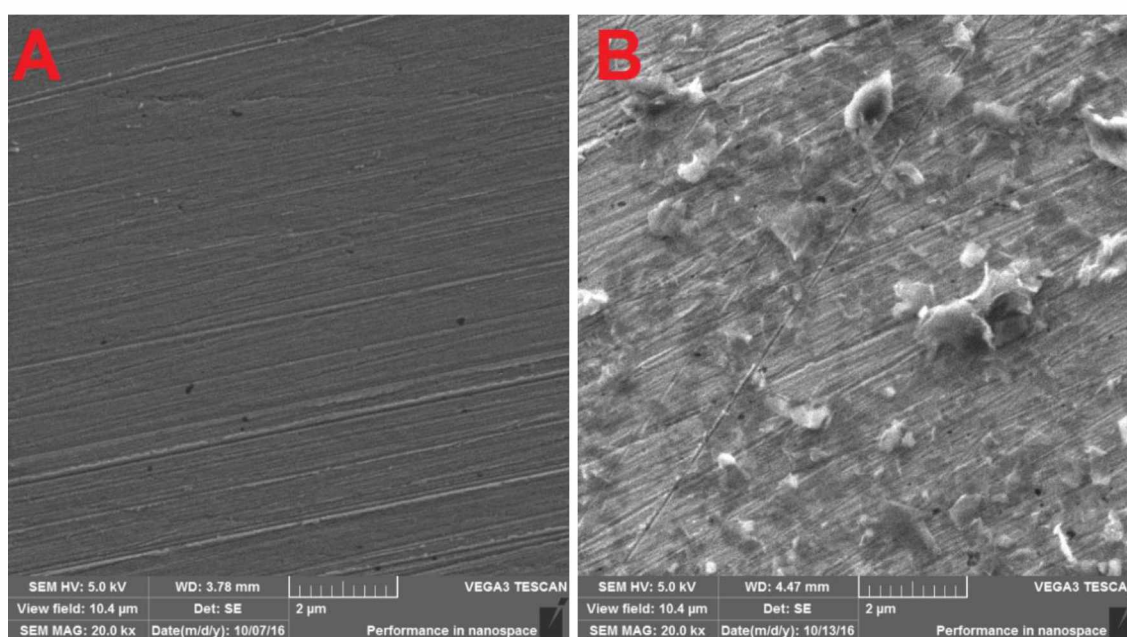
O eletrodo modificado com OG apresentou o diâmetro do semicírculo muito maior que o eletrodo sem modificação, evidenciando que o OG teve um aumento à resistência de transferência de carga (R_{tc}) (Figura 28a). Isso ocorre devido à resistência elétrica que o material promove, devido à presença dos grupos funcionais epóxidos que interrompem a nuvem π de elétrons do mesmo. Além disso, os grupos

funcionais oxigenados promovem repulsão eletrônica ao par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, ocasionando aumento da resistência elétrica. Já o eletrodo modificado com o OG-r não evidenciou um semicírculo com resistência significativa, evidenciando a alta condutividade do material (DU *et al.*, 2012).

Os voltamogramas mostrados na Figura 28b confirmam os resultados da impedância. Pode-se observar que o eletrodo de ouro limpo apresenta picos de oxidação e redução bem definidos. Após a modificação com OG os valores de corrente diminuíram, entretanto, depois da modificação com OG-r esses valores foram superiores ao eletrodo de ouro sem modificação. Esses resultados evidenciaram aumento da condutividade elétrica do OG após redução, indicando que o OG-r é promissor para modificação de eletrodos a fim de promover sítios para adsorção e transferência eletrônica no desenvolvimento do nanocompósito polimérico aqui proposto.

A Figura 30 mostra as imagens de MEV de uma superfície de ouro sem modificação e modificada com o OG-r. Pode ser observado que, após a modificação com OG-r, o material fica bem distribuído em quase toda a superfície eletródica, indicando uma boa cobertura.

Figura 30: Imagens de MEV para (a) superfície de ouro sem modificação e (b) modificado com OG-r



Fonte: Autor, 2016

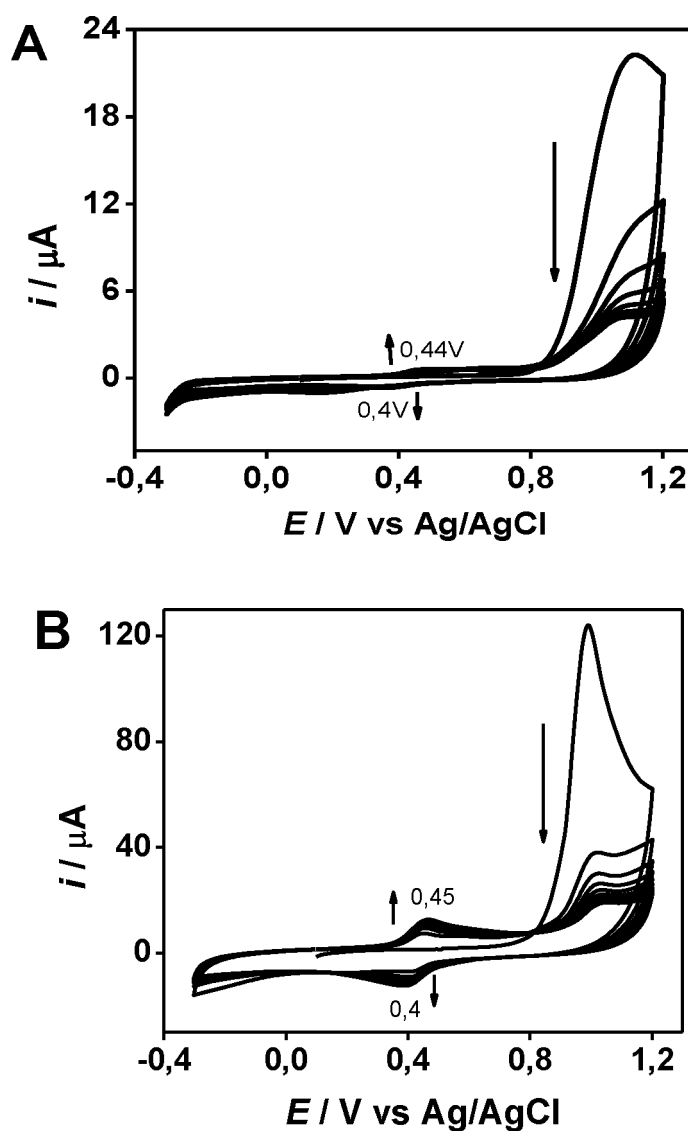
O rendimento dos materiais obtidos não foram calculados, entretanto destaca-se que foi realizada apenas uma síntese do óxido de grafeno, sendo que a quantidade de material obtido foi suficiente para desenvolver este trabalho bem como outros trabalhos em colaboração. É importante ressaltar que este material foi produzido no primeiro ano de pesquisa (total de 4 anos) e suas propriedades na obtenção dos filmes poliméricos foram mantidas durante esse período. A estabilidade do material também foi observada para o óxido de grafeno reduzido. Grande parte do trabalho foi desenvolvido com a primeira síntese do nanomaterial. Apenas durante o desenvolvimento do biossensor para o diagnóstico da dengue é que foi necessária outra síntese, sendo que o nanomaterial bem como o nanocompósito polimérico mantiveram suas características. Esses indícios apontam a aplicabilidade dos nanomateriais no campo industrial.

4.2.2 Obtenção do compósito polimérico baseado em OG-r e poli (3-HFA)

Os isômeros do ácido hidroxifenilacético têm sido explorados pelo grupo de pesquisa LAFIP, e dentre eles o ácido 3-hidroxifenilacético foi escolhido para o desenvolvimento deste trabalho. Este monômero teve destaque, pois os estudos revelaram que, comparado a outros polímeros, o poli(3-hidroxifenilacético) apresentou melhor cinética eletroquímica, condutividade e um bom rendimento de eletrossíntese. Além disso, bons resultados foram obtidos nos estudos de estabilidade e reversibilidade, devido à sua estrutura tridimensional, o que viabiliza o processo de dopagem e desdopagem dos contra íons durante os processos de oxidação e redução, respectivamente. E ainda, como citado anteriormente, este polímero mostrou ótimos resultados para o desenvolvimento de biossensores.

A Figura 31 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos durante a polimerização eletroquímica do ácido 3-hidroxifenilacético sobre o eletrodo de ouro sem modificação [Au/poli(3-HFA)] e modificado com OG-r [Au/OG-r/poli(3-HFA)] a uma velocidade de varredura de 50 mVs⁻¹.

Figura 31: Voltamogramas cíclicos referente à polimerização eletroquímica do ácido 3-hidroxifenilacético (25 mmol L⁻¹, em H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹) para (a) Au e (b) Au/OG-r. Total de 10 ciclos de varredura a 50 mV s⁻¹.

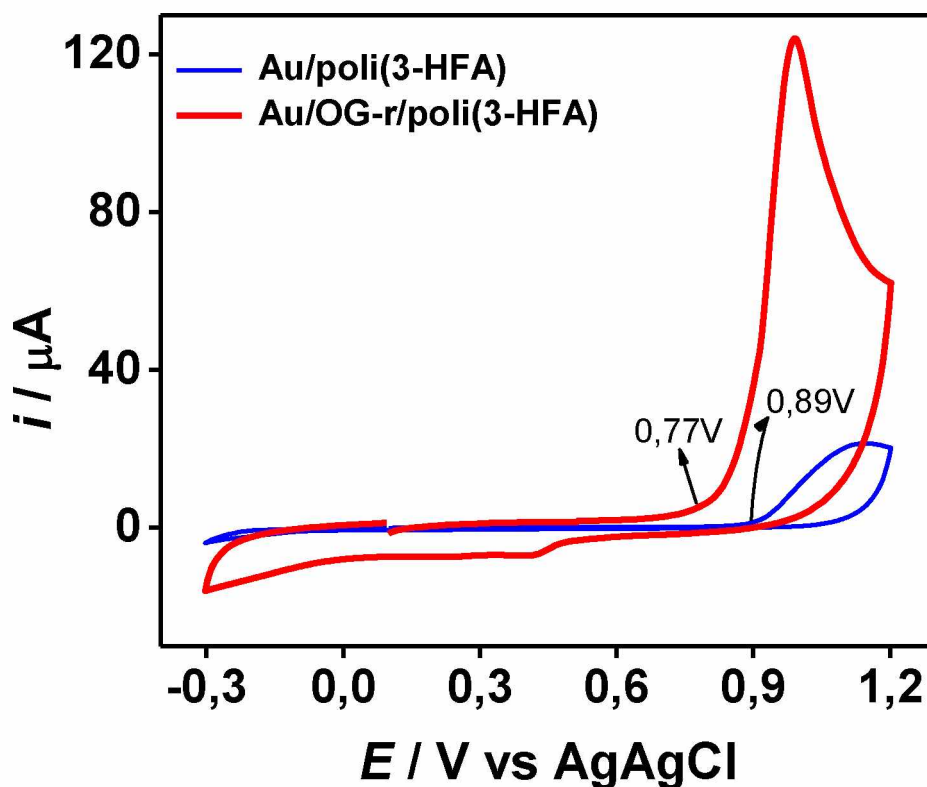


Fonte: Autor, 2016

Como pode ser observado, os perfis voltamétricos dos processos redox referentes ao crescimento do polímero ocorrem na mesma região de potencial (indicados pelas setas pequenas à esquerda). Sendo o pico de oxidação em aproximadamente 0,44 V para Au/poli(3-HFA) e 0,45 V para Au/OG-r poli(3-HFA) respectivamente, com correspondente pico de redução em 0,40V para ambos os polímeros. Esses resultados estão de acordo com o descrito anteriormente pela

literatura (OLIVEIRA, *et al.*, 2009; RODRIGUES, *et al.*, 2015). O processo referente à oxidação e consumo do monômero (indicados pelas setas pequenas à esquerda) apresentaram diferenças notáveis como mostra a Figura 32.

Figura 32: Voltamogramas cíclicos da primeira varredura de potencial para: (—) Au/poli(3-HFA) e (—) Au/OG-r/poli(3-HFA)



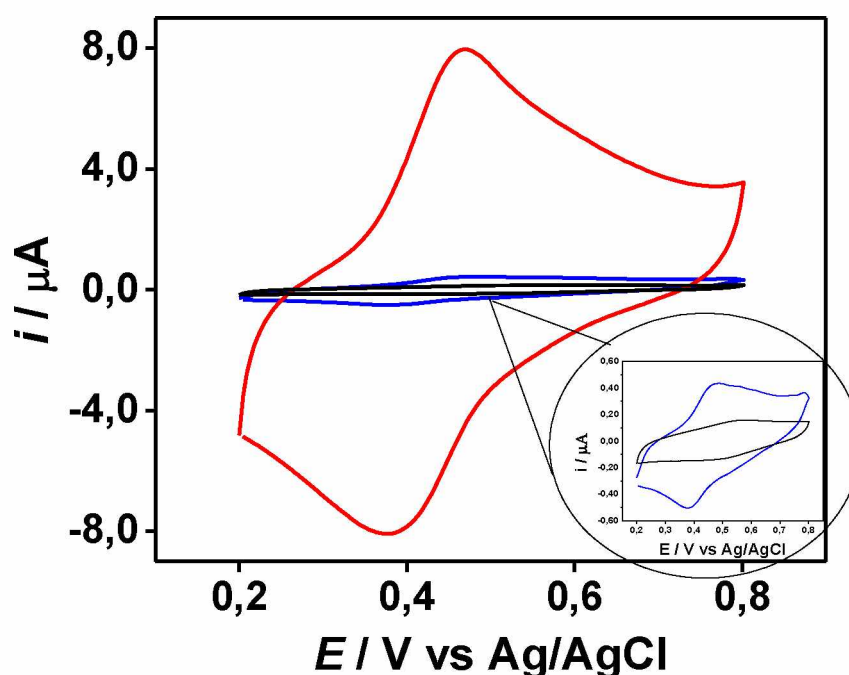
Fonte: Autor, 2016

A Figura 32 mostra que a oxidação do monômero sobre a superfície de ouro sem modificação inicia em aproximadamente 890 mV. Já para o eletrodo modificado com OG-r, o processo é iniciado em torno de 770 mV. Esses resultados demonstraram que a superfície modificada com OG-r favorece a oxidação do monômero, uma vez que houve uma diminuição do potencial de oxidação em aproximadamente 120 mV. Além disso, a corrente de pico de oxidação do monômero sobre a superfície de ouro foi de 22 μA , já para a superfície Au/OG-r foi de 124 μA , indicando que uma quantidade maior de monômero foi oxidada sobre a superfície modificada ($\cong 6$ vezes). Esses resultados mostram o potencial do nanomaterial para a oxidação do monômero.

4.2.3 Caracterização eletroquímica do Au/ OG-r/poli(3-HFA)

A Figura 33 mostra os voltamogramas cíclicos em solução de H_2SO_4 ($0,50 \text{ mol L}^{-1}$) livre de monômero para Au, Au/poli(3-HFA) e Au/OG-r/poli(3-HFA), os estudos foram realizados a fim de analisar a resposta redox relativa ao polímero.

Figura 33: Voltamogramas cíclicos comparativos para (—) Au, (—) Au/poli(3-HFA) e (—) Au/OG-r/poli(3-HFA) em H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2016

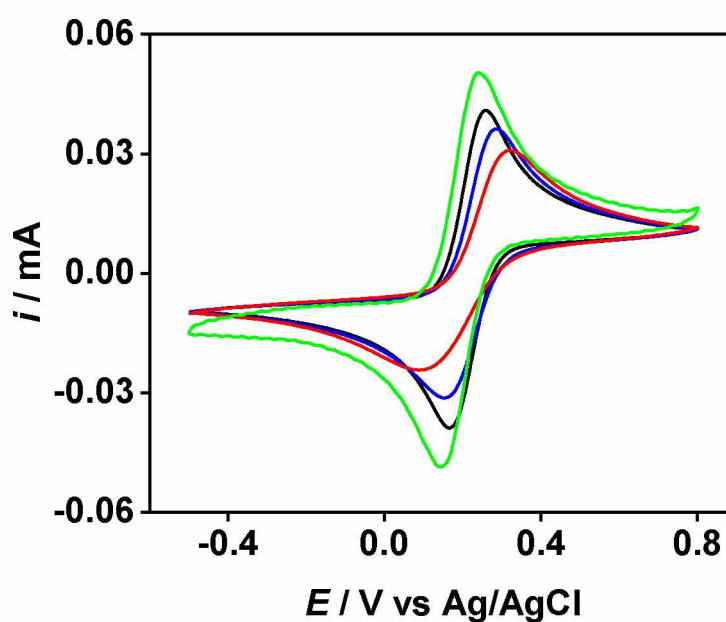
Observa-se que ambos Au/poli(3-HFA) e Au/OG-r/poli(3-HFA) apresentam um pico de oxidação em $+0,46 \text{ V}$ e o correspondente pico de redução a $0,37 \text{ V}$, evidenciando a formação de um material eletroativo na superfície do eletrodo. Entretanto, um aumento expressivo nas correntes de pico anódico e catódico foi observado para o Au/OG-r/poli(3-HFA), quando comparado com o Au/poli(3-HFA), devido ao efeito de aumento da área superficial que o nanomaterial promove, resultando na formação de uma maior quantidade de material eletroativo. Para obter maiores evidências, os valores de carga foram calculados a partir dos voltamogramas cíclicos. Foram encontrados os valores de $5,22 \times 10^{-5} \text{ mC}$ e $2,76 \times 10^{-6} \text{ mC}$ para o Au/OG-r/poli(3-HFA) e Au/poli(3-HFA) respectivamente. Estes valores evidenciam

que a quantidade de poli(3-HFA) formado sobre o eletrodo modificado com Au/OG-r é cerca de 19 vezes maior do que no eletrodo de ouro modificado apenas com poli(3-HFA).

Observou-se que o óxido de grafeno reduzido foi um ótimo material para eletrodeposição de poli(3-HFA). Esse resultado pode estar relacionado à contribuição combinada das estruturas do OG-r e poli(3-HFA). Como citado anteriormente, o poli(3-HFA) apresenta uma cadeia de poliéteres com grupos carboxilas livres e o OG-r pode apresentar grupos carboxilas, hidroxilas, aminas e epóxidos remanescentes. Todavia, podem ocorrer ligações do tipo ligação de hidrogênio entre esses grupos funcionais. E ainda, interações entre as nuvens π de elétrons da cadeia polimérica e a estrutura do OG-r.

O par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/4-$ é sensível às cargas da superfície eletródica devido às cargas negativas em ambos estados redox, por isso o mesmo foi empregado para caracterizar os eletrodos modificados. Os resultados são mostrados na Figura 34.

Figura 34: Voltamogramas cíclicos para (—) Au, (—) Au/OG-r, (—) Au/poli(3-HFA) e (—) Au/OG-r/poli(3-HFA) em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5,0 mmol L⁻¹, $V=50 \text{ mVs}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2016

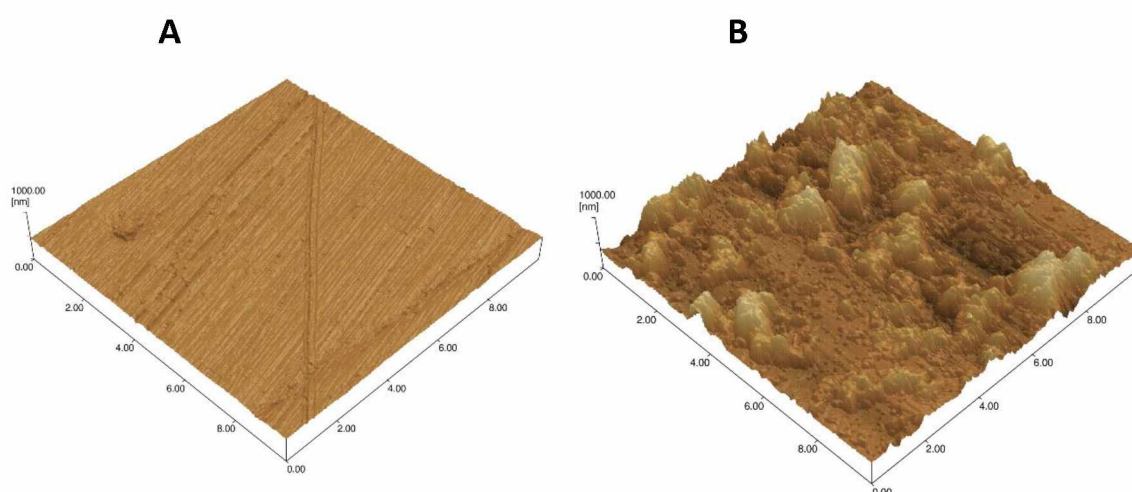
Pode-se observar um decréscimo nos valores de corrente para o Au/poli(3-HFA) (linha azul) comparado ao eletrodo de ouro limpo. Isso ocorre devido aos grupos

funcionais do polímero estarem desprotonados, resultando em repulsão do par redox ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4}$) (FERREIRA, *et al.*, 2014). Esse efeito é mais pronunciado para o Au/OG-r/poli(3-HFA) (linha vermelha) comparado ao Au/OG-r, uma vez que, a quantidade de filme polimérico formado sobre a superfície modificada com o nanomaterial é significativamente maior, devido ao aumento da área superficial. Isso indica uma maior disponibilidade de grupos funcionais, viabilizando um ambiente favorável para imobilização de biomoléculas.

4.2.4 Estudos de Microscopia de Força Atômica

A Figura 35 mostra as imagens de AFM para a superfície de ouro sem modificação e modificada com o nanocompósito polimérico.

Figura 35: Imagens de AFM para (a) superfície de ouro sem modificação e (b) após a modificação com Au/OG-r/poli(3-HFA).



Fonte: Autor, 2016.

Podemos observar que a superfície do ouro sem modificação é pouco rugosa (10,2 nm) e apresenta algumas ranhuras. Depois da modificação com OG-r/poli(3-HFA) houve uma aumento da rugosidade para 114,4 nm, apresentando uma estrutura globular, indicando que houve modificação da superfície com o nanocompósito polimérico.

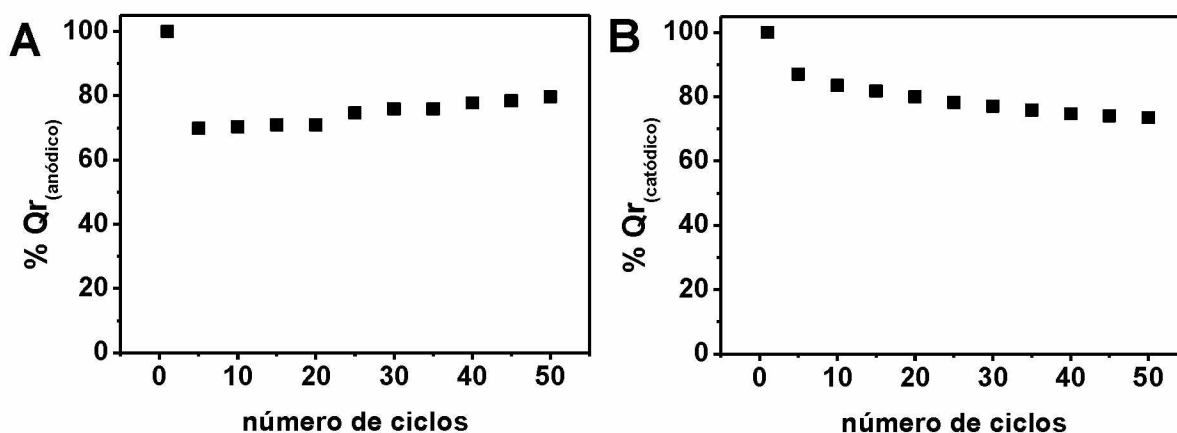
4.2.5 Estudos de estabilidade

A estabilidade do nanocompósito polimérico é fundamental no desenvolvimento dos biossensores. Sendo assim, avaliou-se a estabilidade eletroquímica do Au/OG-r/poli(3-HFA) a partir de 50 ciclos consecutivos de varredura de potencial entre -0,3 e 1,2 V (abrange toda a região redox do polímero) a 100 mV s^{-1} , em solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Os dados foram analisados a partir dos valores de carga obtidos pela integral das regiões anódica e catódica. Os valores indicam as cargas armazenadas referentes aos processos redox do nanocompósito polimérico para cada ciclo. A Figura 36 mostra a porcentagem de carga em função do número de ciclos. Os dados foram obtidos a partir da seguinte equação:

$$Q_r = 100 - \left(\frac{Q_1 - Q_n}{Q_1} \times 100 \right) \quad (3)$$

onde: Q_r é a carga voltamétrica relativa obtida da varredura anódica ou catódica em %, Q_1 é a carga referente à primeira varredura após a eletropolimerização e Q_n é a carga obtida após n ciclos de potencial.

Figura 36: Porcentagem de carga relativa do Au/OG-r/poli(3-HFA) em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, a 100 mV s^{-1} para (a) varredura anódica e (b) varredura catódica.



Fonte: Autor, 2016

Os resultados mostram que há uma queda nos valores de carga nos primeiros ciclos, os subseqüentes ciclos tendem a estabilizar alcançando valores de 79,6 % e 73,5 % para as varreduras anódica e catódica respectivamente.

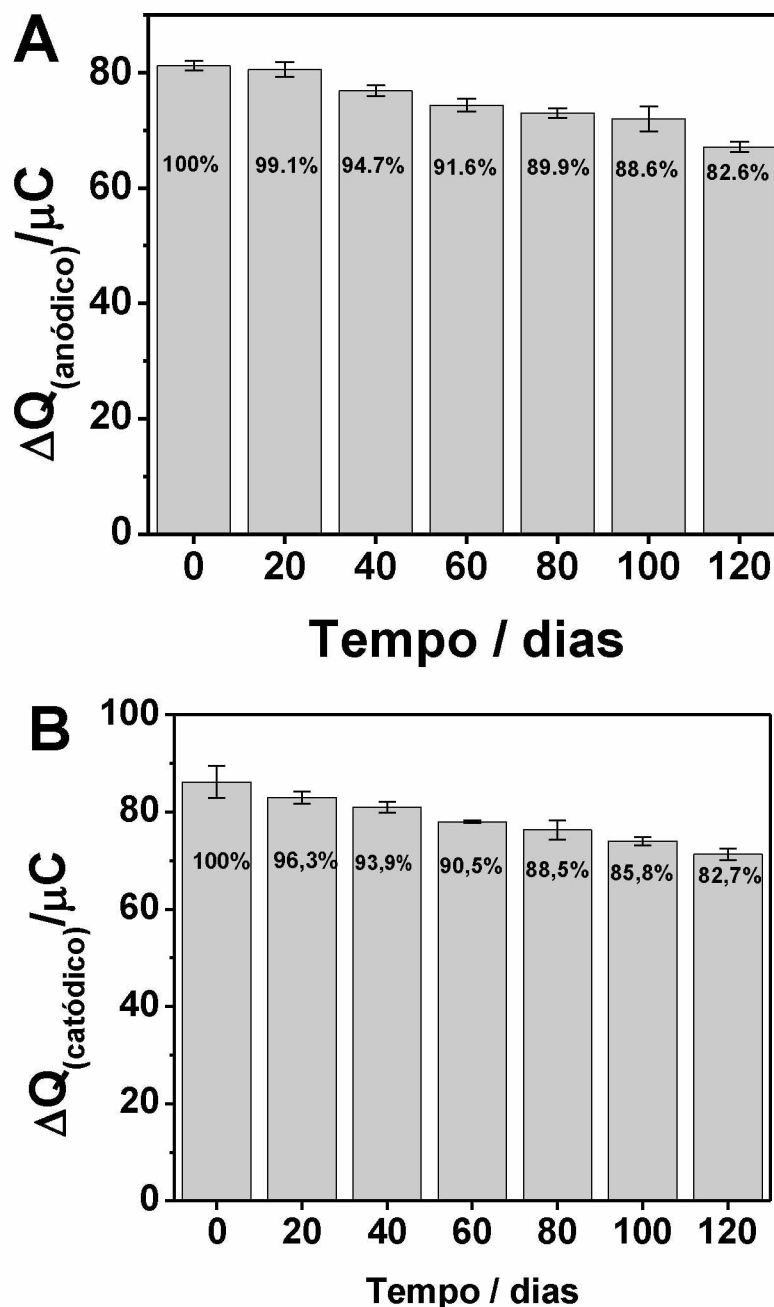
Durante o processo de polimerização ocorre um processo de entrada e saída dos contra íons presentes na solução. Neste caso, os íons incorporados são H^+ e SO_4^{2-} provenientes do H_2SO_4 . Este processo é comumente chamado de dopagem e desdopagem. Durante a oxidação (varredura anódica), o material eletroativo sobre a superfície do Au fica carregado positivamente. Este fenômeno é acompanhado pela desdopagem (saída) dos cátions (H_3O^+) e a dopagem (entrada) dos ânions (SO_4^{2-}) na malha polimérica. Já na redução (varredura catódica), ocorre um retorno dos mesmos contra íons para a malha polimérica, entretanto, não na mesma quantidade em que foi retirada, além de haver a desdopagem dos ânions (SO_4^{2-}). Isso justifica a queda do percentual de carga nos primeiros ciclos.

Além disso, pode ser observado na Figura 36 que o fenômeno explicado anteriormente é mais pronunciado para a varredura anódica comparado à varredura catódica. Isso pode ser explicado devido ao nanocompósito polimérico estar com maior volume (altamente dopado), gerando uma alta taxa de saída do contra íon H_3O^+ , sugerindo que a dopagem do Au/OG-r/poli(3-HFA) favorece o transporte de prótons significativamente, o que deve estar associado à presença dos grupos funcionais do nanocompósito (preferencialmente os grupos carboxílicos).

Observa-se ainda na Figura 36a que depois da queda no percentual nos primeiros ciclos, os valores vão aumentando nos ciclos subseqüentes até começar a se estabilizar em aproximadamente 80 % da atividade inicial. O mesmo não ocorre com a varredura catódica (Figura 36b). A queda do percentual não é tão acentuada, ocorrendo estabilização nos subseqüentes ciclos até atingir o percentual de aproximadamente 74 % da atividade inicial. Essa diferença pode ser explicada devido ao transporte de prótons apresentado acima, ocasionado pela elevada área superficial do Au/OG-r/poli(3-HFA).

A estabilidade do nanocompósito polimérico foi avaliada em função do tempo de armazenamento. O perfil da carga anódica e catódica foi avaliado a cada 20 dias por um período de 120 dias (4 meses). A Figura 37 mostra os histogramas referentes às cargas dos processos redox do polímero, os valores de percentual inseridos foram calculados de acordo com a equação 1, descrita anteriormente.

Figura 37: Gráficos de barra referentes à carga versus tempo de armazenamento do Au/OG-r/poli3-HFA) para (a) varredura anódica e (b) varredura catódica, em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, 100 mV s^{-1} .



Fonte: Autor, 2016.

Os resultados evidenciaram que os percentuais foram de 82,6 % e 82,7% para as varreduras anódica e catódica respectivamente, ao final dos 120 dias. Essa perda pode estar relacionada com algumas variáveis experimentais como: a cada medida houve uma etapa de equilíbrio com a temperatura ambiente ($\cong 30$ minutos),

imersão em meio ácido, varreduras dos potenciais (10 ciclos), lavagem e secagem com N₂, seguido de armazenamento. Após 120 dias, houve uma perda média de 17,35%, indicando que o material manteve propriedades similares às iniciais. Destaca-se ainda, que não houve deslocamento dos potenciais referentes aos processos redox do polímero.

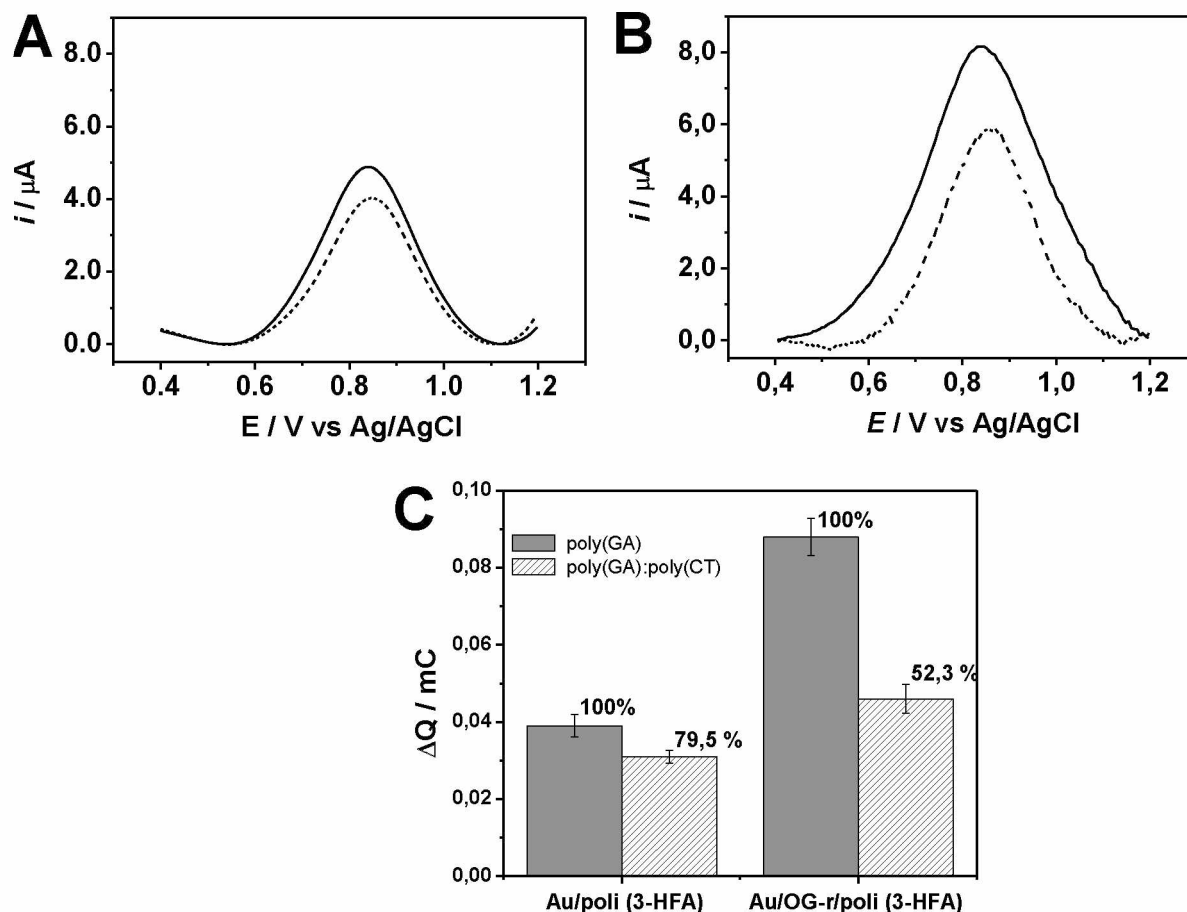
4.3 INVESTIGAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO E DETECÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS

A comunidade científica tem desenvolvido biossensores eletroquímicos de DNA (genossensores) visando o diagnóstico de doenças (RASHEED; SANDHYARANI, 2014; HUANG, H. *et al.*, 2015; MALECKA *et al.*, 2016). Nesse sentido, a etapa de imobilização de sondas de DNA no desenvolvimento de genossensores, é um passo importante para garantir o processo de hibridização. Neste trabalho, foi investigada a sensibilidade da plataforma para esses processos. A imobilização e detecção de oligonucleotídeos foram avaliadas por meio da resposta eletroquímica da guanosina (detecção direta) e do intercalador de DNA brometo de etídio (detecção indireta).

4.3.1 Detecção direta

A Figura 38 mostra a imobilização da sonda (poli (GA), 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e hibridização com o alvo complementar (poli (CT), 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) sobre os eletrodos modificados com poli(3-HFA) e OG-r/poli(3-HFA), entre 0,4 V e 1,2 V.

Figura 38: Voltametria de pulso diferencial do (a) Au/poli(3HFA) e (b) Au/OG-r/poli(3HFA) contendo a sonda poli(GA) (—) antes e (---) após a hibridização com o alvo poli (CT). Em (c) gráfico de barra referente às cargas envolvidas nos processos. Eletrólito: solução tampão fosfato pH=7,4.



Fonte: Autor, 2016

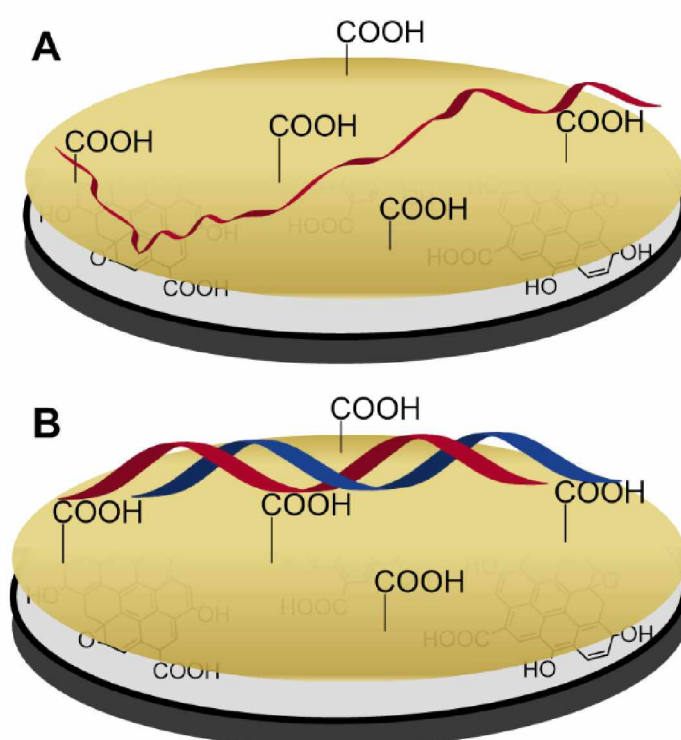
Os resultados evidenciaram que a sonda poli (GA) foi eficientemente imobilizada sobre as superfícies Au/poli(3-HFA)(Figura 37a) e Au/OG-r/poli(3-HFA) (Figura 38 b). Em ambos os eletrodos, o pico de oxidação da guanossina ocorreu em 0,84 V, em solução tampão fosfato pH = 7,4. Pode ser observado ainda que os valores de corrente de pico da guanossina diminuíram depois de 15 minutos de incubação com o alvo complementar. Estes resultados sugerem que houve hibridização dos oligonucleotídeos complementares e a formação do duplex poli(GA):poli(CT) (CHATTERJEE; CHEN, 2012; FERREIRA, D. C. *et al.*, 2014).

A Figura 38c mostra o histograma de carga referente aos eventos de imobilização e hibridização. Os valores indicam que a quantidade de poli(GA) imobilizado sobre o Au/OG-r/poli(3-HFA) foi cerca de 2,3 vezes maior do que no

eletrodo Au/poli(3-HFA). Além disso, os resultados evidenciam que o percentual de hibridização sobre o Au/poli(3-HFA)/poli(GA) foi de $\cong 20,5\%$, enquanto que para o Au/OG-r/poli(3-HFA)/poli(GA) foi de $\cong 47,7\%$. Esses resultados indicam que o eletrodo modificado com OG-r/poli(3-HFA) é mais sensível tanto para a imobilização do oligonucleotídeo poli(GA) bem como para hibridização com poli(CT).

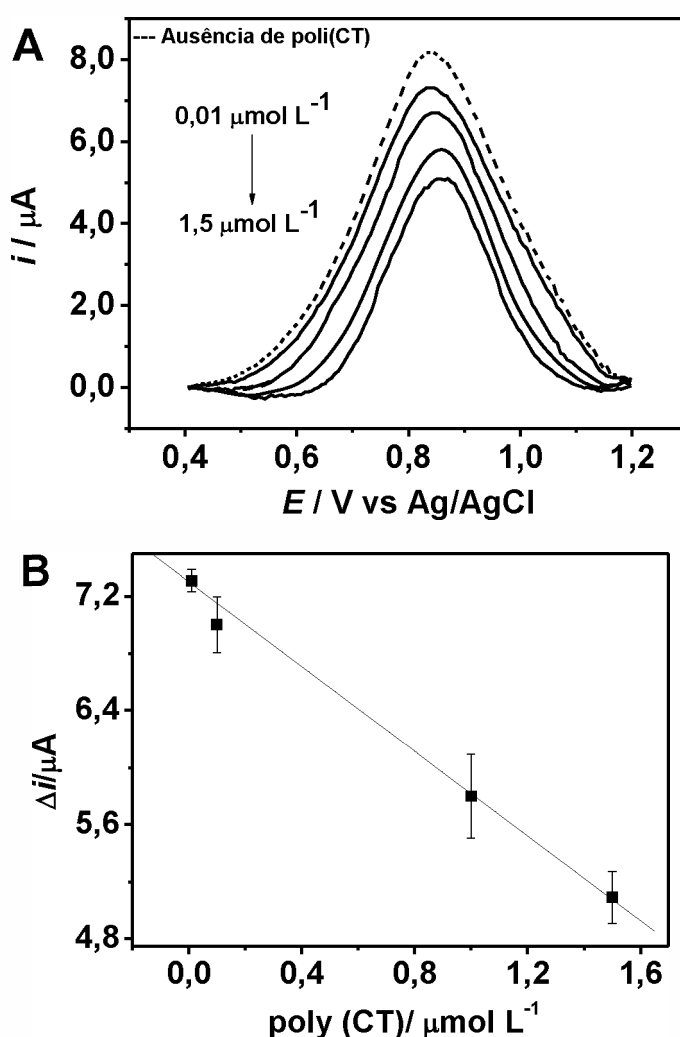
Destaca-se que o evento de hibridização ocorre devido à formação das ligações de hidrogênio da dupla hélice do DNA, por meio da interação entre a sonda e o alvo. Devido a uma maior flexibilidade da fita simples (poli(GA)), as bases nitrogenadas ficam mais próximas da superfície eletroativa Au/OG-r/poli(3-HFA). Neste caso, as mesmas ficam mais susceptíveis à oxidação (Figura 39a). Após a hibridização, pode ser observada uma diferença nos valores de corrente, devido à maior rigidez estrutural apresentada pela dupla fita de DNA. Nesse caso, a menor flexibilidade conformacional da estrutura hibridizada aumenta a distância entre as bases nitrogenadas e a superfície eletroativa, promovendo a redução da corrente de pico (hibridação - Figura 39b) (SILVA, *et al.*, 2008).

Figura 39: Comparação esquemática da imobilização de oligonucleotídeo sobre a superfície do eletrodo (a) ante e (b) após a formação da dupla hélice.



Visando explorar a potencialidade dessa plataforma via detecção direta, a resposta do eletrodo [Au/OG-r/poli(3-HFA)/poli(GA)] foi avaliada para diferentes concentrações do alvo poli(CT), como mostra a Figura 40.

Figura 40: (a) Voltamogramas de pulso diferencial do Au/OG-r/poli(3-HFA) contendo a sonda poli(GA) ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) antes e após a hibridização com diferentes concentrações de poli(CT) ($0,01$, $0,1$, 1 e $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$). (b) Curva de calibração das diferentes concentrações. Eletrólito suporte: solução tampão fosfato pH=7,4.



Fonte: Autor, 2016.

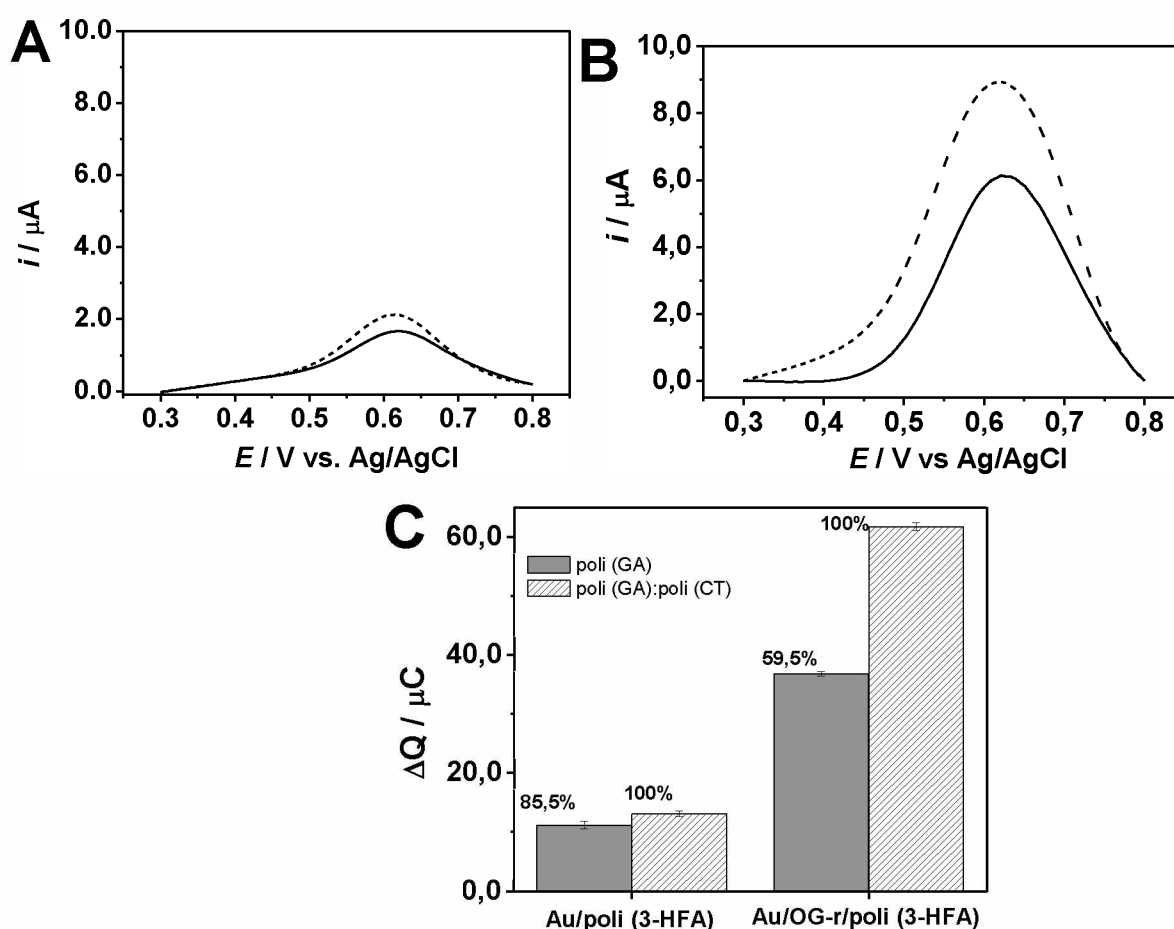
Os resultados mostraram que a plataforma foi capaz de detectar uma concentração do alvo de $1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 40a). Além disso, os dados da regressão linear de corrente (μA) versus as diferentes concentrações revelaram um perfil linear com coeficiente de correlação de 0,997 (Figura 40 b). Esses resultados

mostram que a plataforma é promissora para o desenvolvimento de genossensores utilizando a detecção direta.

4.3.2 Detecção indireta

A Figura 41 mostra os voltamogramas de pulso diferencial referentes à adsorção e oxidação do BE sobre os eletrodos sensibilizados com poli(GA) antes e após a hibridização com poli(CT).

Figura 41: Voltamogramas de pulso diferencial do brometo de etídio sobre (a) Au/poli(3-HFA) e (b) Au/OG-r/poli(3-HFA), contendo a sonda poli(GA) (—) antes e (---) após a hibridização como alvo complementar poli(CT). Em (c) gráfico de barra referente às cargas envolvidas nos processos. Eletrólito suporte: solução tampão fosfato pH=7,4.



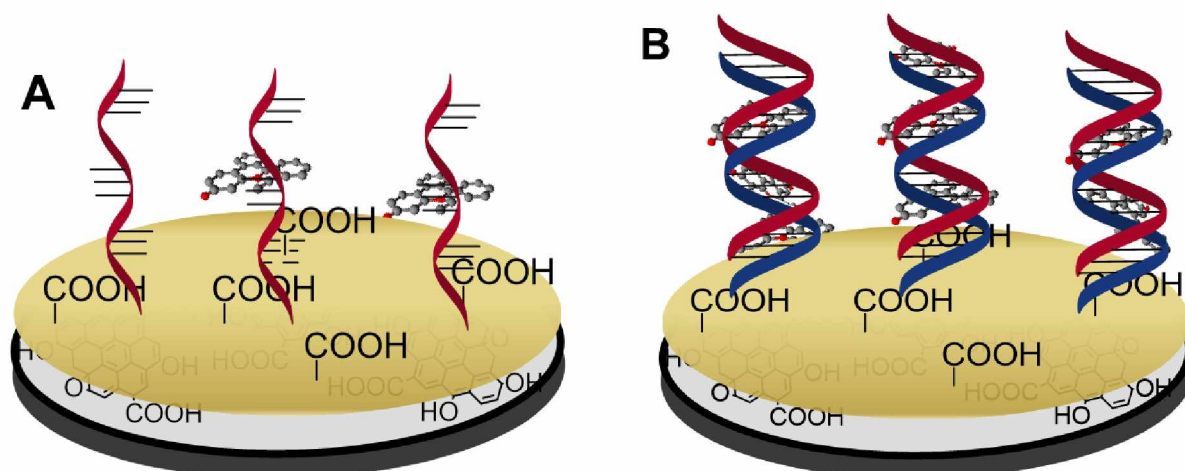
Fonte: Autor, 2016

Os voltamogramas de pulso diferencial mostraram que o pico de oxidação do BE sobre o Au/poli(3-HFA) foi em 0,61 V e 0,63 V sobre o Au/OG-r/poli(3-HFA). Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores. Castro *et al.* (2014) avaliaram a hibridização da sonda poli(GA) como alvo poli(CT) sobre um eletrodo de grafite modificado com poli(4-minofenol) utilizando o BE como intercalador e este, apresentou pico de oxidação em 0,65 V. Ferreira *et al.*, (2014) demonstraram que o BE apresenta um pico de oxidação em 0,57 V para o evento de hibridização poli(GA):poli(CT) sobre um eletrodo de grafite modificado com poli(ácido 4-hidroxibenzóico). Rodrigues, *et al.*, (2015) desenvolveram um biossensor eletroquímico para *Neisseria meningitidis* a partir da imobilização de uma sonda de DNA sobre um eletrodo de grafite modificado com poli(ácido 3-hidroxifenilacético). A detecção do biossensor foi realizada a partir do intercalador BE que neste caso apresentou um pico de oxidação em 0,7 V.

Como pode ser observado, ocorreu um aumento nos valores de corrente após o processo de formação do duplex poli(GA):poli(CT). Isto ocorre devido ao aumento da quantidade do BE intercalado na cadeia do oligonucleotídeo hibridizado, resultando num aumento de sinal de corrente deste indicador de hibridização (Figura 42).

Os valores de percentual da quantidade de material hibridizado evidenciaram que houve um aumento de 14,5 % sobre o Au/poli(3-HFA)/poli(GA) e 40,5 % sobre Au/OG-r/poli(3-HFA)/poli(GA). Isso revela a maior sensibilidade do nanocompósito polimérico comparado ao eletrodo modificado apenas com o filme para a detecção indireta.

Figura 42: Imagens representativas do brometo de etídio intercalado em (a) fita simples do DNA (b) após a formação da dupla hélice de DNA.



Fonte: Autor, 2016

Esses resultados indicam que o Au/OG-r/poli(3-HFA) é mais sensível para a imobilização de oligonucleotídeos quando comparado ao Au/poli(3-HFA), devido ao efeito sinérgico entre o OG-r e o polímero. É importante destacar que a retenção da biomolécula pode estar relacionada com a estrutura tridimensional do polímero, a qual propicia interações intermoleculares. Além disso, a presença de carboxilas (ou carboxilatos) livres na estrutura do filme favorece ligações de hidrogênio ou interações eletrostáticas com as bases do oligonucleotídeo. O aumento de área superficial que o OG-r promove no processo de formação do filme, favorecendo interações mais efetivas no momento da imobilização, o que reduz a lixiviação dessas biomoléculas na etapa de lavagem.

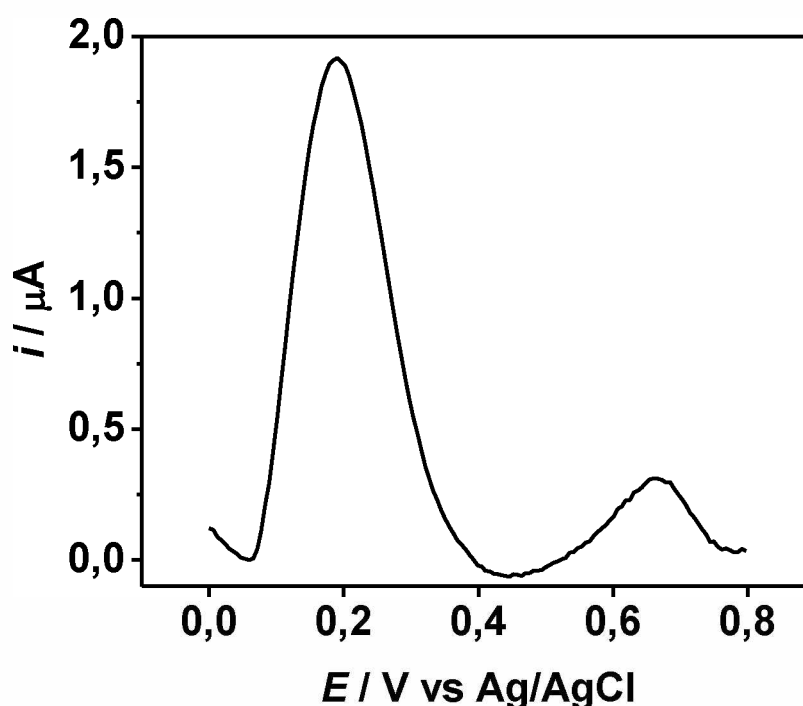
4.4 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM BIOSSENSOR PARA DIAGNÓSTICO DA DENGUE

4.4.1 Imobilização do Peptídeo Mimético (DV)

Entre os 20 aminoácidos naturais comumente encontrados em peptídeos e proteínas, cinco apresentam eletroatividade em eletrodos sólidos: tirosina, histidina, triptofano, metionina e a cisteína (REYNAUD; MALFOY, 1980; ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2013). Dentre esses, o último está presente na sequência do peptídeo

mimético ao vírus da dengue (PMDV). Nesse sentido, inicialmente investigou-se o comportamento do PMDV1 sobre a plataforma desenvolvida. A Figura 43 mostra o voltamograma de pulso diferencial do PMDV1 imobilizado sobre o Au/OG-r/poli(3-HFA), numa faixa de potencial entre 0 e 0,8 V.

Figura 43: Voltamograma de pulso diferencial do Au/OG-r/poli(3-HFA) após a imobilização do Peptídeo mimético DV (1 $\mu\text{g/mL}$). Eletrólito suporte: solução tampão fosfato pH=7,4.

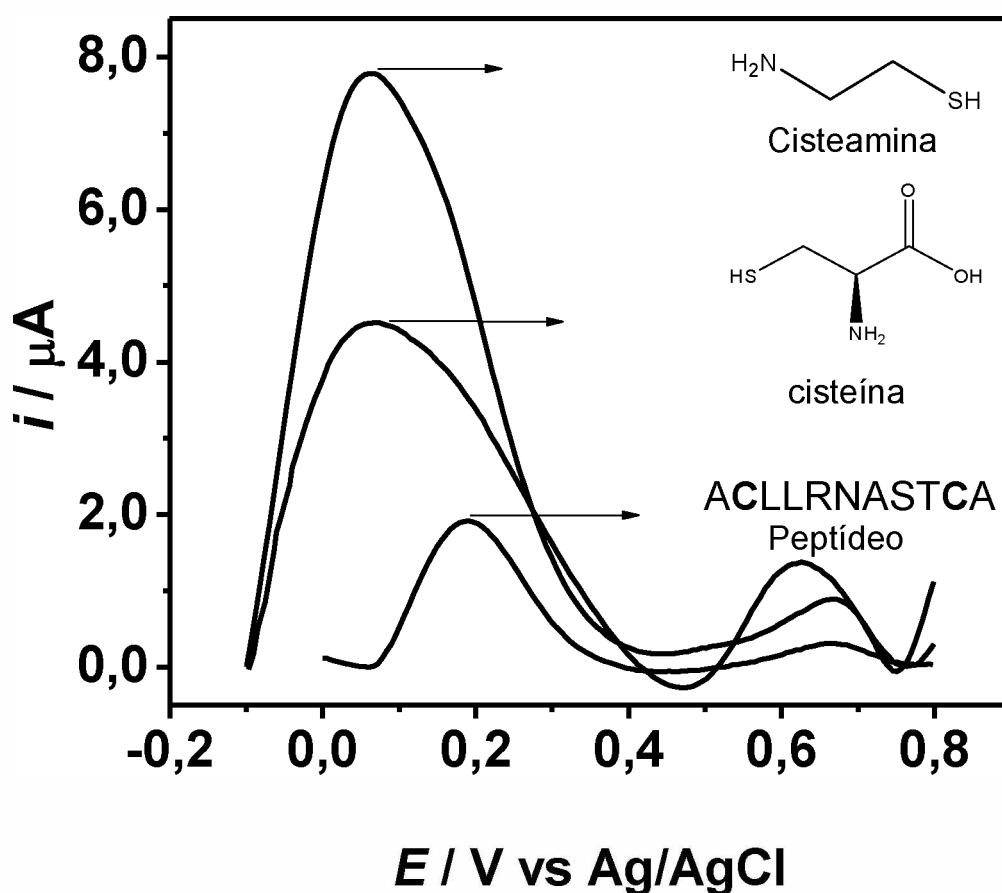


Fonte: Autor, 2016

Como pode ser observado, o peptídeo mimético DV apresenta dois picos de oxidação bem definidos em 0,19 V e 0,66 V, evidenciando a eletroatividade do material sintético. Este peptídeo apresenta dois resíduos do aminoácido cisteína em sua estrutura (Ala-**Cys**-Leu-Leu-Arg-Asn-Ala-Ser-Thr-**Cys**-Ala). Estudos anteriores mostraram que este aminoácido sofre oxidação eletroquímica em eletrodos sólidos, devido à presença do grupo tiol (-SH) em sua estrutura (SPATARU *et al.*, 2001; FEI *et al.*, 2005). Por isso, sugere-se que os picos de oxidação observados sejam provenientes do grupo tiol (-SH).

A fim de confirmar os picos de oxidação observados para o peptídeo, estudou-se o perfil eletroquímico da cisteamina ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e do aminoácido cisteína livre ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), em solução tampão fosfato pH = 7, como mostra a Figura 44.

Figura 44: Voltamograma de pulso diferencial do Au/OG-r/poli(3-HFA) após a imobilização do Peptídeo mimético DV ($1 \mu\text{g/mL}$), cisteamina ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e aminoácido cisteína ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrólito suporte: solução tampão fosfato pH=7,4.

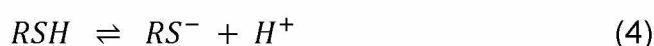


Fonte: Autor, 2016

Como pode ser observado, foram evidenciados dois picos de oxidação em 0,060 V e 0,66 V referentes à cisteamina e dois picos em 0,066 V e 0,62 V do aminoácido cisteína. Estes resultados revelam que os perfis dos voltamogramas de pulso tanto a cisteamina quanto do aminoácido cisteína são semelhantes ao do peptídeo. Não houve diferença significativa entre os potenciais do segundo pico de oxidação. Entretanto, para o primeiro pico de oxidação, o peptídeo mimético DV

apresentou um deslocamento para potenciais positivos, sendo observada uma diferença de aproximadamente 0,13 V. Este fenômeno é explicável, uma vez que, tanto a cisteamina quanto o aminoácido cisteína estão ligadas diretamente na superfície do Au/OG-r/poli(3-HBA), facilitando a oxidação do –SH. Já no peptídeo mimético DV o aminoácido se encontra dentro da sua cadeia, dificultando assim, o processo de oxidação. Contudo, o Au/OG-r/poli(3-HFA) promove um ambiente favorável para a eletrooxidação do peptídeo mimético DV.

Nesse sentido, de acordo com os resultados experimentais e estudos anteriores, a oxidação do grupo –SH das diferentes estruturas sobre Au/OG-r/poli(3-HBA) pode ser descrita de acordo com o seguinte mecanismo (RALPH *et al.*, 1994):

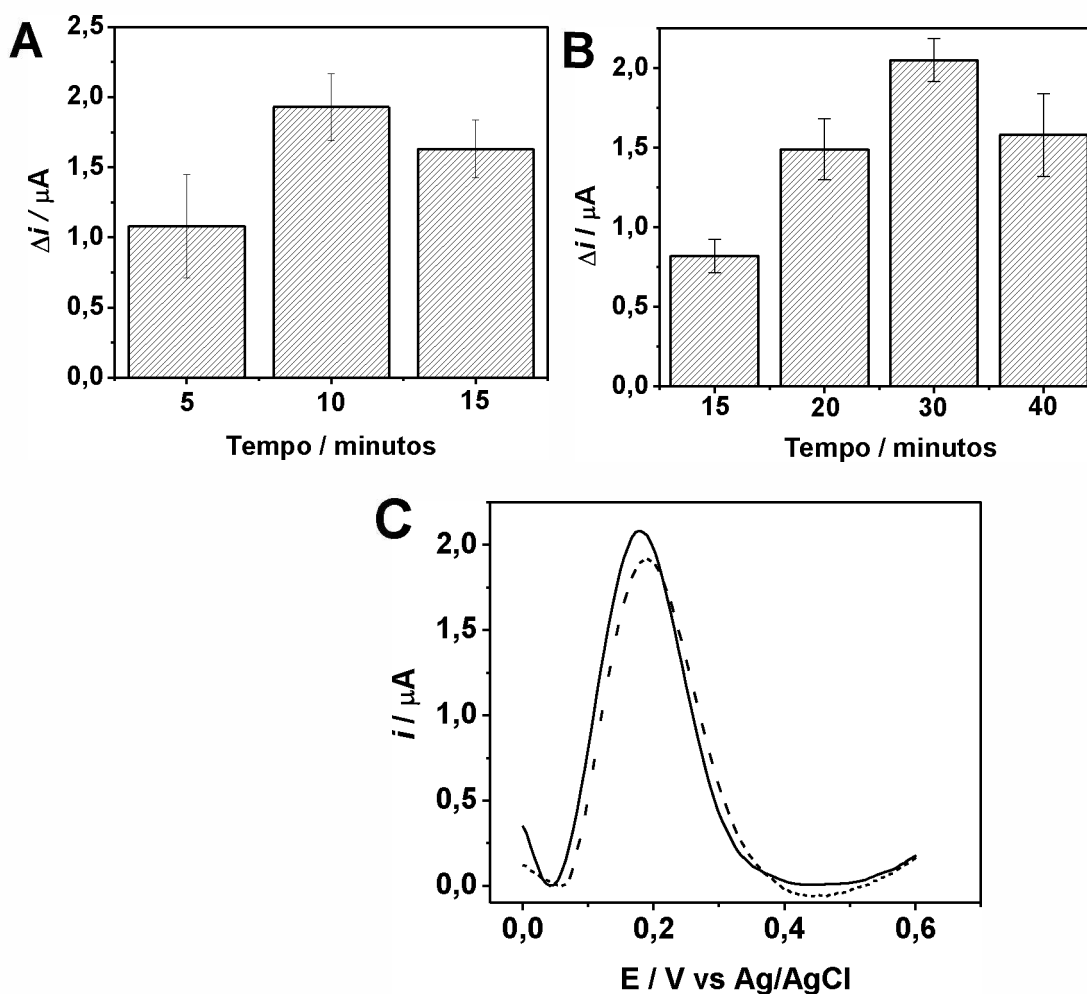


Em adição, estudos anteriores (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2011) sugerem que o mecanismo de oxidação para o primeiro pico ocorre com a transferência de 1 e^- . Já o segundo pico envolve a transferência de 2 e^- . O primeiro pico foi escolhido para os estudos de desenvolvimento do biossensor, uma vez que o mesmo é mais intenso e a possibilidade de interferentes neste potencial é baixa.

4.4.2 Investigação da imobilização do peptídeo mimético (DV) e interação do mesmo com amostra real

A Figura 45 mostra os gráficos referentes às avaliações dos seguintes parâmetros: tempo de ativação das carboxilas com EDC/NHS; tempo de imobilização do PMDV1 e a resposta com etanolamina (EA).

Figura 45: Au/OG-r/poli(3-HFA) após a imobilização do PMDV para: (a) resposta de corrente do tempo de ativação das carboxilas com EDC/NHS; (b) resposta de corrente do tempo de imobilização do PMDV (1 $\mu\text{g/mL}$); (c) voltamogramas de pulso diferencial (—) antes e (---) após a lavagem com etanolamina. Eletrólito suporte: solução tampão fosfato pH=7,4.



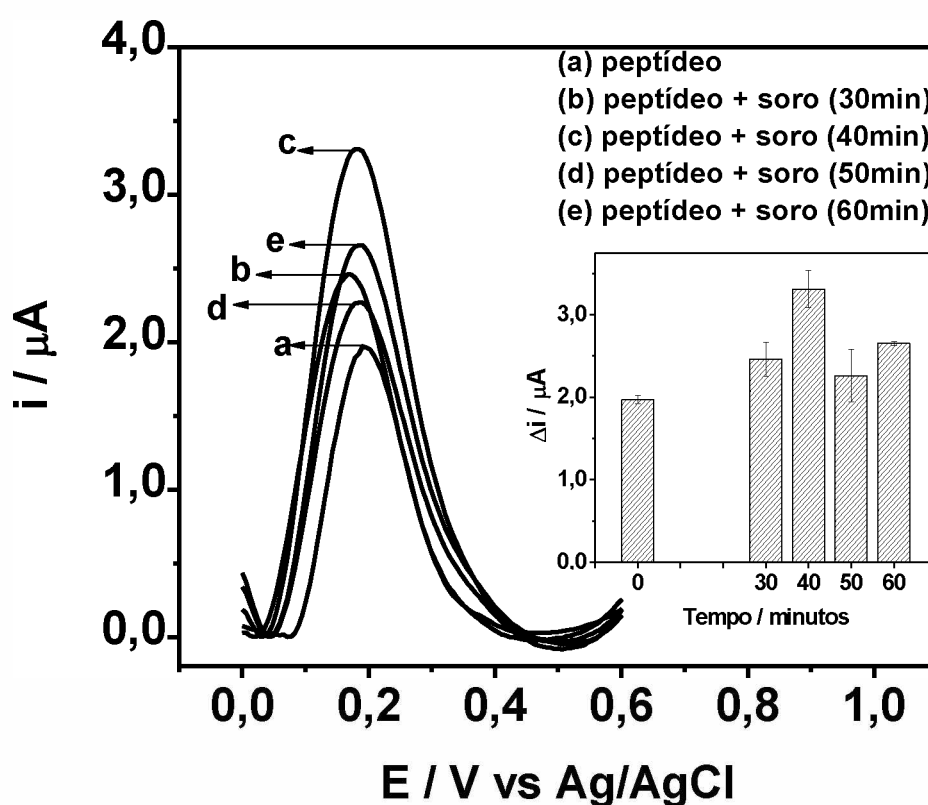
Fonte: Autor, 2016.

Os resultados revelaram que foram necessários 10 minutos de reação com EDC/NHS (Figura 45 a) para ativação de grupos carboxílicos na superfície eletródica. Essa reação objetivou a formação de ésteres altamente reativos, os quais são suscetíveis a ataques nucleofílicos de grupamentos amino terminais presentes no peptídeo. Depois da ativação das carboxilas, o tempo necessário para a interação com os peptídeos miméticos (DV) foi de 30 minutos (Figura 45 b). Em seguida o eletrodo foi lavado com etanolamina. Este reagente remove ligações inespecíficas

ocasionadas no processo de ativação com EDC/NHS, neste caso foi observado uma diminuição na resposta do sinal de corrente, como mostrado na Figura 45 c.

Por fim, foi investigado o tempo necessário de interação entre o biossensor totalmente montado (Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV) e o anticorpo IgM, presentes na amostra de soro positivo de um paciente infectado com o vírus da dengue (Figura 46). Este parâmetro é importante e deve ser determinado, pois tempos insuficientes não permitem a condição adequada de interação e tempos extensos podem promover adsorções indesejadas.

Figura 46: Voltamograma de pulso diferencial do Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV após a interação com anticorpos de soro positivo (diluição 1:100) em diferentes tempos (30, 40, 50 e 60 minutos). Inserido, resposta de corrente dos processos. Eletrólito suporte: solução tampão fosfato pH=7,4.



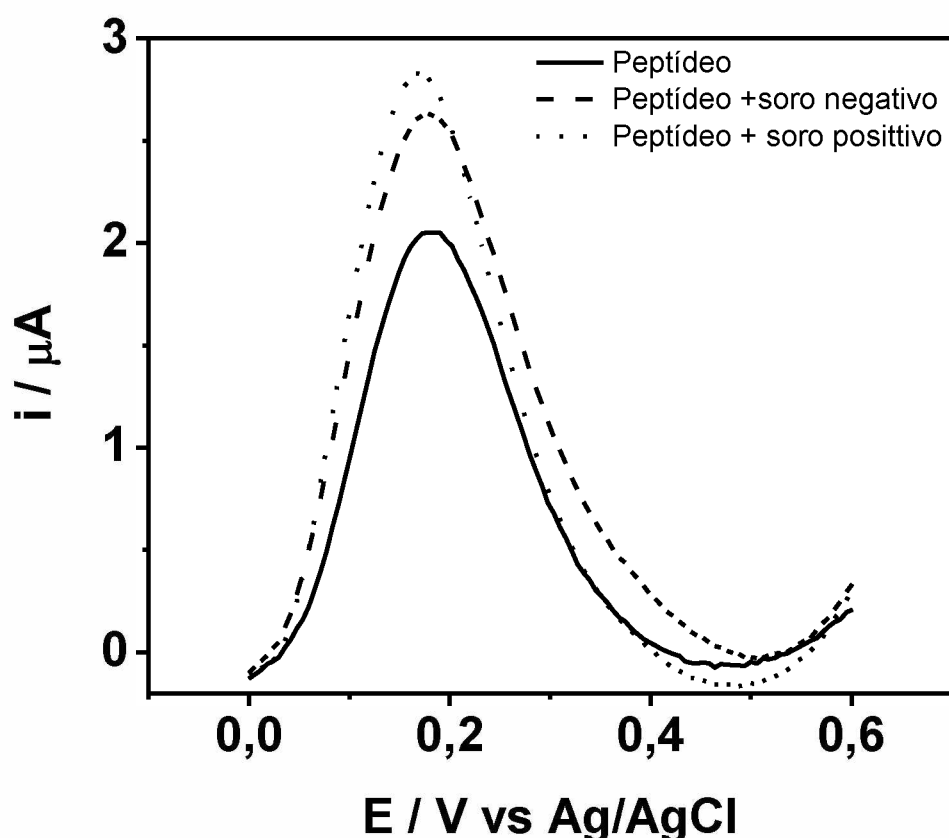
Fonte: Autor, 2016

Pode-se observar que 40 minutos foi a melhor condição para interação entre o PMDV e o soro de paciente infectado com o vírus da dengue, a 25°C. Sendo assim, todos os tempos de interação com amostra real foram de 40 minutos. É

importante ressaltar que em todas as medidas, após a imobilização do PMDV e lavagem com etanolamina, o sistema foi incubado com glicina (50 mmol L^{-1}) por uma hora, para bloqueio de ligações inespecíficas.

Como prova de conceito, avaliou-se a imobilização do PMDV sobre o Au/OG-r/poli(3-HFA) sem a etapa de ativação das carboxilas com EDC/NHS. Verificou-se também a sua interação com amostras de soro infectado com o vírus da dengue e de pacientes saudáveis, como mostra a Figura 47.

Figura 47: Voltamograma de pulso diferencial do Au/OG-r/poli(3-HFA) após a imobilização do peptídeo mimético (DV) ($1 \mu\text{g/mL}$) sem ativação das carboxilas com EDC/NHS e, após a interação do peptídeo mimético (DV) com amostras de soro positivo e negativo (diluição 1:100, tempo 40 minutos). Eletrólito suporte: solução tampão fosfato pH=7,4.



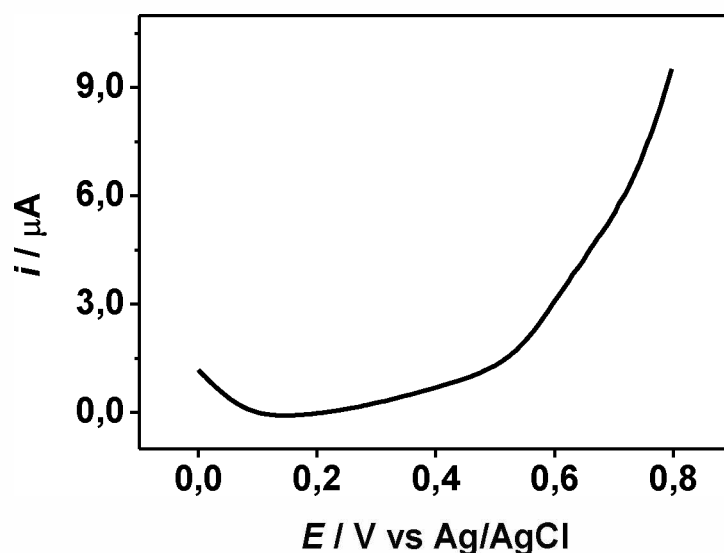
Fonte: Autor, 2016.

Observou-se que o PMDV apresentou um pico de oxidação bem definido em 0,19 V, com valores de corrente próximos ao do sistema com ativação das

carboxilas. Verificou-se que houve diferenciação entre os valores de corrente do PMDV e a amostra de soro positivo. Porém, não houve diferenciação significativa entre os valores de corrente das amostras de soro positivo e negativo. Esse resultado justifica a escolha do sistema a partir da ativação das carboxilas do nanocompósito polimérico para o desenvolvimento do biossensor.

Foi verificada ainda a imobilização do PMDV sobre a superfície modificada apenas com OG-r, como mostra a Figura 48.

Figura 48: Voltamograma de pulso diferencial do eletrodo de ouro modificado com OG-r após imobilização do Peptídeo mimético (DV) ($1 \mu\text{g/mL}$, 30 minutos). Eletrólito suporte: solução tampão fosfato pH= 7,4.



Fonte: Autor, 2016.

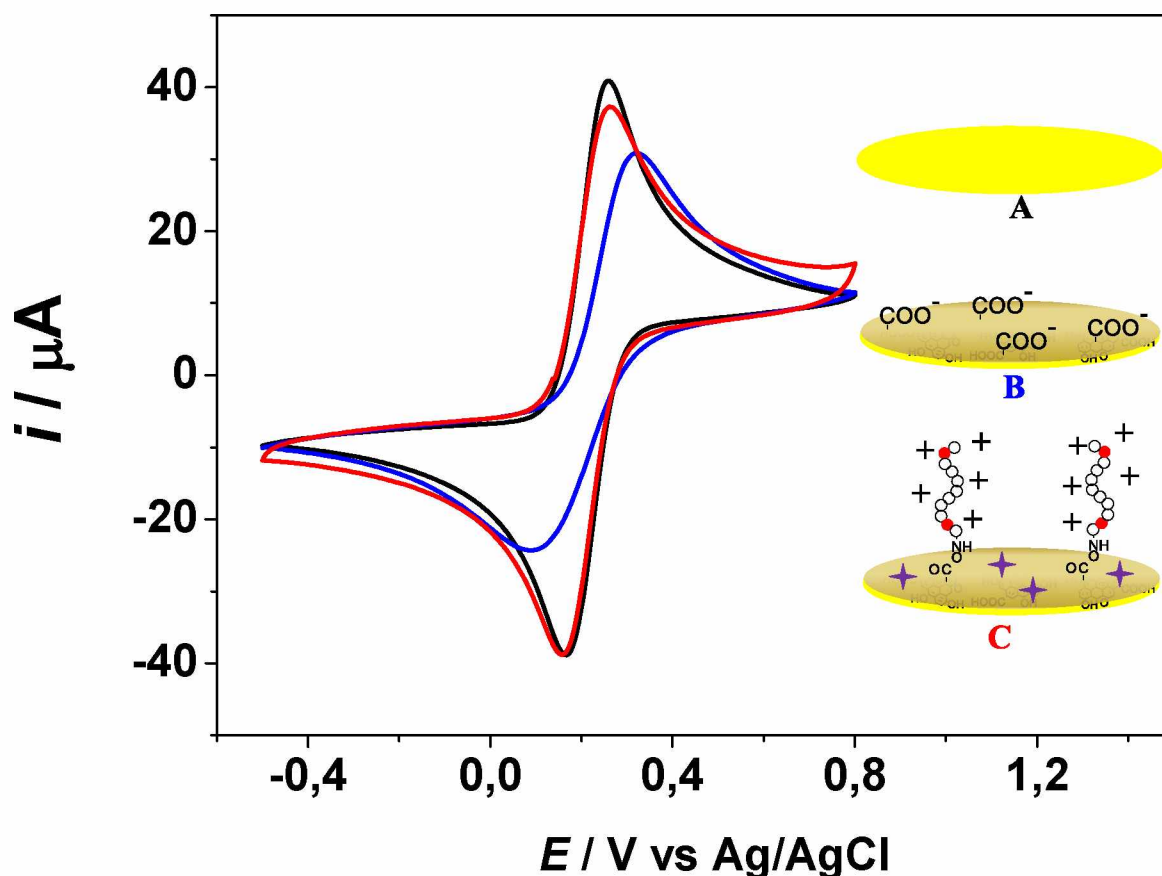
Pode-se observar que não houve sinal eletroquímico, indicando que não foi possível realizar a detecção do PMDV por meio do monitoramento do aminoácido cisteína por voltametria de pulso diferencial em solução tampão fosfato. Esses resultados mostram a importância da modificação do Au/OG-r com poli(3-HFA) para a imobilização do peptídeo mimético (DV).

4.4.3 Caracterizações de biofuncionalização com o peptídeo mimético (DV)

4.4.3.1 Voltametria Cíclica

A Figura 49 mostra os voltamogramas cíclicos registrados após cada etapa de modificação com OG-r/poli(3-HFA) e após a imobilização do PMDV (Au/ OG-r/poli(3-HFA)/PMDV), na presença da sonda redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ em KCl 0,1 mol L⁻¹.

Figura 49: Voltamogramas cíclicos referentes ao 1º ciclo de varredura obtido para: Au (—), Au/ OG-r/poli(3-HFA) (—) e Au/ OG-r/poli(3-HFA)/PMDV (—). Eletrólito suporte: solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mmol L⁻¹ contendo KCl 0,1 mol L⁻¹, pH=6,5. V=50 mV s⁻¹.



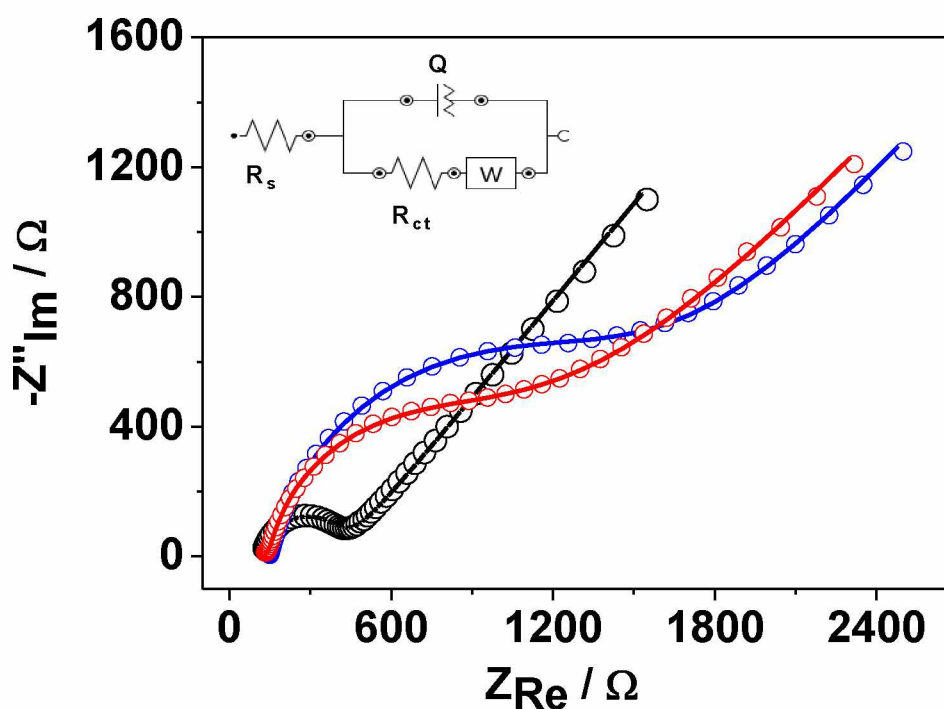
Fonte: Autor, 2016.

Conforme descrito anteriormente na seção 4.2.3, após a modificação do eletrodo de ouro OG-r/poli(3-HFA) ocorre um decréscimo nos valores de corrente do par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$. Depois da etapa de biofuncionalização (imobilização do peptídeo mimético (DV), seguido de bloqueio com glicina), observou-se que os valores dos picos de corrente anódica e catódica aumentaram. Isso pode ser explicado, devido o PMDV ter um ponto isoelétrico (pI) igual a 8,23, resultando numa carga líquida positiva, a qual propicia uma atração eletrônica do par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$. A Figura 48, mostra exemplos representativos dos eletrodos modificados em contrato com o par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$.

4.4.3.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)

A fim de compreender melhor a etapa de modificação do eletrodo de ouro e subsequente biofuncionalização com o PMDV, foram realizados estudos com EIE, uma vez que essa técnica é comumente empregada em estudos de sensoriamento eletroquímico. A Figura 50 mostra os diagramas de Nyquist das etapas de modificação e o circuito equivalente empregado para realizar as simulações. Os parâmetros obtidos a partir da simulação seguem compilados na Tabela 8.

Figura 50: Diagramas de Nyquist para Au, Au (●), Au/ OG-r/poli(3-HFA) (●) e Au/ OG-r/poli(3-HFA)/PMDV (●) obtidos a potencial de circuito aberto, frequência de 100 KHz a 10^{-1} KHz. Inseto: circuito equivalente. Eletrólito suporte: solução de KCl 0,1 molmol L⁻¹, pH 6,5 contendo ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mmol L⁻¹.



Fonte: Autor, 2016

Tabela 8: Parâmetros obtidos por simulação aos dados de EIE para Au, Au/ OG-r/poli(3-HFA) e Au/ OG-r/poli(3-HFA)/PMDV.

	R_s / Ω	R_{ct} / Ω	$\chi^2/10^{-3}$
Au	119	300	9
Au/OG-r/poli(3-HFA)	150	$1,36 \times 10^3$	3
Au/OG-r/poli(3-HFA)/PM	137	$1,19 \times 10^3$	6

Fonte: Autor, 2016

Os dados obtidos a partir da simulação apresentaram valores de χ^2 na ordem de 10^{-3} , sugerindo que o circuito foi apropriado para apoiar e caracterizar os resultados experimentais.

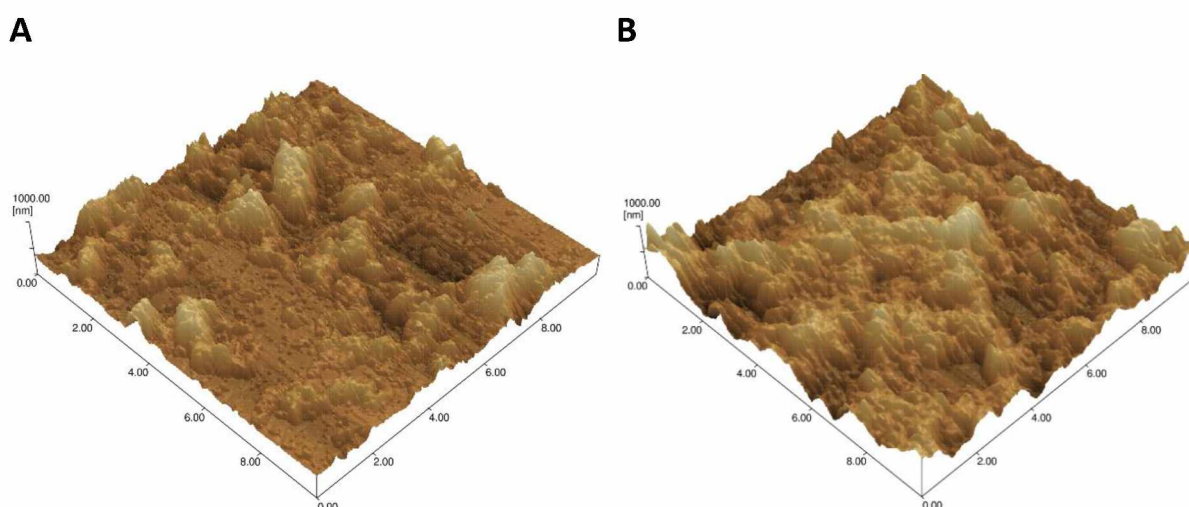
Verificou-se na Tabela 8 que os valores de R_s (resistência ao transporte de íons no eletrólito em direção à interface eletrodo/solução) não diferem muito, devido ao fato de ser utilizado o mesmo eletrólito em todos os experimentos de impedância.

O termo R_{ct} indica a facilidade cinética com que o processo de transferência eletrônica ocorre na superfície do eletrodo. Ao analisar os diagramas de Nyquist da Figura 49, observou-se que depois da modificação do eletrodo de ouro com OG-r/poli(3-HFA) o valor do R_{ct} aumenta de $300 \, \Omega$ (Au) para $1,36 \, k\Omega$. Após a etapa de biofuncionalização com o PMDV, esse valor de resistência diminui para $1,19 \, k\Omega$. Sendo assim, esses resultados corroboram com as medidas da voltametria cíclica.

4.4.3.3 Estudos por AFM

A etapa de biofuncionalização como peptídeo mimético (DV) também foi acompanhada por medidas de AFM, como mostra a Figura 51.

Figura 51: Imagens de AFM para Au/OG-r/poli(3-HFA) (a) antes e (b) após a imobilização do Peptídeo mimético (DV).



Fonte: Autor, 2016.

Conforme discutido anteriormente na seção 4.2.4 o Au/OG-r/poli(3-HFA) apresentou uma rugosidade de 114,4 nm. Após a etapa de biofuncionalização, foi observado um aumento da rugosidade para 142,4 nm, evidenciando a modificação com uma camada adicional (SANTOS, *et al.*, 2012). Os resultados da VC, EIE e AFM mostraram que o peptídeo mimético (DV) foi imobilizado eficientemente sobre o Au/OG-r/poli(3-HFA), através da ligação covalente.

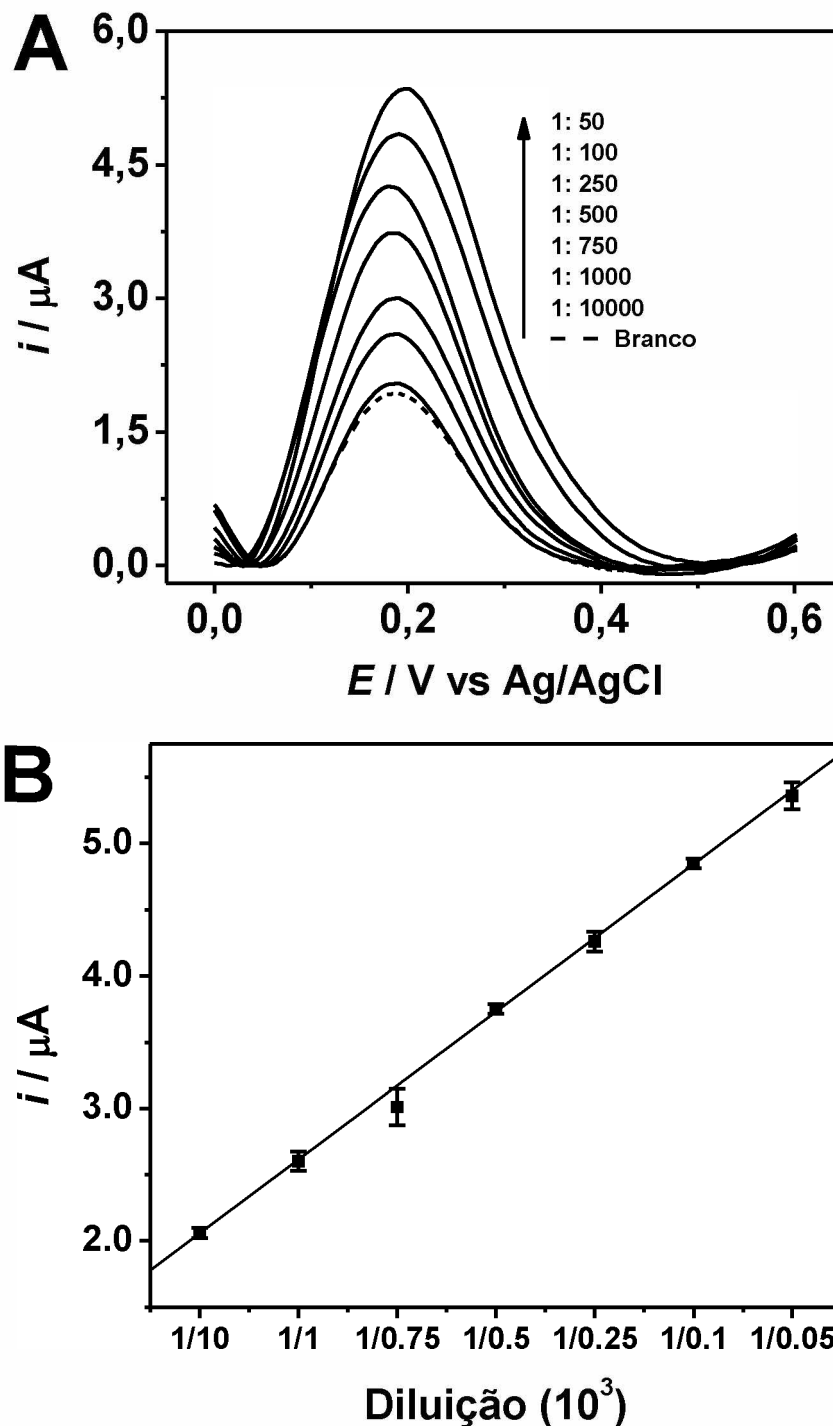
4.4.4 Estudo da sensibilidade e seletividade do biossensor

4.4.4.1 Curva de calibração

A detecção usando amostras clínicas complexas como soro é importante no desenvolvimento do biossensor, pois demonstra a sua aplicação prática. A curva de calibração foi construída a partir de um *pool* de 10 amostras de pacientes infectados com o vírus da dengue. Ressalta-se que o peptídeo mimético (DV) foi selecionado para diagnosticar o vírus da dengue sorotipo 3.

A Figura 52a, mostra os voltamogramas de pulso diferencial para diferentes diluições do *pool* em solução tampão fosfato, pH 7,4.

Figura 52: (a) Voltamogramas de pulso diferencial do Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV como diferentes diluições de um *pool* de amostras de soro positivo. (b) Curva de calibração das diferentes diluições. Eletrólito suporte: solução tampão fosfato pH=7,4.



Fonte: Autor, 2016.

Os voltamogramas de pulso diferencial demonstraram que houve interação entre o PMDV e o anticorpo IgM nas seguintes diluições: 1:50, 1:100, 1:250, 1:500,

1:750, 1:1000 e 1:10000. Esse resultado mostra a alta sensibilidade do biossensor, uma vez que houve diferenciação para altas diluições (1:1000 e 1:10000). Em adição, conforme visto na Figura 2 (seção 1.2) baixos níveis do anticorpo IgM são detectáveis na primeira semana de infecção (infecção primária), sendo assim, o biossensor se mostra adequado para o diagnóstico precoce do vírus da dengue. Este fator é importante, pois nessa fase da infecção os sintomas são inespecíficos. Por isso, um diagnóstico precoce direciona o tratamento do paciente. Ressalta-se que a sensibilidade deste biossensor é maior do que outros trabalhos utilizando outras metodologias (LUNA, D. M. *et al.*, 2014; PARKASH; YEAN; SHUEB, 2014; SILVA, M. M. *et al.*, 2014; SILVA, M. M. S. *et al.*, 2015).

Foi observado que, após a interação entre o peptídeo mimético (DV) e a amostra de soro, ocorre aumento dos valores de corrente. Isso pode ser explicado devido à interação com os anticorpos IgM presentes na amostra de soro. Conforme discutido anteriormente na seção 4.4.1, alguns aminoácidos encontrados nas proteínas são passíveis de oxidação em eletrodos sólidos. Neste caso, não podemos especificar quais aminoácidos seriam encontrados nessa molécula biológica. Todavia, como ocorre o aumento do valor de corrente, sugerimos a presença do aminoácido cisteína.

Os dados da regressão linear de corrente (μA) versus as diferentes diluições do soro evidenciou um perfil linear com coeficiente de correlação de 0,999 ($n = 3$), Figura 52 b.

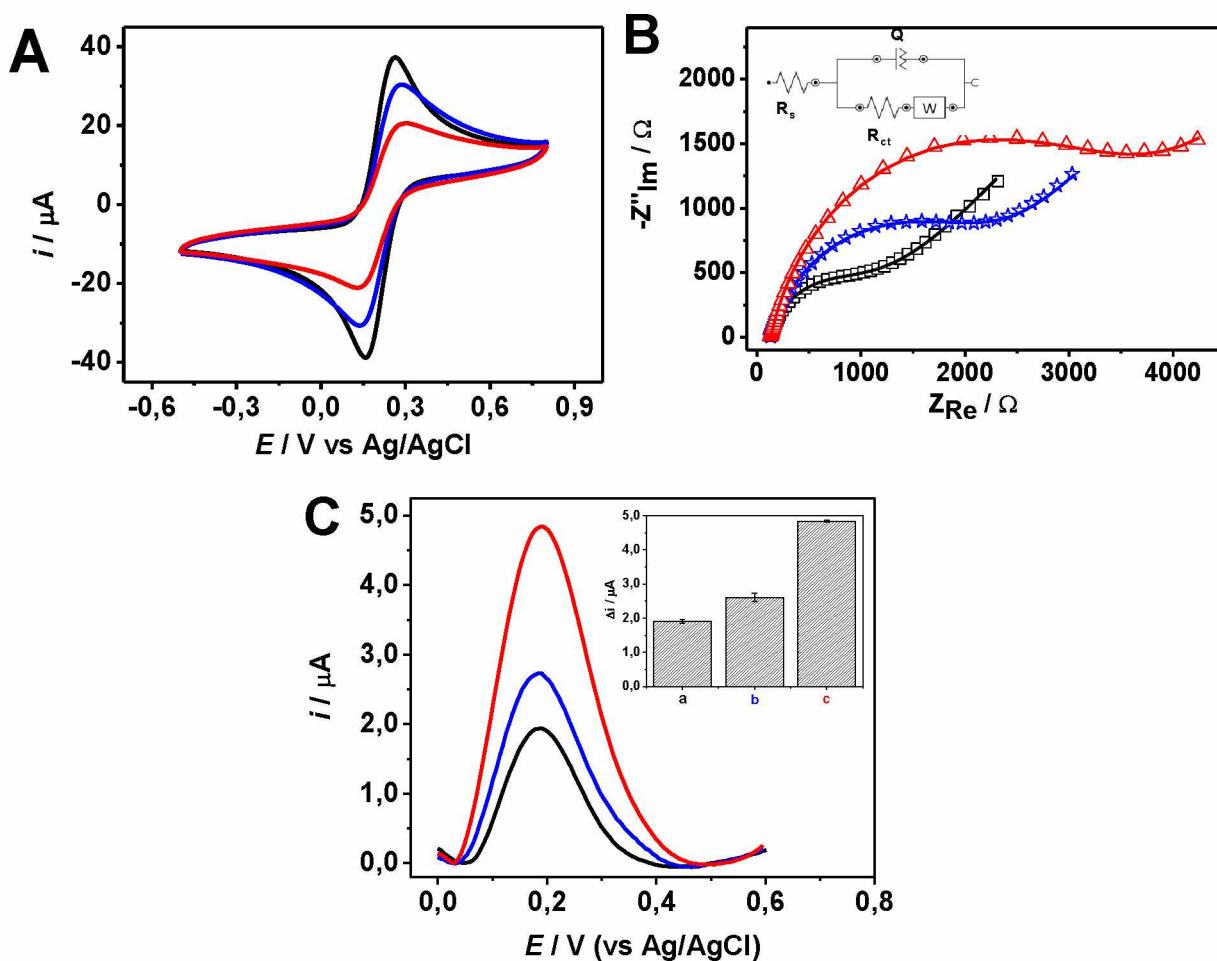
A dosagem dos anticorpos IgM presentes na amostra de soro (*pool*) de pacientes infectados com o vírus da dengue foi de $1,38 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Sendo assim a diluição do *pool* de 1:10000 corresponde a um valor de $0,138 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Os diagnósticos para o vírus da dengue existentes na Medicina Diagnóstica (IPAC) em Uberlândia são qualitativos e não quantitativos. Por isso, não houve um valor de referência para averiguar a sensibilidade do biossensor proposto neste trabalho. O biossensor conseguiu detectar um valor de $0,138 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, o qual está bem abaixo da faixa de referência ($0,4$ a $2,2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) do laboratório de análise do IPAC, em concordância com o objetivo principal deste trabalho, que foi verificar a eficiência e a sensibilidade do sistema para diagnóstico do vírus da dengue.

4.4.4.2 Estudo de seletividade

Uma das vantagens do uso de moléculas biológicas como elemento de reconhecimento biológico em biossensores é a sua seletividade. Nesse sentido, a especificidade do PMDV é um parâmetro importante para análises *in situ* utilizando amostra biológicas.

A especificidade do PMDV foi avaliada com amostra de soro de pacientes saudáveis. A análise foi realizada em diluição de 1:100. Esta análise foi realizada por meio da detecção do aminoácido cisteína por voltametria de pulso diferencial e avaliando a sonda redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ por voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica (Figura 53). A morfologia desses sistemas foi analisada por AFM. Para comparação, a resposta com a mesma diluição do soro positivo (Figura 54) também foi avaliada. Os valores obtidos a partir das simulações da EIE seguem compilados na Tabela 9.

Figura 53: (A) Voltamogramas cíclicos (B) Diagramas de Nyquist em solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mmol L⁻¹ contendo KCl 0,1 molmol L⁻¹, pH 6,5. (C) Voltamogramas de pulso diferencial em solução tampão fosfato pH= 7,4. Para: (—) Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV, (—) Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV + soro+ e (—) Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV + soro-. Inserido em B, circuito equivalente usado para a simulação dos dados experimentais da impedância. Inserido em C, resposta de corrente dos diferentes sistemas.



Fonte: Autor, 2016.

Tabela 9: Parâmetros obtidos por simulação aos dados de EIE para Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV, Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV/Soro+, Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV/ Soro-.

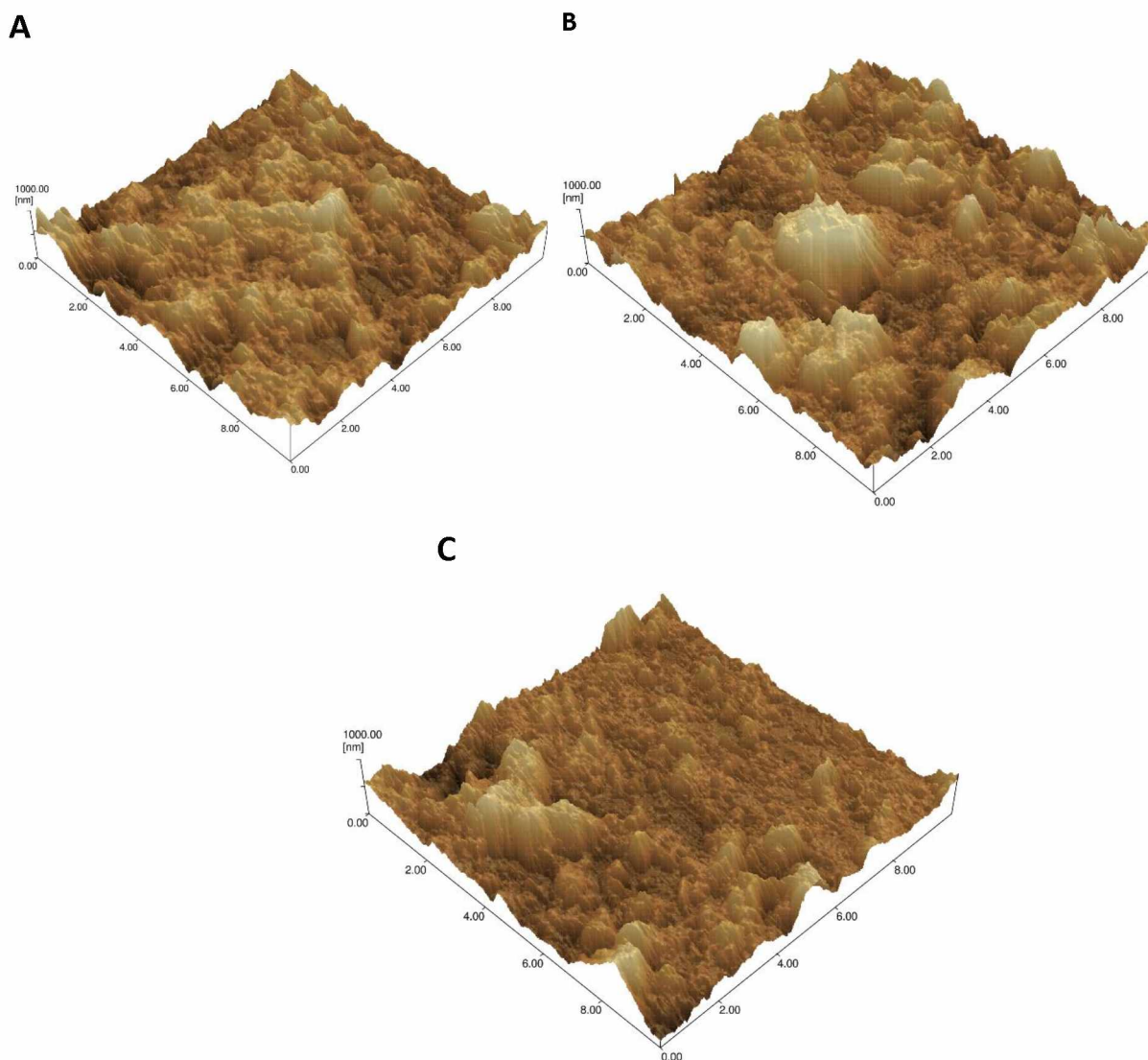
	R_s / Ω	R_{tc} / Ω	$\chi^2/10^{-3}$
Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV	137	$1,19 \times 10^3$	6
Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV/ Soro +	133	$3,440 \times 10^3$	2
Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV/ Soro -	131	2×10^3	3

Fonte: Autor, 2016

Os resultados mostraram que o PMDV diferencia amostras de pacientes infectados com o vírus da dengue de pacientes saudáveis. Ao analisar os valores de R_{ct} da impedância (Tabela9), verificou-se que houve uma pequena variação de resistência (R_{ct}) entre a sonda e amostra de pacientes saudáveis (810Ω). Já para pacientes infectados, houve uma diferença significativa das resistências (R_{ct}) de $2,250 \Omega$ correspondendo a 2,8 vezes maior que a sonda. Em adição, pode-se observar na Figura 53C que a variação entre as respostas da sonda e pacientes saudáveis foi de $0,7 \mu A$, já para pacientes infectados foi de $2,93 \mu A$. Evidenciando uma diferença de 4,2 vezes entre as amostras de pacientes infectados e saudáveis. Todavia, os resultados foram consistentes entre as três técnicas analisadas (Figura 53), uma vez que, os ensaios para o alvo específico (anticorpos IgM) presente na amostra positiva foram mais eficientes, promovendo uma maior variação de sinal por VC, EIE e VPD. Em adição,

A especificidade do biossensor também foi acompanhada por AFM, como mostra a Figura 54.

Figura 54: Imagens de AFM de (a) Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV e, após a interação com (b) soro positivo e (c) interação com soro negativo. Diluição 1:100, tempo de interação 40 minutos.



Fonte: Autor, 2016.

Tabela 10: Valores de rugosidade de diferentes superfícies:

	Rq / nm
Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV	142,4
Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV/ Soro +	168,7
Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV/ Soro -	135

Fonte: Autor, 2016.

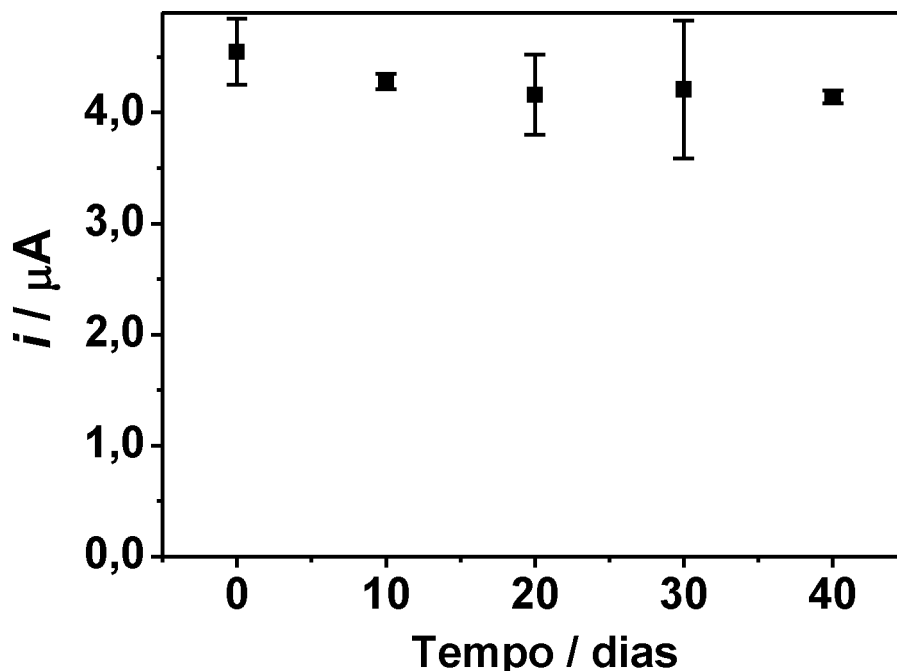
Os valores da Tabela 10 mostram que houve um aumento da rugosidade após a interação com o alvo específico (IgM) ($R_q = 168,7$ nm). Esse resultado indica que o sistema reconhece o alvo. Mesmo após a lavagem, foi observada a retenção do mesmo sobre a superfície do sensor biológico. Em adição, foi observado na Figura 53b que a rugosidade na topografia do eletrodo com o soro positivo são maiores do que o Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV. A superfície do eletrodo após a adição do soro negativo apresentou uma rugosidade um pouco menor do que o Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV ($R_q = 135$ nm). O soro negativo não tem interação específica com a superfície do biossensor sendo removido no processo de lavagem, neste caso, promovendo uma diminuição da rugosidade. Destacamos que os valores da Tabela 10 estão de acordo com os aspectos visuais observados na Figura 54. Contudo, esses resultados corroboram com os obtidos pelas técnicas de VC, VPD e EIE.

As diferentes técnicas utilizadas demonstraram a funcionalidade do biossensor, sugerindo a sua capacidade de detecção e discriminação das amostras de soro. Nesse sentido, destaca-se a sensibilidade do sistema como ferramenta diagnóstica conseguindo distinguir indivíduos doentes daqueles não doentes.

4.4.4.3 Estudo da estabilidade

O tempo de estocagem do eletrodo Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV foi avaliado por um período de 40 dias (Figura 55). A voltametria de pulso diferencial foi empregada para avaliar o reconhecimento com o alvo em função do tempo. As análises foram efetuadas a cada 10 dias e a adição do soro positivo (diluição 1:100) foi realizada previamente às medidas. Entre uma avaliação e outra, o sistema foi armazenado a 8°C em um frasco hermeticamente fechado, até a próxima detecção.

Figura 55: Variação da corrente em função do tempo de estocagem em dias. Todas as medidas foram realizadas com a mesma amostra de soro.



Fonte: Autor, 2016.

Os resultados mostraram que, após 40 dias de estocagem, o biossensor manteve 90,1% da atividade inicial.

A estabilidade é um parâmetro importante e crítico de um biossensor. A diminuição da sensibilidade devido à desnaturação de bases ligantes em proteínas, por exemplo, é um problema típico em sensores utilizando IgG para aplicações a longo prazo. O sistema aqui proposto utiliza um peptídeo, que é uma molécula pequena com uma estrutura estável, o qual pode manter a sua atividade por tempos mais longos (LU *et al.*, 2000). Em adição, o nanocompósito polimérico promove um microambiente favorável para o peptídeo, por causa da sua propriedade higroscópica, ocasionada pelos grupos funcionais. Estes fatores contribuíram para a boa estabilidade do biossensor. Além disso, conforme discutido na seção 4.2.5, o nanocompósito polimérico teve boa estabilidade em relação ao tempo de estocagem, com perda apenas de 17,35% da sua atividade inicial após 4 meses, sugerindo um ambiente propício para a estabilidade do biossensor.

Destaca-se que o Au/OG-r/poli(3-HFA)/PMDV foi capaz de reconhecer o alvo na amostra do soro após 40 dias, sugerindo que o sistema é adequado para aplicações após longos períodos de tempo.

5 CONCLUSÕES

A eletropolimerização do poli(ácido 3-hidroxifenilacético) sobre o eletrodo de ouro modificado com óxido de grafeno reduzido foi possível de tal forma a produzir um nanocompósito polimérico cujas propriedades eletroquímicas são superiores às do poli(ácido 3-hidroxifenilacético), devido ao efeito sinérgico entre as duas classes de materiais.

O OG-r foi eficientemente sintetizado a partir da redução química do OG com hidrazina. A caracterização por FT-IR e análise elementar evidenciou que a oxidação química do grafite foi eficiente, uma vez que o material apresentou grupos epóxido, hidroxila, carboxila e carbonila. Após a redução química, os resultados mostraram que os grupos contendo oxigênio foram parcialmente removidos e átomos de nitrogênio foram inseridos na estrutura do OG-r.

Estudos de AFM do OG revelaram uma espessura de aproximadamente 1,2 nm, indicando que o material foi exfoliado com sucesso no processo de sonicação. Imagens do MEV mostraram que o OG-r obtido apresenta uma superfície rugosa, típico desse material.

As análises por VC e EIE, evidenciaram que o OG tem caráter resistivo devido à presença dos grupos oxigenados. Já o OG-r evidenciou excelentes propriedades eletrocatalíticas para o par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, inclusive maiores do que o eletrodo de ouro limpo. Isso indica que o processo de redução com hidrazina foi eficiente para restaurar ligações π - π no OG-r. Estudos por MEV mostraram que o OG-r é bem distribuído sobre a superfície do ouro. Estas evidências também foram observadas a partir de imagens fotográficas do eletrodo de ouro utilizado no desenvolvimento do trabalho.

Estudos comparativos entre Au/poli(3-HFA) e Au/OG-r/poli(3-HFA), por voltametria cíclica em meio ácido, deixaram evidente que a quantidade de material eletro-sintetizado sobre o eletrodo modificado com OG-r é significativamente maior do que o eletrodo sem modificação. Em adição, o OG-r também foi eficaz na eletrooxidação do monômero, uma vez houve uma redução de potencial de 120 mV para a oxidação do mesmo, comparado ao eletrodo sem modificação. Esses resultados evidenciaram as propriedades da elevada área superficial e eletrocatalítica do óxido de grafeno reduzido produzido. Além disso, estudos de VC e AFM mostraram que o eletrodo de ouro foi eficientemente modificado com o nanocompósito polimérico.

O Au/OG-r/poli(3-HFA) apresentou boa estabilidade eletroquímica, com 80% e 74% da sua atividade inicial, para as varreduras anódica e catódica respectivamente, após 50 ciclos de varredura. Esses estudos juntamente com as medidas de VC em $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ evidenciaram ainda que a saída de prótons é superior à entrada de ânions, revelando o caráter aniônico do nanocompósito polimérico. Além disso, o nanocompósito polimérico reteve 83% da sua atividade inicial após 120 dias de estocagem, evidenciando que o material é promissor para aplicações industriais.

O Au/OG-r/poli(3-HFA) foi eficiente para a imobilização e detecção de oligonucleotídeos. Apresentando um percentual de hibridização de 47,7% para a detecção direta e 40,5 % para a detecção indireta. Esses resultados mostraram a efetividade da plataforma para o desenvolvimento de biossensores.

Estudos de VC, EIE e AFM mostraram que foi possível imobilizar o peptídeo mimético (DV) sobre a plataforma através da ativação de carboxilas com EDC/sulfo-NHS. Análises por VPD revelaram que é possível monitorar o sinal do biossensor através da oxidação do aminoácido cisteína presente na cadeia do peptídeo mimético (DV).

O biossensor apresentou ótima sensibilidade, uma vez que, houve interações com anticorpos IgM presentes em amostras de soro infectado como vírus da dengue para diferentes diluições: 1:50, 1:100, 1:250, 1:500, 1:750, 1:1000 e 1:10000.

O biossensor produzido foi capaz de discriminar qualitativamente amostras de soro de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com o vírus da dengue do tipo 3, por um conjunto de diferentes técnicas de detecção (VPD, VC, EIE e AFM). Além disso, o biossensor teve uma excelente estabilidade, com redução de apenas 9,9 % depois de 40 dias de armazenamento.

Nesse sentido, o biossensor produzido tem potencialidade para diagnósticos clínicos, uma vez que foi testado utilizando amostras de soro humano. Destaca-se que a ótima sensibilidade do biossensor, devido ao reconhecimento do alvo a altas diluições, propicia um diagnóstico na fase crítica da doença, já que baixos níveis do anticorpo IgM podem ser encontrados. Além disso, o sistema proporciona uma interação específica devido à utilização de um peptídeo mimético (DV) como elemento de reconhecimento biológico. Neste caso, um falso diagnóstico por interferentes é pouco provável. Em adição, o sistema viabiliza um diagnóstico em tempo real à temperatura ambiente, restringindo-se apenas ao tempo de reação entre

sonda e alvo de 40 minutos. Devido à existência de aparelhos portáteis, os quais consistem das técnicas voltamétricas, incluindo a voltametria de pulso diferencial, é possível realizar o diagnóstico em áreas urbanas e rurais, abrangendo assim maior extensão da população.

Desta forma, a síntese do óxido de grafeno reduzido bem como sua aplicação no desenvolvimento de um nanocompósito polimérico com o poli(ácido 3-hidroxifenilacético) foi uma contribuição importante para os trabalhos já desenvolvidos pelo grupo de pesquisa LAFIP, uma vez que promoveu um aumento significativo na sensibilidade em sistemas de sensoriamento biológico. Esse fator contribui para a utilização de quantidades reduzidas de amostras biológicas, ampliando a aplicabilidade do sistema. Além disso, a produção do óxido de grafeno reduzido via redução química possibilita a sua produção em larga escala. Por fim, o conjunto de características marcantes do nanocompósito polimérico viabiliza o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos sensíveis, estáveis e de baixo custo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCON, S.; TALARMIN, A.; DEBRUYNE, M.; FALCONAR, A.; DEUBEL, V.; FLAMAND, M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **J Clin Microbiol**, v. 40, p. 376-81, 2002.

ALLEN, M. J.; TUNG, V. C.; KANER, R. B. Honeycomb Carbon: A Review of Graphene. **Chem. Rev.**, v. 110, p. 132-145, 2010.

ARREDONDO, M.; STOYTCHIEVA, M.; ZLATEV, R.; GOCHEV, V. Some clinical applications of the electrochemical biosensors **Mini Rev Med Chem**, v. 12, p. 1301-1313, 2012.

ASHLEY, E. A. Dengue fever. **Curr Anaesth Crit Care**, v. 1, n. 1, p. 39-41, 2011.

BAE, S.; KIM, H.; LEE, Y.; XU, X.; PARK, J. S.; ZHENG, Y.; BALAKRISHNAN, J.; LEI, T.; KIM, H. R.; SONG, Y. I.; KIM, Y. J.; KIM, K. S.; OZYILMAZ, B.; AHN, J. H.; HONG, B. H.; IIJIMA, S. Roll-to-roll production of 30-inch graphene films for transparent electrodes. **Nat Nanotechnol**, v. 5, n. 8, p. 574-8, 2010.

BAGHERYAN, Z.; RAOOF, J. B.; GOLABI, M.; TURNER, A. P.; BENI, V. Diazonium-based impedimetric aptasensor for the rapid label-free detection of Salmonella typhimurium in food sample. **Biosens Bioelectron**, v. 80, p. 566-73, 2016.

BALANDIN, A. A.; GHOSH, S.; BAO, W.; CALIZO, I.; TEWELDEBRHAN, D.; MIAO, F.; LAU, C. N. Superior thermal conductivity of single-layer graphene. **Nano Lett**, v. 8, n. 3, p. 902-7, 2008.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 7^a ed. Nova York: W.H: Freeman & Company, 2012.

BERGER, C.; SONG, Z.; LI, X.; WU, X.; BROWN, N.; NAUD, C.; MAYOU, D.; LI, T.; HASS, J.; MARCHENKOV, A. N.; CONRAD, E. H.; FIRST, P. N.; DE HEER, W. A. Electronic confinement and coherence in patterned epitaxial graphene. **Science**, v. 312, n. 5777, p. 1191-6, 2006.

BISSESSUR, R.; SCULLY, S. Intercalation of solid polymer electrolytes into graphite oxide. **Solid State Ionics**, v. 178, n. 11-12, p. 877-882, 2007.

BLACHA, A.; KRUKIEWICZ, K.; ŻAK, J. The covalent grafting of polymers to the solid surface. **CHEMIK**, v. 65, p. 11-19, 2011.

BOLOTIN, K. I.; SIKES, K. J.; JIANG, Z.; KLIMA, M.; FUDENBERG, G.; HONE, J.; KIM, P.; STORMER, H. L. Ultrahigh electron mobility in suspended graphene. **Solid State Commun**, v. 146, n. 9-10, p. 351-355, 2008.

BRADY, O. J.; GETHING, P. W.; BHATT, S.; MESSINA, J. P.; BROWNSTEIN, J. S.; HOEN, A. G.; MOYES, C. L.; FARLOW, A. W.; SCOTT, T. W.; HAY, S. I. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 8, p. e1760, 2012.

BRASIL. Ministério da saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika. **Boletim Epidemiológico**, v. 47, n. 33, 2016.

BRETT, C.M.A.; BRETT, A.M.O. **Electrochemistry, Principles, Methods and Applications**, Oxford Uni Press, 1994.

BRODIE, B. C. On the Atomic Weight of Graphite. **Philos. Trans. R. Soc.**, v. 149, p. 249-259, 1859.

BUMBUDSANPHAROKKE, N.; KO, S. Nano-Food Packaging: An Overview of Market, Migration Research, and Safety Regulations. **J Food Sci**, v. 80, n. 5, p. R910-R923, 2015.

CASTRO, A. C. H.; FRANÇA, E. G.; PAULA, L. F.; SOARES, M. M. C. N.; GOULART, L. R.; MADURRO, J. M.; MADURRO, A. G. B. Preparation of genosensor for detection of specific DNA sequence of the hepatitis B virus. **Appl Surf Sci**, v. 314, p. 273-279, 2014.

CHATTERJEE, S.; CHEN, A. Facile electrochemical approach for the effective detection of guanine. **Electrochem Commun**, v. 20, p. 29-32, 2012.

CHEN, S. H.; CHUANG, Y. C.; LU, Y. C.; LIN, H. C.; YANG, Y. L.; LIN, C. S. A method of layer-by-layer gold nanoparticle hybridization in a quartz crystal microbalance DNA sensing system used to detect dengue virus. **Nano Rev**, v. 20, 2009.

CHNG, E. L.; PUMERA, M. Solid-state electrochemistry of graphene oxides: absolute quantification of reducible groups using voltammetry. **Chem Asian J**, v. 6, n. 11, p. 2899-901, 2011.

COMPTON, O. C.; NGUYEN, S. T. Graphene oxide, highly reduced graphene oxide, and graphene: versatile building blocks for carbon-based materials. **Small**, v. 6, n. 6, p. 711-23, 2010.

CROWLEY, C.; BIRCHALL, M.; SEIFALIAN, A. M. Trachea transplantation: from laboratory to patient. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 9, n. 4, p. 357-367, 2015.

DAS, T. K.; PRUSTY, S. Graphene-Based Polymer Composites and Their Applications. **Polym Plast Technol Eng**, v. 52, n. 4, p. 319-331, 2013.

DIAS, A. C.; GOMES-FILHO, S. L.; SILVA, M. M.; DUTRA, R. F. A sensor tip based on carbon nanotube-ink printed electrode for the dengue virus NS1 protein. **Biosens Bioelectron**, v. 44, p. 216-21, 2013.

DO NASCIMENTO, N. M.; JUSTE-DOLZ, A.; GRAU-GARCÍA, E.; ROMÁN-IVORRA, J. A.; PUCHADES, R.; MAQUIEIRA, A.; MORAIS, S.; GIMENEZ-ROMERO, D. Label-free piezoelectric biosensor for prognosis and diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus. **Biosens Bioelectron**, v. 90, p. 166-173, 2017.

DU, M.; YANG, T.; LI, X.; JIAO, K. Fabrication of DNA/graphene/polyaniline nanocomplex for label-free voltammetric detection of DNA hybridization. **Talanta**, v. 88, p. 439-44, 2012.

ENACHE, T. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Boron doped diamond and glassy carbon electrodes comparative study of the oxidation behaviour of cysteine and methionine. **Bioelectrochem**, v. 81, n. 1, p. 46-52, 2011.

_____. Peptide methionine sulfoxide reductase A (MsrA): direct electrochemical oxidation on carbon electrodes. **Bioelectrochem**, v. 89, p. 11-8, 2013.

FEI, S.; CHEN, J.; YAO, S.; DENG, G.; HE, D.; KUANG, Y. Electrochemical behavior of L-cysteine and its detection at carbon nanotube electrode modified with platinum. **Anal Biochem**, v. 339, n. 1, p. 29-35, 2005.

FERREIRA, D. C.; RODRIGUES, L. P.; MADURRO, J. M.; MADURRO, A. G. B.; OLIVEIRA, R. T. S.; ABRAHÃO, O. Graphite Electrodes Modified with poly(3-hydroxybenzoic acid) for Oligonucleotides Sensors. **Int J Electrochem Sci**, v. 9, p. 6246 - 6257, 2014.

FERREIRA, L. F.; SANTOS, C. C.; DA CRUZ, F. S.; CORREA, R. A. M. S.; VERLY, R. M.; DA SILVA, L. M. Preparation, characterization, and application in biosensors of functionalized platforms with poly(4-aminobenzoic acid). **J Mater Sci**, v. 50, n. 3, p. 1103-1116, 2014.

FRY, S. R.; MEYER, M.; SEMPLE, M. G.; SIMMONS, C. P.; SEKARAN, S. D.; HUANG, J. X.; MCELNEA, C.; HUANG, C. Y.; VALKS, A.; YOUNG, P. R.; COOPER, M. A. The diagnostic sensitivity of dengue rapid test assays is significantly enhanced by using a combined antigen and antibody testing approach. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 6, p. e1199, 2011.

GAO, X.; JANG, J.; NAGASE, S. Hydrazine and Thermal Reduction of Graphene Oxide: Reaction Mechanisms, Product Structures, and Reaction Design. **J. Phys. Chem. C**, v. 114, p. 832-842, 2010.

GULATI, S.; GULATI, A.; PANGTEY, G.; SINGH, S. P. Shock presenting in emergency – Dengue or sepsis? **I J M S**, v. 7, n. 4, p. 149-151, 2016.

GUPTA, A.; CHEN, G.; JOSHI, P.; TADIGADAPA, S. Raman Scattering from High-Frequency Phonons in Supported n-Graphene Layer Films. **Nano Lett**, v. 6, p. 2667-2673, 2006.

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue: an update. **Lancet Infect Dis**, v. 2, n. 1, p. 33-42, 2002.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G.; BRAVO, J.; VALDES, L.; VASQUEZ, S.; HALSTEAD, S. B. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections **Int J Infect Dis**, v. 6, p. 118-124, 2002.

HALSTEAD, S. B. Dengue. **Lancet**, v. 370, n. 9599, p. 1644-1652, 2007.

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate Techniques**. 2nd edition. Illinois, USA: Rockford, 2008.

HIRATA, M.; GOTOU, T.; HORIUCHI, S.; FUJIWARA, M.; OHBA, M. Thin-film particles of graphite oxide 1. **Carbon**, v. 42, n. 14, p. 2929-2937, 2004.

HU, K.; KULKARNI, D. D.; CHOI, I.; TSUKRUK, V. V. Graphene-polymer nanocomposites for structural and functional applications. **Prog Polym Sci**, v. 39, n. 11, p. 1934-1972, 2014.

HUANG, H.; BAI, W.; DONG, C.; GUO, R.; LIU, Z. An ultrasensitive electrochemical DNA biosensor based on graphene/Au nanorod/polythionine for human papillomavirus DNA detection. **Biosens Bioelectron**, v. 68, p. 442-6, 2015.

HUANG, J. X.; BISHOP-HURLEY, S. L.; COOPER, M. A. Development of Anti-Infectives Using Phage Display: Biological Agents against Bacteria, Viruses, and Parasites. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, p. 4569-4582, 2012.

HUANG, K.-J.; NIU, D.-J.; LIU, X.; WU, Z.-W.; FAN, Y.; CHANG, Y.-F.; WU, Y.-Y. Direct electrochemistry of catalase at amine-functionalized graphene/gold nanoparticles composite film for hydrogen peroxide sensor. **Electrochim Acta**, v. 56, n. 7, p. 2947-2953, 2011.

HUMMERS, W. S.; OFFERMAN, R. E. Preparation of Graphite Oxide **J Amer Chem Soc**, v. 80, p. 1958, 1958.

IDUMAH, C. I.; HASSAN, A.; AFFAM, A. C. A review of recent developments in flammability of polymer nanocomposites. **Rev Chem Eng**, v. 31, n. 2, p. 149-177, 2015.

JABARI SERESHT, R.; JAHANSHAHI, M.; RASHIDI, A.; GHOREYSHI, A. A. Synthesize and characterization of graphene nanosheets with high surface area and nano-porous structure. **Appl Surf Sci**, v. 276, p. 672-681, 2013.

JAHANSHAHI, P.; ZALNEZHAD, E.; SEKARAN, S. D.; ADIKAN, F. R. Rapid immunoglobulin M-based dengue diagnostic test using surface plasmon resonance biosensor. **Sci Rep**, v. 4, p. 3851, 2014.

JIN, L.; WU, D.; KUDDANNAYA, S.; ZHANG, Y.; WANG, Z. Fabrication, Characterization, and Biocompatibility of Polymer Cored Reduced Graphene Oxide Nanofibers. **ACS Appl Mater Interfaces**, v. 8, n. 8, p. 5170-7, 2016.

JIN, S.-A.; POUDYAL, S.; MARINERO, E. E.; KUHN, R. J.; STANCIU, L. A. Impedimetric Dengue Biosensor based on Functionalized Graphene Oxide Wrapped Silica Particles. **Electrochim Acta**, v. 194, p. 422-430, 2016.

KIM, M.; JUNG, T.; KIM, Y.; LEE, C.; WOO, K.; SEOL, J. H.; YANG, S. A microfluidic device for label-free detection of Escherichia coli in drinking water using positive dielectrophoretic focusing, capturing, and impedance measurement. **Biosens Bioelectron**, v. 74, p. 1011-5, 2015.

KOVTYUKHOVA, N. I.; OLLIVIER, P. J.; MARTINS, B. R.; MALLOUK, T. E.; CHIZHIK, S. A.; BUZANEVA, E. V.; GORCHINSKIY, A. D. Layer-by-Layer Assembly of Ultrathin Composite Films from Micron-Sized Graphite Oxide Sheets and Polycations. **Chem. Mater**, v. 11, p. 771-778, 1999.

KRISHNAMOORTHY, K.; KIM, G. S.; KIM, S. J. Graphene nanosheets: Ultrasound assisted synthesis and characterization. **Ultrason Sonochem**, v. 20, n. 2, p. 644-9, 2013.

KUMBHAT, S.; SHARMA, K.; GEHLOT, R.; SOLANKI, A.; JOSHI, V. Surface plasmon resonance based immunosensor for serological diagnosis of dengue virus infection. **J Pharm Biomed Anal**, v. 52, n. 2, p. 255-9, 2010.

LADNER, R. C.; SATO, A. K.; GORZELANY, J.; DE SOUZA, M. Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. **Drug Discov Today**, v. 9, n. 12, p. 525-529, 2004.

LEE, C.; WEI, X.; KY SAR, J. W.; HONE, J. Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene. **Science**, v. 321, n. 5887, p. 385-8, 2008.

LERF, A.; HE, H.; FORSTER, M.; KLINOWSKI, J. Structure of Graphite Oxide Revisited. **J Phys Chem**, v. 102, p. 4477-82, 1998.

LI, R.; HUANG, H.; HUANG, L.; LIN, Z.; GUO, L.; QIU, B.; CHEN, G. Electrochemical biosensor for epidermal growth factor receptor detection with peptide ligand. **Electrochim Acta**, v. 109, p. 233-237, 2013.

LI, X.; CAI, W.; AN, J.; KIM, S.; NAH, J.; YAN, D.; PINER, R.; VELAMAKANNI, A.; JUNG, I.; TUTUC, E.; BANERJEE, S. K.; COLOMBO, L.; RUOFF, R. S. Large-Area Synthesis of High-Quality and Uniform Graphene Films on Copper Foils. **Science**, v. 324, p. 1312-4, 2009.

LI, Y.; AFRASIABI, R.; FATHI, F.; WANG, N.; XIANG, C.; LOVE, R.; SHE, Z.; KRAATZ, H. B. Impedance based detection of pathogenic E. coli O157:H7 using a ferrocene-antimicrobial peptide modified biosensor. **Biosens Bioelectron**, v. 58, p. 193-9, 2014.

LINARES, E. M.; PANNUTI, C. S.; KUBOTA, L. T.; THALHAMMER, S. Immunospot assay based on fluorescent nanoparticles for Dengue fever detection. **Biosens Bioelectron**, v. 41, p. 180-5, 2013.

LIU, X.; MARRAKCHI, M.; XU, D.; DONG, H.; ANDREESCU, S. Biosensors based on modularly designed synthetic peptides for recognition, detection and live/dead differentiation of pathogenic bacteria. **Biosens Bioelectron**, v. 80, p. 9-16, 2016.

LU, H. C.; CHEN, H. M.; LIN, Y. S.; LIN, J. W. A Reusable and Specific Protein A-Coated Piezoelectric Biosensor for Flow Injection Immunoassay. **Biotechnol. Prog.**, v. 16, p. 116-124, 2000.

LUNA, D. M.; OLIVEIRA, M. D.; NOGUEIRA, M. L.; ANDRADE, C. A. Biosensor based on lectin and lipid membranes for detection of serum glycoproteins in infected patients with dengue. **Chem Phys Lipids**, v. 180, p. 7-14, 2014.

LUNA, D. M. N.; AVELINO, K. Y. P. S.; CORDEIRO, M. T.; ANDRADE, C. A. S.; OLIVEIRA, M. D. L. Electrochemical immunosensor for dengue virus serotypes based on 4-mercaptobenzoic acid modified gold nanoparticles on self-assembled cysteine monolayers. **Sens Actuat B Chem**, v. 220, p. 565-572, 2015.

MALECKA, K.; STACHYRA, A.; GÓRA-SOCHACKA, A.; SIRKO, A.; ZAGÓRSKI-OSTOJA, W.; RADECKA, H.; RADECKI, J. Electrochemical genosensor based on disc and screen printed gold electrodes for detection of specific DNA and RNA sequences derived from Avian Influenza Virus H5N1. **Sens Actuat B Chem**, v. 224, p. 290-297, 2016.

MALHOTRA, B. D.; CHAUBEY, A.; SINGH, S. P. Prospects of conducting polymers in biosensors. **Anal Chim Acta**, v. 578, n. 1, p. 59-74, 2006.

MCALLISTER, M. J.; LI, J. L.; ADAMSON, D. H.; SCHNIEPP, H. C.; ABDALA, A. A.; LIU, J.; ALONSO, M. H.; MILIUS, D. L.; CAR, R.; PRUD'HOMME, R. K.; AKSAY, I. A. Single Sheet Functionalized Graphene by Oxidation and Thermal Expansion of Graphite. **Chem Mater**, v. 19, p. 4396-4404, 2007.

MCGRATH, T. F.; ANDERSSON, K.; CAMPBELL, K.; FODEY, T. L.; ELLIOTT, C. T. Development of a rapid low cost fluorescent biosensor for the detection of food contaminants. **Biosens Bioelectron**, v. 41, p. 96-102, 2013.

MERINO, S.; MARTIN, C.; KOSTARELOS, K.; PRATO, M.; VAZQUEZ, E. Nanocomposite Hydrogels: 3D Polymer-Nanoparticle Synergies for On-Demand Drug Delivery. **Acs Nano**, v. 9, n. 5, p. 4686-4697, 2015.

MOI, M. L.; OMATSU, T.; TAJIMA, S.; LIM, C. K.; KOTAKI, A.; IKEDA, M.; HARADA, F.; ITO, M.; SAIJO, M.; KURANE, I.; TAKASAKI, T. Detection of dengue virus nonstructural protein 1 (NS1) by using ELISA as a useful laboratory diagnostic method for dengue virus infection of international travelers. **J Travel Med**, v. 20, n. 3, p. 185-93, 2013.

NAVAKUL, K.; WARAKULWIT, C.; YENCHITSOMANUS, P. T.; PANYA, A.; LIEBERZEIT, P. A.; SANGMA, C. A novel method for dengue virus detection and antibody screening using a graphene-polymer based electrochemical biosensor. **Nanomedicine**, 2016.

NGUYEN, Q. T.; BAIRD, D. G. Preparation of polymer-clay nanocomposites and their properties. **Adv Polym Tech**, v. 25, n. 4, p. 270-285, 2006.

NOVOSELOV, K. S.; GEIM, A. K.; MOROZOV, S. V.; JIANG, D.; ZHANG, Y.; DUBONOS, S. V.; GRIGORIEVA, I. V.; FIRSOV, A. A. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. **Science**, v. 306, p. 666-669, 2004.

OBRAZTSOV, A. N. Making graphene on a large scale. **Nat Nanotechnol**, v. 4, p. 212-213 2009.

OLIVEIRA, A. C. S. **ANÁLISE DA IMUNORREATIVIDADE SOROLÓGICA E BIOATIVIDADE CELULAR DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS AO VÍRUS DENGUE ISOLADOS POR PHAGE DISPLAY** 2012. (Tese de Doutorado). Medicina Tropical e Infectologia, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba.

OLIVEIRA, R. M. L.; VIEIRA, S. N.; ALVES, H. C.; FRANÇA, E. G.; FRANCO, D. L.; FERREIRA, L. F.; MADURRO, A. G. B.; MADURRO, J. M. Electrochemical and morphological studies of an electroactive material derived from 3-hydroxyphenylacetic acid: a new matrix for oligonucleotide hybridization. **J Mat Sci**, v. 45, n. 2, p. 475-482, 2009.

PALECEK, E.; BARTOSIK, M. Electrochemistry of nucleic acids. **Chem Rev**, v. 112, n. 6, p. 3427-81, 2012.

PARK, S.; AN, J.; POTTS, J. R.; VELAMAKANNI, A.; MURALI, S.; RUOFF, R. S. Hydrazine-reduction of graphite- and graphene oxide. **Carbon**, v. 49, n. 9, p. 3019-3023, 2011.

PARKASH, O.; YEAN, C. Y.; SHUEB, R. H. Screen Printed Carbon Electrode Based Electrochemical Immunosensor for the Detection of Dengue NS1 Antigen. **Diagnostics (Basel)**, v. 4, n. 4, p. 165-80, 2014.

PARMLEY, S. F.; SMITH, G. P. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. **Gene**, v. 73, n. 2, p. 305-18, 1988.

PAVAN, S.; BERTI, F. Short peptides as biosensor transducers. **Anal Bioanal Chem**, v. 402, n. 10, p. 3055-70, 2012.

PEELING, R. W.; ARTSOB, H.; PELEGRINO, J. L.; BUCHY, P.; CARDOSA, M. J.; DEVI, S.; ENRIA, D. A.; FARRAR, J.; GUBLER, D. J.; GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; HUNSPERGER, E.; KLIK, S.; MARGOLIS, H. S.; NATHANSON, C. M.; NGUYEN, V. C.; RIZZO, N.; VÁZQUEZ, S.; YOKSAN, S. Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nat Rev Microb**, v. 8, n. 12, p. S30-S37, 2010.

PERUMAL, V.; HASHIM, U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. **J App Biom**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2014.

PODILA, R.; MOORE, T.; ALEXIS, F.; RAO, A. M. Graphene coatings for enhanced hemo-compatibility of nitinol stents. **RSC Adv.**, v. 3, n. 6, p. 1660-1665, 2013.

RALPH, T. R.; HITCHMAN, M. L.; MILLINGTON, J. P.; WALSH, F. C. The electrochemistry of L-cystine and L-cysteine Part 1: Thermodynamic and kinetic studies **J Electroanal Chem**, p. 1-15 1994.

RASHEED, P. A.; SANDHYARANI, N. Graphene-DNA electrochemical sensor for the sensitive detection of BRCA1 gene. **Sens Actuat B Chem**, v. 204, p. 777-782, 2014.

RATH, T.; KUNDU, P. P. Reduced graphene oxide paper based nanocomposite materials for flexible supercapacitors. **Rsc Advances**, v. 5, n. 34, p. 26666-26674, 2015.

RATHAKRISHNAN, A.; SEKARAN, S. D. New development in the diagnosis of dengue infections. **Expert Opin Med. Diagn.**, v. 7, n. 1, 2013.

REYNAUD, J. A.; MALFOY, B. Electrochemical investigations of amino acids at solid electrodes: Part I. Sulfur components: Cystine, cysteine, methionine. **J Electroanal Chem Interfacial Electrochem**, v. 114, n. 2, p. 195–211, 1980.

RODRIGUES, L. P.; FERREIRA, D. C.; FERREIRA, L. F.; ORELLANA, S. C.; OLIVEIRA, G. C.; MADURRO, A. G. B.; OLIVEIRA, R. J.; ABRAHÃO, O.; MADURRO, J. M. Electropolymerization of hydroxyphenylacetic acid isomers and the development of a bioelectrode for the diagnosis of bacterial meningitis. **J App Electrochem**, v. 45, n. 12, p. 1277-1287, 2015.

RODRIGUES, L. P.; FERREIRA, D. C.; SONODA, M. T.; MADURRO, A. G. B.; ABRAHÃO, O.; MADURRO, J. M. Electropolymerization mechanisms of hydroxyphenylacetic acid isomers. **J Mol Struct**, v. 1072, p. 298-306, 2014.

SANTOS, P. S.; NASCIMENTO, R.; RODRIGUES, L. P.; SANTOS, F. A.; FARIA, P. C.; MARTINS, J. R.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M.; GOULART, L. R. Functional epitope core motif of the *Anaplasma marginale* major surface protein 1a and its incorporation onto bioelectrodes for antibody detection. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33045, 2012.

SANTOS, T. V. S.; TEIXEIRA, R. R.; FRANCO, D. L.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G.; ESPINDOLA, F. S. Bioelectrode for detection of human salivary amylase. **Mater Sci Eng: C**, v. 32, n. 3, p. 530-535, 2012.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnol Adv**, v. 30, n. 3, p. 489-511, 2012.

SEGURADO, C. G.; CASSENOTE, A. J.; LUNA, E. A. Saúde nas metrópoles - Doenças infecciosas. **ESTUDOS AVANÇADOS**, v. 30, p. 29-49, 2016.

SHAI DAROVA, L. G.; BUDNIKOV, G. K. Chemically modified electrodes based on noble metals, polymer films, or their composites in organic voltammetry. **J Anal Chem**, v. 63, n. 10, p. 922-942, 2008.

SHAN, C.; YANG, H.; SONG, HAN, J. D.; IVASKA, A.; NIU L. Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase and Biosensing for Glucose Based on Graphene. **Anal. Chem**, v. 81, p. 2378-2382, 2009.

SHESHMANI, S.; AMINI, R. Preparation and characterization of some graphene based nanocomposite materials. **Carbohydr Polym**, v. 95, n. 1, p. 348-59, 2013.

SHI, F.; ZHENG, W.; WANG, W.; HOU, F.; LEI, B.; SUN, Z.; SUN, W. Application of graphene-copper sulfide nanocomposite modified electrode for electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin. **Biosens Bioelectron**, v. 64, p. 131-7, 2015.

SILVA, F. B.; VIEIRA, S. N.; GOULART, L. R.; FILHO; BOODTS, J. F.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Electrochemical Investigation of oligonucleotide-

DNA hybridization on poly(4-methoxyphenethylamine). **Int J Mol Sci**, v. 9, n. 7, p. 1173-88, 2008.

SILVA, J. V.; PIMENTEL, D. M.; SOUTO, D. E. P.; LUZ, R. C. S.; DAMOS, F. S. Application of horseradish peroxidase/polyaniline/bis(2-aminoethyl) polyethylene glycol-functionalized carbon nanotube composite as a platform for hydrogen peroxide detection with high sensitivity at low potential. **J Solid State Electrochem**, v. 17, n. 11, p. 2795-2804, 2013.

SILVA, M. M.; DIAS, A. C.; CORDEIRO, M. T.; MARQUES, E., JR.; GOULART, M. O.; DUTRA, R. F. A thiophene-modified screen printed electrode for detection of dengue virus NS1 protein. **Talanta**, v. 128, p. 505-10, 2014.

SILVA, M. M. S.; DIAS, A. C. M. S.; SILVA, B. V. M.; GOMES-FILHO, S. L. R.; KUBOTA, L. T.; GOULART, M. O. F.; DUTRA, R. F. Electrochemical detection of dengue virus NS1 protein with a poly(allylamine)/carbon nanotube layered immunoelectrode. **J Chem Tech Biotec**, v. 90, n. 1, p. 194-200, 2015.

SINAWANG, P. D.; RAI, V.; IONESCU, R. E.; MARKS, R. S. Electrochemical lateral flow immunosensor for detection and quantification of dengue NS1 protein. **Biosens Bioelectron**, v. 77, p. 400-8, 2016.

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, n. 4705, p. 1315-7, 1985.

SOUTO, D. E.; SILVA, J. V.; MARTINS, H. R.; REIS, A. B.; LUZ, R. C.; KUBOTA, L. T.; DAMOS, F. S. Development of a label-free immunosensor based on surface plasmon resonance technique for the detection of anti-Leishmania infantum antibodies in canine serum. **Biosens Bioelectron**, v. 46, p. 22-9, 2013.

SOUZA, M. F. B. ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS APLICADOS À ELETROANÁLISE: UMA BREVE ABORDAGEM. **Química Nova**, v. 20, p. 191-195, 1997.

SPATARU, N.; SARADA, B. V.; POPA, E.; TRYK, D. A.; FUJISHIMA, A. Voltammetric Determination of L-Cysteine at Conductive Diamond Electrodes. **Anal Chem**, v. 73, p. 514-519, 2001.

SRIKIATKHACHORN, A. Plasma leakage in dengue haemorrhagic fever. **Thromb Haemost**, v. 102, n. 6, p. 1042-9, 2009.

STANKOVICH, S.; DIKIN, D. A.; PINER, R. D.; KOHLHAAS, K. A.; KLEINHAMMES, A.; JIA, Y.; WU, Y.; NGUYEN, S. T.; RUOFF, R. S. Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide. **Carbon**, v. 45, n. 7, p. 1558-1565, 2007.

STAUDENMAIER, L. Verfahren zur Darstellung der Graphitslure. **Ber Dtsch Chem Ges**, v. 31, p. 1481–1487, 1898.

SUBRAMANI, A.; JACANGELO, J. G. Emerging desalination technologies for water treatment: A critical review. **Water Research**, v. 75, p. 164-187, 2015.

SUN, H.; SHE, P.; XU, K.; SHANG, Y.; YIN, S.; LIU, Z. A self-standing nanocomposite foam of polyaniline@reduced graphene oxide for flexible super-capacitors. **Synthetic Metals**, v. 209, p. 68-73, 2015.

SUNI, I. I. Impedance methods for electrochemical sensors using nanomaterials. **TrAC Trend Anal Chem**, v. 27, n. 7, p. 604-611, 2008.

TAI, D. F.; LIN, C. Y.; WU, T. Z.; HUANG, J. H.; SHU, P. Y. Artificial receptors in serologic tests for the early diagnosis of dengue virus infection. **Clin Chem**, v. 52, n. 8, p. 1486-91, 2006.

TELES, F. R.; PRAZERES, D. M.; LIMA-FILHO, J. L. Trends in dengue diagnosis. **Rev Med Virol**, v. 15, n. 5, p. 287-302, 2005.

TEOH, B. T.; SAM, S. S.; TAN, K. K.; DANLAMI, M. B.; SHU, M. H.; JOHARI, J.; HOOI, P. S.; BROOKS, D.; PIEPENBURG, O.; NENTWICH, O.; WILDER-SMITH, A.; FRANCO, L.; TENORIO, A.; ABUBAKAR, S. Early detection of dengue virus by use of

reverse transcription-recombinase polymerase amplification. **J Clin Microbiol**, v. 53, n. 3, p. 830-7, 2015.

THEVENOT, D.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. **Biosens Bioelectron**, v. 16, p. 121-31, 2001.

TURNER, A. P. Biosensors: sense and sensibility. **Chem Soc Rev**, v. 42, n. 8, p. 3184-96, 2013.

UR REHMAN, H.; AMAN, A.; NAWAZ, M. A.; KARIM, A.; GHANI, M.; BALOCH, A. H.; UL QADER, S. A. Immobilization of pectin depolymerising polygalacturonase using different polymers. **Int J Biol Macromol**, v. 82, p. 127-33, 2016.

VALENCIA, D. P.; DANTAS, L. M. F.; LARA, A.; GARCÍA, J.; RIVERA, Z.; ROSAS, J.; BERTOTTI, M. Development of a bio-electrochemical immunosensor based on the immobilization of SPINNTKPHEAR peptide derived from HPV-L1 protein on a gold electrode surface. **J Electroanal Chem**, v. 770, p. 50-55, 2016.

VASHIST, S. K. Comparison of 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide Based Strategies to Crosslink Antibodies on Amine-Functionalized Platforms for Immunodiagnostic Applications. **Diagnostics (Basel)**, v. 2, n. 3, p. 23-33, 2012.

WANG, D.; LI, Y.; HASIN, P.; WU, Y. Preparation, characterization, and electrocatalytic performance of graphene-methylene blue thin films. **Nano Research**, v. 4, n. 1, p. 124-130, 2010.

WANG, G.; WANG, B.; PARK, J.; YANG, J.; SHEN, X.; YAO, J. Synthesis of enhanced hydrophilic and hydrophobic graphene oxide nanosheets by a solvothermal method. **Carbon**, v. 47, n. 1, p. 68-72, 2009.

WANG, X.; LU, X.; CHEN, J. Development of biosensor technologies for analysis of environmental contaminants. **Trends Environmental Anal Chem**, v. 2, p. 25-32, 2014.

WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**. 7th ed. New York: Cambridge University Press, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global strategy for dengue prevention and control**, 2012–2020, 2012. Disponível em: <http://www.who.int/denguecontrol/9789241504034/en/>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue and severe dengue**, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>.

WONG, W. R.; KRUPIN, O.; SEKARAN, S. D.; MAHAMAD ADIKAN, F. R.; BERINI, P. Serological diagnosis of dengue infection in blood plasma using long-range surface plasmon waveguides. **Anal Chem**, v. 86, n. 3, p. 1735-43, 2014.

WONG, W. R.; SEKARAN, S. D.; ADIKAN, F. R.; BERINI, P. Detection of dengue NS1 antigen using long-range surface plasmon waveguides. **Biosens Bioelectron**, v. 78, p. 132-9, 2016.

WU, H.; WANG, J.; KANG, X.; WANG, C.; WANG, D.; LIU, J.; AKSAY, I. A.; LIN, Y. Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in platinum nanoparticles/graphene/chitosan nanocomposite film. **Talanta**, v. 80, n. 1, p. 403-6, 2009.

WU, T. Z.; SU, C. C.; CHEN, L. K.; YANG, H. H.; TAI, D. F.; PENG, K. C. Piezoelectric immunochip for the detection of dengue fever in viremia phase. **Biosens Bioelectron**, v. 21, n. 5, p. 689-95, 2005.

XIA, L.; WEI, Z.; WAN, M. Conducting polymer nanostructures and their application in biosensors. **J Colloid Interface Sci**, v. 341, n. 1, p. 1-11, 2010.

XIA, N.; XING, Y.; WANG, G.; FENG, Q.; CHEN, Q.; FENG, H.; SUN, X.; LIU, L. Probing of EDC/NHSS-Mediated Covalent Coupling Reaction by the Immobilization of Electrochemically Active Biomolecules **Int J Electrochem Sci**, v. 8, p. 2459 - 2467 2013.

XIANG, Q.; YU, J.; JARONIEC, M. Graphene-based semiconductor photocatalysts. **Chem Soc Rev**, v. 41, n. 2, p. 782-96, 2012.

XU, C.; YUAN, R.-S.; WANG, X. Selective reduction of graphene oxide. **New Carbon Materials**, v. 29, n. 1, p. 61-66, 2014.

YANEZ-SEDENO, P.; AGUI, L.; VILLALONGA, R.; PINGARRON, J. M. Biosensors in forensic analysis. A review. **Anal Chim Acta**, v. 823, p. 1-19, 2014.

YANG, J.; KIM, S. E.; CHO, M.; YOO, I. K.; CHOE, W. S.; LEE, Y. Highly sensitive and selective determination of bisphenol-A using peptide-modified gold electrode. **Biosens Bioelectron**, v. 61, p. 38-44, 2014.

YANG, J.; ZHOU, Y.; SUN, L.; ZHAO, N.; ZANG, C.; CHENG, X. Synthesis, characterization and optical property of graphene oxide films. **App Surf Sci**, v. 258, n. 12, p. 5056-5060, 2012.

YEH, T.-F.; CIHLÁŘ, J.; CHANG, C.-Y.; CHENG, C.; TENG, H. Roles of graphene oxide in photocatalytic water splitting. **Mater Today**, v. 16, n. 3, p. 78-84, 2013.

ZHU, P.; SHEN, M.; XIAO, S.; ZHANG, D. Experimental study on the reducibility of graphene oxide by hydrazine hydrate. **Physica B: Condensed Matter**, v. 406, n. 3, p. 498-502, 2011.