



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA – UFU
LABORATÓRIO DE FILMES POLIMÉRICOS E NANOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
INSTITUTO DE QUÍMICA



Desenvolvimento de imunossensor para detecção do hormônio tireoidiano L-triiodotironina (L-T3)

Heliane Sousa Da Silva

UBERLÂNDIA – MG

2017

HELIANE SOUSA DA SILVA

**Desenvolvimento de imunossensor para detecção do hormônio
tireoidiano L-triiodotironina (L-T3)**

Tese de Doutorado apresentada ao
programa de pós-graduação em Química
da Universidade Federal de Uberlândia
como pré-requisito para obtenção do
título de Doutora em Química

Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Graci Brito-Madurro

UBERLÂNDIA – MG

2017

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

- S586d
2017 Silva, Heliane Sousa da, 1989-
Desenvolvimento de imunossensor para detecção do hormônio tireoideano L-triiodotironina (L-T3) / Heliane Sousa da Silva. - 2017.
84 f. : il.
- Orientador: João Marcos Madurro.
Coorientadora: Ana Graci Brito-Madurro.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.11>
Inclui bibliografia.
1. Química - Teses. 2. Compósitos poliméricos - Teses. 3. Hormônios tireoideanos - Teses. I. Madurro, João Marcos. II. Brito-Madurro, Ana Graci. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU: 54



**Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química,
do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM QUÍMICA, NÚMERO 59/PPQUI.**

DATA: 26/01/2017

DISCENTE: Heliane Sousa da Silva

MATRÍCULA: 11223QMI004

TÍTULO DO TRABALHO: Desenvolvimento de um imunossensor para detecção do hormônio tireoidiano L-triiodotironina (L-T3).

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

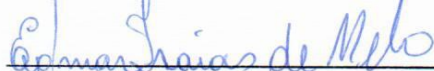
LINHA DE PESQUISA: Eletroquímica Aplicada

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Desenvolvimento de um imunossensor para a detecção de hormônios tireoidianos.

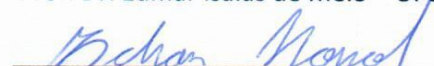
Às treze horas do dia vinte e seis de janeiro do ano dois mil e dezessete, no Auditório B do Bloco 50, Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Arnaldo César Pereira, da Universidade Federal de São João Del Rei, Zeki Naal, da Universidade De São Paulo, Edmar Isaías de Melo e Edson Nossol, da UFU e João Marcos Madurro, orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Regulamentar nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e 2 provou o(a) candidata(o). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO DO HORMÔNIO TIREOIDIANO L-TRIIODOTIRONINA (L-T3)

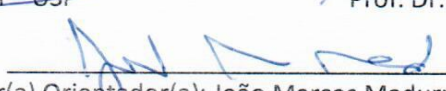
Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 17 horas e 50 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.


Prof. Dr. Arnaldo César Pereira – UFSJ


Prof. Dr. Edmar Isaías de Melo – UFU


Prof. Dr. Zeki Naal – USP


Prof. Dr. Edson Nossol – IQUFU


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

*Dedico este trabalho a Jesus Cristo, Senhor e
Salvador da minha vida!!!
... e a toda minha família que me apoiaram
durante esta longa caminhada.*

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar ao Pai Supremo e Celestial, criador de todas as coisas, por tudo que Ele tem me concedido durante este percurso;

A minha família, minha mãe Maria dos Anjos, meu pai Joaquim e ao meu irmão Rodrigo que sempre me apoiaram em todos os momentos da minha vida.

A minha segunda família que se encontra na Igreja Assembleia de Deus Tabernáculo Maanaim de Uberlândia, onde servimos a Deus com alegria! Agradeço aos líderes e amigos pelas incansáveis orações.

Aos meus orientadores João Marcos e Ana Graci, por terem me concedido a oportunidade de fazer parte do Laboratório de Filmes Poliméricos, pelo companheirismo, incentivos e auxílios.

Aos meus amigos Helieder, Renata, Eva Taísa, Camila, Sâmela, Fernanda e Priscila que, apesar de estarem longe, sempre torceram por mim.

A grande família LAFIP e agregados, Ana Cristina, Anderson, Bárbara, Danielle, Deusmaque, Fábio, Héden, José Manuel, João Afonso, Jussara, Kellen, Laise, Larissa, Leandro, Lídia, Livia, Luciano, Lucas Ferreira, Marcos Paulo, Mônica, Priscila, Rafael, Rafaela, Sandro, Thales, Vinícius, Driely e Erick, pela amizade, pelo agradável ambiente de trabalho e pelos momentos de descontrações. Ressalto que cada um de vocês são muito especiais para mim e os levarei para sempre em meu coração.

Aos técnicos Guilherme e Rafael por me ajudarem a fazer as imagens de AFM e MEV pertinentes às amostras do meu trabalho, ao técnico Anibal por ter me ajudado a preparar as práticas durante o meu estágio de docência.

Ao professor Waldomiro Borges Neto, por permitir a utilização do equipamento de FT-IR em seu laboratório.

À minha amiga Mayta Peixoto, secretária do programa de pós-graduação em Química, pela paciência, por todo apoio e suporte oferecido ao longo destes anos.

Aos membros da banca, pelo aceite na participação e pelas valiosas contribuições no aprimoramento deste trabalho.

Ao CNPq, Fapemig e CAPES pelo fomento à pesquisa desenvolvida.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho!!!!

“Porque Dele e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente. Amém.”
(Romanos 11:36)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	iX
LISTA DE FIGURAS.....	Xii
LISTA DE TABELAS.....	XVi
RESUMO.....	XVii
ABSTRACT.....	XViii
1.0 INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Hormônios tireoidianos.....	1
1.2. Técnicas de quantificação de hormônios	3
1.3. Biossensores.....	5
1.3.1. Genossensores.....	6
1.3.2. Biossensores enzimáticos.....	7
1.3.3. Biossensores microbiológicos.....	8
1.3.4. Imunossensores.....	9
1.3.4.1. Anticorpos como elemento de reconhecimento.....	9
1.4. Técnicas de imobilização.....	11
1.5. Funcionalização dos eletrodos.....	12
1.5.1. Grafeno e seus derivados.....	12
1.5.2. Polímeros condutores.....	14
1.5.3. Síntese química.....	16

1.5.4. Síntese eletroquímica.....	16
1.5.4.1. Tiramina.....	17
1.5.5. Nanocompósitos poliméricos.....	18
1.6. Técnicas utilizadas.....	19
1.6.1. Voltametria cíclica.....	19
1.6.2. Voltametria de pulso diferencial.....	20
1.6.3. Microscopia de Força Atômica.....	21
1.6.4. Modos de operação do AFM.....	22
1.6.5. Microscopia eletrônica de varredura.....	22
2.0. JUSTIFICATIVA.....	23
3.0. OBJETIVO GERAL.....	24
3.1. Objetivos específicos.....	24
4.0. MATERIAIS E REAGENTES.....	25
4.1. Soluções.....	25
5.0. PROCEDIMENTOS.....	26
5.1. Preparação dos eletrodos de trabalho.....	26
5.2. Preparação do eletrodo de referência.....	27
5.3. Preparação do eletrodo auxiliar.....	28
5.4. Escolha dos eletrodos de grafite.....	28
5.5. Redução eletroquímica do óxido de grafeno (OGre) sobre eletrodo de grafite.....	29
5.6. Otimização do número de ciclos de varreduras para a funcionalização dos eletrodos de grafite com politiramina e eletropolimerização da mesma sobre EG e sobre EG/OGre.....	29

5.7. Transporte iônico nos estudos de reversibilidade.....	30
5.8. Propriedades de transferência eletrônica.....	30
5.9. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	30
5.10. Otimização dos parâmetros da voltametria de pulso diferencia.....	31
5.11. Otimização da concentração, tempo e pH de imobilização da sonda.....	31
5.12. Construção do imunossensor.....	32
5.13. Caracterização morfológica.....	32
5.14. Construção da curva de calibração.....	33
6.0. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	34
6.1. Escolha dos eletrodos de grafite.....	34
6.2. Redução eletroquímica do óxido de grafeno.....	36
6.3. Caracterização do nanomaterial sobre o eletrodo de grafite.....	38
6.4. Padronização do número de ciclos para a eletropolimerização da tiramina sobre eletrodo de grafite.....	45
6.4.1. Mecanismo de eletropolimerização da tiramina sobre EG/OGre.....	53
6.5. Estudo de transferência de carga.....	55
6.6. Estudos de reversibilidade.....	56
6.7. Caracterização morfológica.....	63
6.8. Preparação do imunossensor.....	65
6.8.1. Padronização das condições de imobilização da sonda.....	67
6.8.2. Caracterização morfológica.....	71
6.11. Construção da curva de calibração.....	74

7.0. CONCLUSÕES	76
8.0. ESTUDOS FUTUROS.....	79
9.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac – Anticorpo

AFM – Microscopia de força atômica

Ag – Antígeno

AgAc – complexo antígeno-anticorpo

Anti L-T3 – anticorpo L-T3

BSA – proteína do soro bovino

DNA – Ácido desoxirribonucleico

E – potencial

E_{final} – potencial final

EG – Eletrodo de grafite

EG/OGre/PTir – Eletrodo de grafite modificado com óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente e politiramina.

EG/PTir – Eletrodo de grafite modificado com politiramina

E_{inicial} – potencial inicial

ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

E_p – potencial de pico

E_{p/2} – potencial de meia onda

FT-IV – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

HT – Hormônios tireoidianos

i – corrente

IgA – Imunoglobulina A

IgD – Imunoglobulina D

IgE – Imunoglobulina E

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

I_{pa} – Corrente de pico anódico

I_{pc} – Corrente de pico catódico

K_A – constante de afinidade

kDa – quilo Dalton

L-T3 – L-triiodotironina

L-T4 – L- tetraiodotironina (tiroxina)

m² g⁻¹ – metro quadrado por grama – área superficial

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

mV s⁻¹ – milivolts por segundo

ng mL⁻¹ – nanograma por mililitro

OG – Óxido de grafeno

OGre – Óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente

PANI – Polianilina

pg mL⁻¹ – picograma por mililitro

PCs – Polímeros condutores

PPy – polipirrol

PTH – politiofeno

PTir – Politiramina

rpm – rotações por minuto

Rq – valor de rugosidade

S cm⁻¹ – Siemens por centímetro

TRH – Hormônio Liberador de tireotrofina

TSH – Hormônio estimulante da tireoide

V – Volts

VC – Voltametria Cíclica

VPD – Voltametria de pulso diferencial

W m⁻¹K⁻¹ – watt por metro e por kelvin - unidade de condutividade térmica

ΔE_p – variação do potencial de pico anódico ou catódico

v – Velocidade de varredura

$v^{1/2}$ – raiz quadrada da velocidade de varredura

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Configuração absoluta dos hormônios (+)-L-T3, (-)-D-T4 e (+)-L-T4	1
Figura 2: Esquema do teste de ELISA.....	4
Figura 3: Esquema representativo de um biossensor.....	5
Figura 4: Esquema do processo de hibridização em um genossensor.....	7
Figura 5: Representação esquemática de biossensores de (a) primeira, (b) segunda e (c) terceira geração.....	8
Figura 6: Representação esquemática da estrutura de um anticorpo	10
Figura 7: Representação esquemática dos tipos de imobilização.....	11
Figura 8: Etapas de obtenção de óxido de grafeno a partir de grafite.....	13
Figura 9: Fórmula estrutural da tiramina (a) e da tirosina (b).....	18
Figura 10: (A) Sinal de excitação para a voltametria cíclica e (B) Voltamograma cíclico para um processo redox reversível.....	19
Figura 11: Representação esquemática da aplicação do potencial em função do tempo (t) em VPD: (A) em instrumentos analógicos, (B) em instrumentos digitais.....	20
Figura 12: Esquema de um microscópio de força atômica.....	21
Figura 13: Esquema representativo dos modos de operação em AFM: (a) modo contato, (b) modo não contato e (c) modo intermitente.....	22
Figura 14: Esquema de preparação do eletrodo de trabalho.....	24
Figura 15: Eletrodos utilizados neste trabalho: (a) eletrodo de grafite, (b) base de latão revestida por teflon, (c) eletrodo de referência $\text{Ag}_{(s)}/\text{AgCl}_{(s)}/\text{Cl}_{(aq)} (3,0 \text{ mol L}^{-1})$ e (d) eletrodo auxiliar de platina.....	28
Figura 16: Etapas de preparo do biossensor.....	33

Figura 17: Último ciclo de voltametria do eletrodo de grafite no eletrólito suporte $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, na velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} , 6 ciclos, na faixa de potencial de $-0,2$ a $+0,6V$	35
Figura 18: Último ciclo de voltametria do eletrodo de grafite em $HClO_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, após 4 varreduras de potencial entre $0,00$ e $+1,2V$, 50 mV s^{-1}	35
Figura 19: Redução eletroquímica por voltametria cíclica do OG na superfície do eletrodo de grafite, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH $7,4$, entre $0,00$ a $-1,50 V$, 10 ciclos, 50 mVs^{-1}	36
Figura 20: Voltamograma cíclico da primeira volta de redução do EG(a) e OG(b) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH $7,4$, 50 mV s^{-1} , na faixa de potencial de $0,00$ a $-1,50V$	37
Figura 21: Espectro de infravermelho com transformada de Fourier (A) do eletrodo de grafite (a), e do mesmo modificado com OG (b) e OGRE (c), B) Zoom do espectro do EG.....	38
Figura 22: Voltamogramas cíclicos do EG e do mesmo modificado com OGRE em $HClO_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, 50 mV s^{-1} , na janela de potencial de $0,00$ a $+0,85 V$	41
Figura 23: Voltamograma cíclico das superfícies: (a) EG, (b)EG/OG e (c)EG/OGRE em solução de $5,0 \text{ mmol L}^{-1} Fe(CN)_6^{3-/4-}$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl , a 50 mV/s	42
Figura 24: Microscopia de força atômica do EG (A), EG/OG(B) e EG/OGRE (C).....	43
Figura 25: Microscopia eletrônica de varredura do EG (A) e do mesmo modificado com OG (B) e OGRE (C) na magnitude de $35000x$	44
Figura 26: (A) Quantidade de ciclos do filme politiramina em $HClO_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, na janela de potencial de 0 a $+0,85V$, 50 mVs^{-1} . (B) Quantidade de carga anódica total referente ao número de ciclos da eletropolimerização.....	46
Figura 27: Eletropolimerização da tiramina $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em $HClO_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ sobre (A) EG, (B) EG/OGRE e (C) Primeira volta de varredura referente às letras A e B. Faixa de potencial de $0,00V$ a $+1,10V$, a 50 mV s^{-1} , 60 ciclos de varredura.....	47

Figura 28: (A)Voltamogramas cíclicos do EG (a), e do mesmo modificado com PTir (b) e com OGre/PTir (c), no eletrólito suporte HClO ₄ 0,5 mol L ⁻¹ livre de monômero, velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹ , na janela de 0,00 a 0,85V.(B) Quantidade de carga da varredura anódica referente ao EG modificado com PTir e com OGre/PTir.....	49
Figura 29: Espectro de infravermelho com Transformada de Fourier do EG modificado com PTir (a) e com OGre/PTir (b)	52
Figura 30: Mecanismo de eletropolimerização da tiramina.....	54
Figura 31: Voltamogramas cíclicos para EG, EG/PTir e EG/OGre/PTirem solução de Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} (5,0 mmol L ⁻¹) e KCl (0,1 mol L ⁻¹), 50mV/s, na janela de potencial de -0,15 V a + 0,6V, registro após 6 ciclos de varredura de potencial.....	55
Figura 32: Voltametrias cíclicas para o EG/PTir (A) e EG/OGre/PTir (B) em solução de HClO ₄ 0,5 mol L ⁻¹ , nas velocidade de varredura de 10 mVs ⁻¹ a 100 mVs ⁻¹	57
Figura 33: Razão <i>I_{pa}/I_{pc}</i> em função da velocidade de varredura para o do (■) pico anódico e do (▼)pico catódico EG/PTir (A) e EG/OGre/PTir (B).....	58
Figura 34: Dependência linear das correntes de picos anódico e catódico para o segundo pico da PTir (A) e OGre/PTir (B) em função da raiz quadrada da varredura de potencial.....	59
Figura 35: Δ <i>E_p</i> em função da velocidade de varredura em solução de HClO ₄ 0,5 mol L ⁻¹ do (■) pico anódico e do (▼)pico catódico para os eletrodos de EG modificados com PTir (A) e OGre/PTir (B).....	60
Figura 36: Variação do <i>E_p-E_{p2/2}</i> vs a velocidade de varredura em HClO ₄ 0,5 mol L ⁻¹ do (■) pico anódico e do (▼)pico catódico para os eletrodos modificados com EG/PTir.....	61
Figura 37: Variação do <i>E_p-E_{p2/2}</i> vs a velocidade de varredura em HClO ₄ 0,5 mol L ⁻¹ do (■) pico anódico e do (▼)pico catódico para os eletrodos modificados com EG/OGre/PTir.....	62
Figura 38: Imagens de microscopia de força atômica do EG/PTir (A) e EG/OGre/PTir (B).....	63

Figura 39: Imagens de microscopia eletrônica de varredura do EG/PTir (A) e EG/OGre/PTir (B) na magnitude de 35000x.....	64
Figura 40: Voltamograma de pulso diferencial do anti L-T3 sobre o EG/OGre/PTir em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , na janela de +0,15V a +1,2V.....	65
Figura 41: Variação da corrente em função da velocidade de varredura (A) e da amplitude (B) Todas as medidas foram realizadas descontando a linha de base.....	66
Figura 42: Variação da corrente em função da concentração de anticorpo (A) e do tempo de imobilização (B).....	67
Figura 43: Variação da corrente em função da concentração do pH de imobilização	68
Figura 44: Modelo sugerido da interação do anticorpo com a plataforma EG/OGre/PTir.....	69
Figura 45: Voltamograma de pulso diferencial do anti L-T3 (6,0 ng/ml) + BSA(5%) (a), anti L-T3 + BSA + L-T3 (b) e BSA + L-T3 (5,0 ng/mL) (c) sobre o EG/OGre/PTir em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,4, numa velocidade de varredura de 30 mV s ⁻¹ , com amplitude de pulso de 60 mV.....	70
Figura 46: Imagens de microscopia de força atômica do EG/OGre/PTir contendo os seguintes materiais biológicos: (A) Anti L-T3 (sonda), (B) Anti L-T3 + BSA (sonda + BSA) e (C) Anti L-T3 + BSA + L-T3 (sonda + BSA + alvo).....	71
Figura 47: Imagens de microscopia eletrônica de varredura do EG/OGre/PTir contendo os seguintes materiais biológicos: (A) Anti L-T3 (sonda), (B) Anti L-T3 + BSA (sonda + BSA) e (C) Anti L-T3 + BSA + L-T3 (sonda + BSA + alvo), na magnificação de 35000x.....	72
Figura 48: Voltamogramas de pulso diferencial do EG modificado com OGr/PTir após a adição de 20 µL de 6,0 ng/mL de anti L-T3, bloqueado com BSA 5,0% + 20 µL de L-T3 nas seguintes concentrações: 0,00 ng/mL, 0,001ng/mL, 0,005ng/mL, 0,05ng/mL, 0,25ng/mL, 0,5ng/mL e 5,0ng/mL, em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,4, 30 mVs ⁻¹ , amplitude de pulso de 60 mV.....	74
Figura 49: Curva de calibração da detecção do L-T3	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de referência para os hormônios tireoidianos.....	2
Tabela 2: Estrutura química de alguns polímeros condutores.....	15
Tabela 3: Bandas referentes ao espectro de infravermelho com Transformada de Fourier do EG, e do mesmo modificado com OG e OGre.....	40
Tabela 4: Valores de potencial e de corrente de pico do EG/PTir e EG/OGre/PTir.....	51
.	
Tabela 5: Bandas referentes ao espectro de infravermelho com Transformada de Fourier do EG/PTir e EG/OGre/PTir.....	53
Tabela 6: Valores de corrente e de potencial de pico do EG e do mesmo modificado com PTir e com OGre/PTir.....	56
Tabela 7: Valores de rugosidade.....	72

Resumo

Neste trabalho foi desenvolvido uma plataforma funcionalizada com o nanocompósito polimérico óxido de grafeno reduzido/politiramina (OGre/PTir) sobre eletrodo de grafite (EG), para detecção de L-triiodotironina (L-T3), um dos hormônios tireoidianos. A plataforma EG/OGre/PTir foi caracterizada por meio de voltametria cíclica, AFM, MEV e por FT-IR. Após a caracterização, o anticorpo foi imobilizado na superfície da matriz EG/OGre/PTir e foram padronizadas as melhores condições para a imobilização da sonda, tais como: concentração, tempo de interação da sonda com a plataforma e pH, obtendo-se os seguintes valores: 6,0 ng mL⁻¹; 45 minutos e 7,46 respectivamente. Para bloqueio da superfície, utilizou-se solução de BSA a 0,5% e, logo após o alvo L-T3 foi gotejado na superfície do eletrodo. A detecção direta do anti L-T3 e do L-T3 foi realizada por meio de voltametria de pulso diferencial. Foi possível observar que o alvo (L-T3) é eletroativo na plataforma desenvolvida, apresentando um pico de oxidação em 0,6 V de pequena intensidade de corrente. Quando o L-T3 interage com a sonda, formando o complexo anticorpo-antígeno, ocorre um deslocamento de potencial para 0,7 V e, simultaneamente, ocorre um aumento de intensidade de corrente elétrica, indicando que realmente houve a interação. Foi construída uma curva de calibração, com faixa linear de resposta de 0,001ng mL⁻¹ a 5,0 ng mL⁻¹ de L-T3, com $R^2 = 0,997342$. O biossensor foi caracterizado morfológicamente por meio de imagens de AFM e MEV. Foi possível observar que houve mudanças morfológicas à medida que se adicionou a sonda, BSA e alvo (L-T3) sobre a plataforma EG/OGre/PTir. Estes resultados são promissores no desenvolvimento do imunossensor, uma vez que a concentração de analito detectada, que foi de 0,001ng mL⁻¹, é menor do que a concentração do hormônio (L-T3) existente no sangue humano ($[L-T3_{total}] = 0,6 \text{ ng mL}^{-1}$ a $1,81 \text{ ng mL}^{-1}$).

Palavras-chave: Óxido de grafeno reduzido, politiramina, nanocompósito, eletropolimerização, imunossensor, L-triiodotironina, tireoide.

Abstract

In this work was developed a functionalized polymer nanocomposite platform with reduced graphene oxide/poly-tyramine (rGO/Poly-Tyr) deposited on graphite electrode to L-triiodothyronine detection (L-T3), a thyroid hormone. Initially, the GE/rGO/Poly-Tyr electrochemically platform was characterized by cyclic voltammetry, morphologically by AFM and SEM images and by FT-IR. After characterization, the antibody was immobilized on the surface of the matrix GE/ rGO/ Poly-Tyr and were standardized optimum conditions for immobilization of the probe, such as concentration, probe interaction time with the platform and pH, giving the following values: 6.0 ng mL^{-1} ; 45 minutes and 7.46 respectively. For blocking surface BSA solution was used at 0.5% and, after the L-T3 target was dripped on the electrode surface. The direct detection of anti L-T3 and L-T3 was performed by differential pulse voltammetry. It was observed that the target (L-T3) is electroactive in the platform developed, showing an oxidation peak at 0.6 V of low intensity current. When the L-T3 interacts with the probe, forming the antibody-antigen complex, a potential shift occurs at 0.7 V, and simultaneously there is an increase in intensity of electrical current, indicating that there was indeed the interaction. A calibration curve was constructed with linear response range of 0.001 ng mL^{-1} to 5.0 ng mL^{-1} L-T3, with $R^2 = 0.997342$. The biosensor was characterized morphologically by AFM and SEM images. It was observed that there were morphological changes as it added the probe, BSA and target (L-T3) on the EG / ogra / PTir platform. These results are promising in the development of the immunosensor, once the analyte concentration detected, which was 0.001 ng/mL is lower than the concentration of hormone (L-T3) exists in human blood ($[\text{L-T3}_{\text{total}}] = 0.6 \text{ ng mL}^{-1}$ to 1.81 ng mL^{-1}).

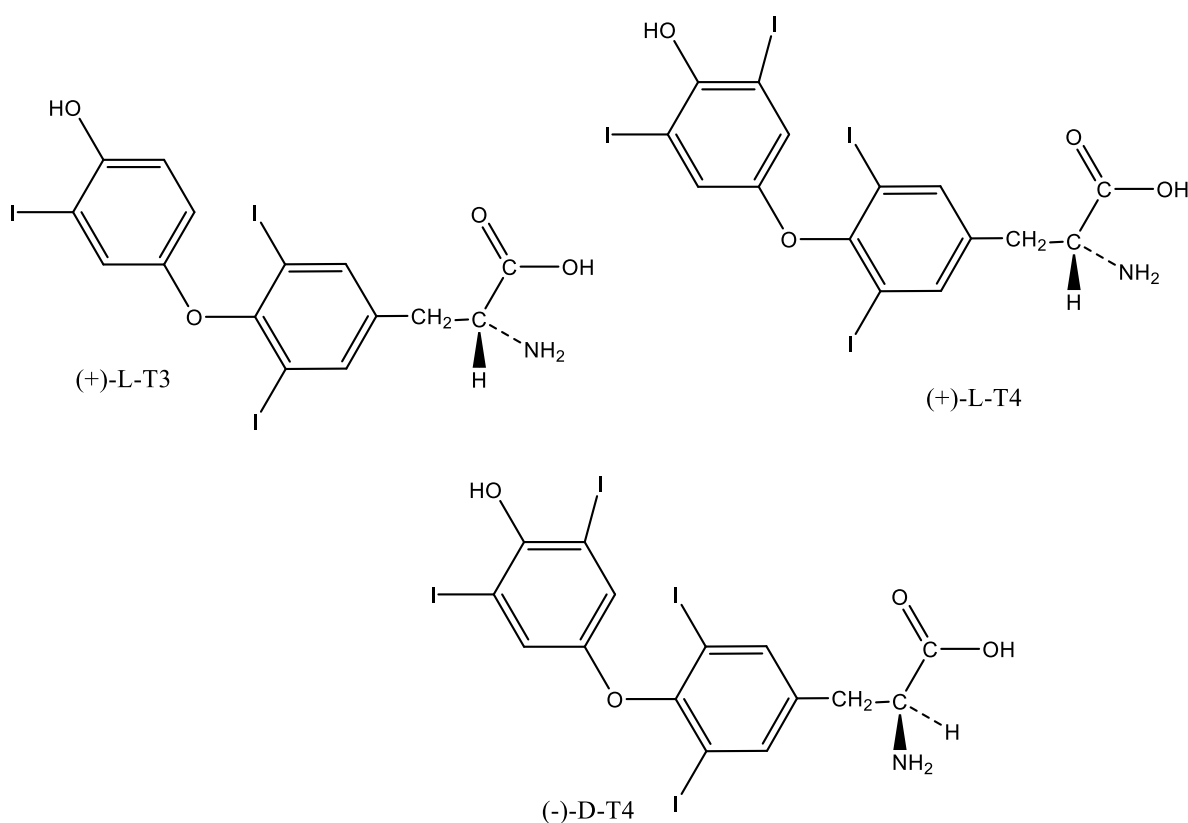
Keywords: reduced graphene oxide, poly-tyramine, nanocomposite, electropolymerization, immunosensor, L-triiodothyronine, thyroid.

INTRODUÇÃO

1.1. Hormônios tireoidianos

A glândula tireoide humana consiste em dois lóbulos localizados sobre a traqueia que são conectados por uma fina membrana denominada istmo. Ela normalmente pesa cerca de 20 gramas e produz os hormônios L-tetraiodotironina e L-triiodotironina mostrados na figura 1, em resposta ao hormônio estimulante da tireoide (TSH)¹.

Figura 1: Configuração absoluta dos hormônios (+)-T3, (-)-D-T4 e (+)-L-T4



Fonte: Hassan, 2002.

Os hormônios tireoidianos (HT) são regulados fisiologicamente pelo hipotálamo, hipófise, tireoide e atividade neural. O hormônio estimulante da tireoide, sintetizado e liberado pela hipófise anterior, se une ao receptor de membrana da tireoide e estimula a síntese e a secreção dos HTs a partir da tireoglobulina. Já a síntese e a liberação do TSH

são sinalizadas pelo hormônio liberador de tireotrofina (TRH), que é secretado pelo hipotálamo¹.

As concentrações de TSH e de TRH são controladas pelo mecanismo de feedback negativo, onde os níveis plasmáticos de L-T4 e L-T3 atuam sobre a hipófise e hipotálamo, inibindo assim a produção e liberação de TSH e TRH. Tal mecanismo é importante para manter os níveis circulantes de L-T4 e L-T3 dentro da faixa normal^{1,3}.

No funcionamento adequado da glândula tireoide, ocorre à produção de 28 a 50 µg de L-T3 e 90 µg de L-T4 diariamente. Aproximadamente 90% de L-T3 presente na circulação sanguínea é formado pela desiodinação de L-T4 nos tecidos periféricos. Esta conversão periférica de L-T4 para L-T3 e a observação da alta atividade metabólica de L-T3, indicam que o L-T3 provavelmente é o principal hormônio ativo da tireoide³. O hormônio T4 (tiroxina) existe como enantiômeros que possuem efeitos terapêuticos diferentes. A L-tiroxina (L-T4) é utilizada principalmente como repositor hormonal em pacientes com hipotireoidismo, enquanto D-Tiroxina é utilizada no controle de colesterol⁴. A tabela 1 mostra os valores de referência para L-T3 e L-T4⁵.

Tabela 1: Valores de referência para os hormônios tireoidianos

	¹ Valores normais
Tiroxina total (L-T4)	0,048 µg/mL a 0,1 µg/mL
Triiodotironina total (L-T3)	0,6 ng/mL a 1,81 ng/mL
L-T4 livre	0,008 ng/mL a 0,027 ng/mL
L-T3 livre	2,30 pc/mL a 4,20 pg/mL

¹Os resultados podem variar em laboratórios diferentes.

Fonte: Katzung, 2014.

Quando estes hormônios se encontram fora do intervalo de normalidade, pode acarretar uma série de complicações. As principais enfermidades causadas pela disfunção tireoidiana são: hipotireoidismo, hipertireoidismo, nódulos tireoidianos, bócio, câncer e tireoidite. O hipertireoidismo é uma doença que acomete na sua maior parte mulheres na faixa etária de 40-60 anos de idade. Nesta doença, ocorre uma grande estimulação da glândula e, em virtude disso, as concentrações hormonais de T3 (3,5,3'- triiodotironina) e T4(tiroxina) estão aumentadas no organismo do indivíduo, ocasionando nervosismo, sudorese, hipersensibilidade ao calor e taquicardia e, se não tratada, pode levar a morte. Já o hipotireoidismo pode ser causado pelo desaparecimento do tecido da tireoide

provocado por um processo patológico destrutivo ou interferência terapêutica, ou pela estimulação insuficiente da glândula pelo TSH. Desta forma, ocorre uma diminuição dos hormônios T3 e T4 fazendo com que o indivíduo apresente fraqueza, letargia, pele seca e áspera e lentidão na fala^{6,7}.

Estes hormônios têm ação praticamente sobre todos os órgãos do organismo humano. Entretanto, quando estes hormônios estão desbalanceados, podem ocorrer sérias complicações como delírio, insônia, anorexia, osteoporose, fraqueza muscular, fibrilação atrial, insuficiência cardíaca congestiva, tromboembolismo, estado mental alterado, colapso cardiovascular e morte⁸.

1.2. Técnicas de quantificação de hormônios

No imunoensaio por quimioluminescência, o material biológico onde se encontra o analito de interesse é incubado com o anticorpo de fase sólida e o anticorpo de fase líquida, marcado com uma substância quimioluminescente. Logo após é feita uma lavagem para a retirada do material não ligado. É adicionado um reagente “disparador” que provoca a emissão de luz, no qual é proporcional à concentração de analito (antígeno) presente na amostra, sendo quantificado por um detector de luz⁹.

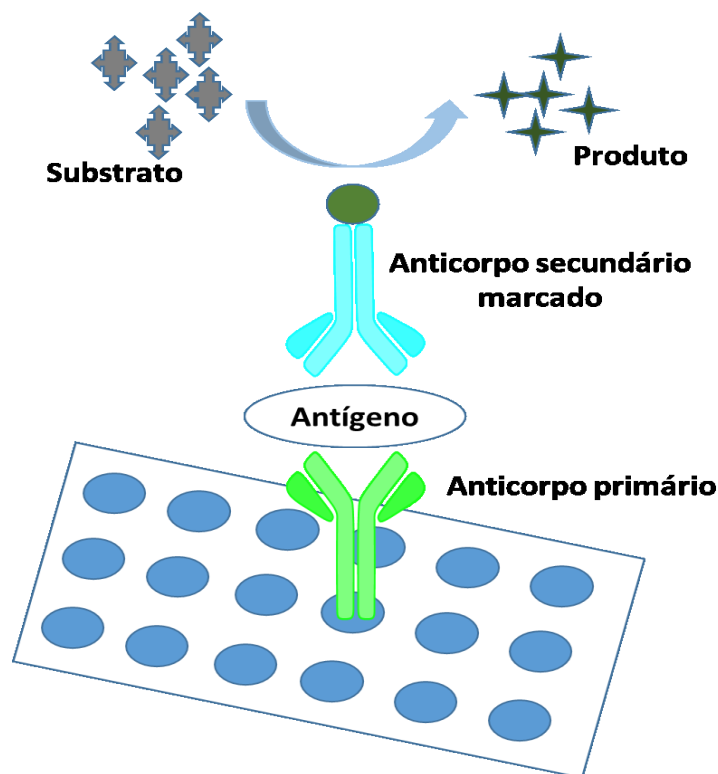
O luminol e o isoluminol foram os primeiros compostos com propriedades quimioluminescentes a serem empregados nos imunoensaios, existindo outros compostos com as mesmas características, como os ésteres de acridina e sulfonamida. Tais compostos reagem com uma solução alcalina de peróxido de hidrogênio e fosfatase alcalina. Um dos reagentes que “disparam” a reação é o éster fosfatado do adamantildioxetano⁹.

O radioimunoensaio (RIA) utiliza reagentes que incorporam radioisótopos como marcadores para monitorar a distribuição de antígeno livre ou de antígeno ligado ao anticorpo. Potencialmente, RIA é aplicado para mensurar muitas substâncias presentes no meio biológico, numa concentração de 10^{-6} a 10^{-14} mol L⁻¹. A alta precisão encontrada no imunoensaio radiomarcado está relacionada ao processo de decaimento dos radioisótopos no qual não é afetado por fatores comuns aos meios biológicos, tais como pH, força iônica e inibidores que podem afetar a detecção nos métodos dependentes em medições ópticas ou enzimáticas. Embora o radioimunoensaio seja confiável e exato, ele oferece risco à saúde e os radioisótopos apresentam tempo de meia vida curto, que restringem o uso desta tecnologia¹⁰.

Os ensaios imunoenzimáticos possibilitam medidas quantitativas diretas da interação antígeno-anticorpo por meio da atividade enzimática sobre um substrato. As enzimas são marcadores biológicos muito utilizados e apresentam vantagens de não apresentarem riscos associados com a exposição de radioisótopos, bem como a possibilidade de amplificação catalítica, ou seja, uma única enzima pode gerar várias espécies detectáveis, e ainda, pode-se associar a outros marcadores como os fluorescentes e os quimioluminescentes, resultando num baixo limite de detecção¹¹.

O teste mais comum envolvendo enzima-imunoensaio é o teste de ELISA (Figura 2). Este método utiliza anticorpos imobilizados em uma placa de poliestireno com o número variável de poços de ensaio. Este teste é realizado em 8 passos: ativação da placa, lavagem, imobilização de anticorpos, lavagem, incubação, lavagem, adição de substrato cromogênico e leitura óptica dos poços. Este sistema de placa permite a realização do ensaio garantindo uma uniformidade de todas as etapas¹¹.

Figura 2: Esquema do teste de ELISA



Fonte: Autor, 2016

As técnicas existentes para detecção dos hormônios, como Imunoensaio por quimioluminescência, imunoensaio por fluorescência polarizada, enzima imunoensaio, ensaio imunoabsorção ligado à enzima (ELISA) e radioimunoensaio, dependem de mão de obra especializada, requerem um preparo de amostra e demandam de um maior tempo de análise¹².

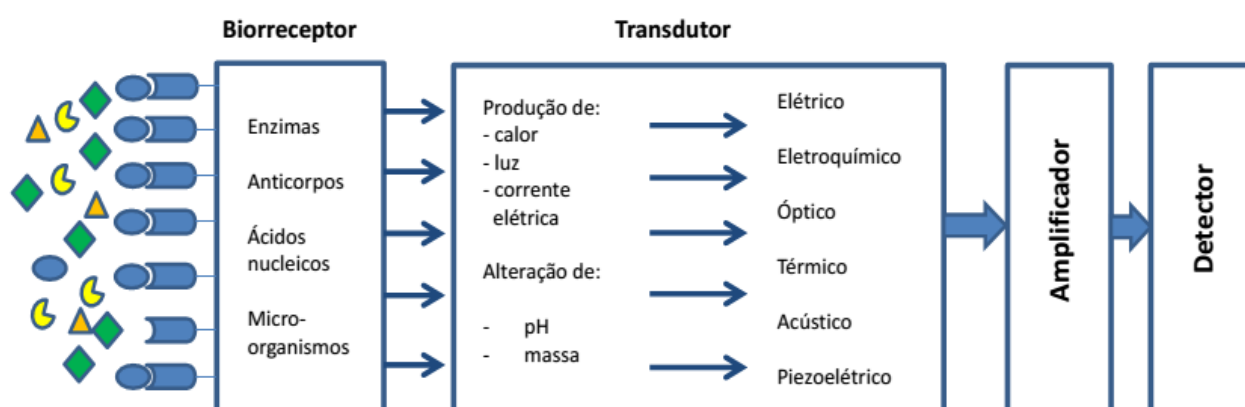
Desta forma, torna-se fundamental o desenvolvimento de uma metodologia para detecção de hormônios tireoidianos, que seja de baixo custo, que efetue análise em tempo real e ao mesmo tempo, seja sensível. Neste enfoque surgem os biossensores como proposta.

1.3. Biossensores

Biossensores são dispositivos analíticos compostos por uma camada de reconhecimento biológico imobilizado sobre um transdutor. O receptor biológico é uma biomolécula que reconhece o analito alvo e o transdutor converte o evento de reconhecimento para um sinal mensurável¹³.

O sinal do transdutor (eletroquímico, óptico, gravimétrico, por ressonância plasmônica, piezoelétrico, etc) é convertido em um sinal elétrico, indicando a detecção do analito de interesse¹⁴. A figura 3 mostra o esquema de um biossensor.

Figura 3: Esquema representativo de um biossensor



Fonte: Autor, 2016

As principais vantagens da utilização destes dispositivos são devidas à alta especificidade, sensibilidade, seletividade e apresentam rápida detecção do analito em interesse¹⁵. Eles são extensivamente utilizados em aplicações nas áreas da saúde, ambiental e alimentos. Devido à sua alta sensibilidade e especificidade, os biossensores apresentam um elevado potencial de aplicação na detecção de vírus, bactérias, DNA, antígeno e anticorpo¹⁶.

A maior parte dos biossensores reportados na literatura são eletroquímicos ou ópticos. Os biossensores eletroquímicos são baseados na interação seletiva entre o analito alvo e o elemento de reconhecimento, no qual pode gerar um sinal elétrico que está relacionado à concentração da substância a ser mensurada. Os principais biossensores eletroquímicos são: potenciométricos, amperométricos, voltamétricos e impedimétricos¹⁷. Os biossensores ópticos são outra subclasse importante de biossensores em que o transdutor óptico responde ao analito por sofrer uma mudança em suas propriedades ópticas, tais como a absorção, reflectância e emissão de fluorescência¹⁸.

Os biossensores também podem ser classificados de acordo com o elemento de reconhecimento biológico imobilizado na superfície do transdutor. As principais classes existentes são: genossensores, biossensores enzimáticos, biossensores microbiológicos e imunossensores¹⁹.

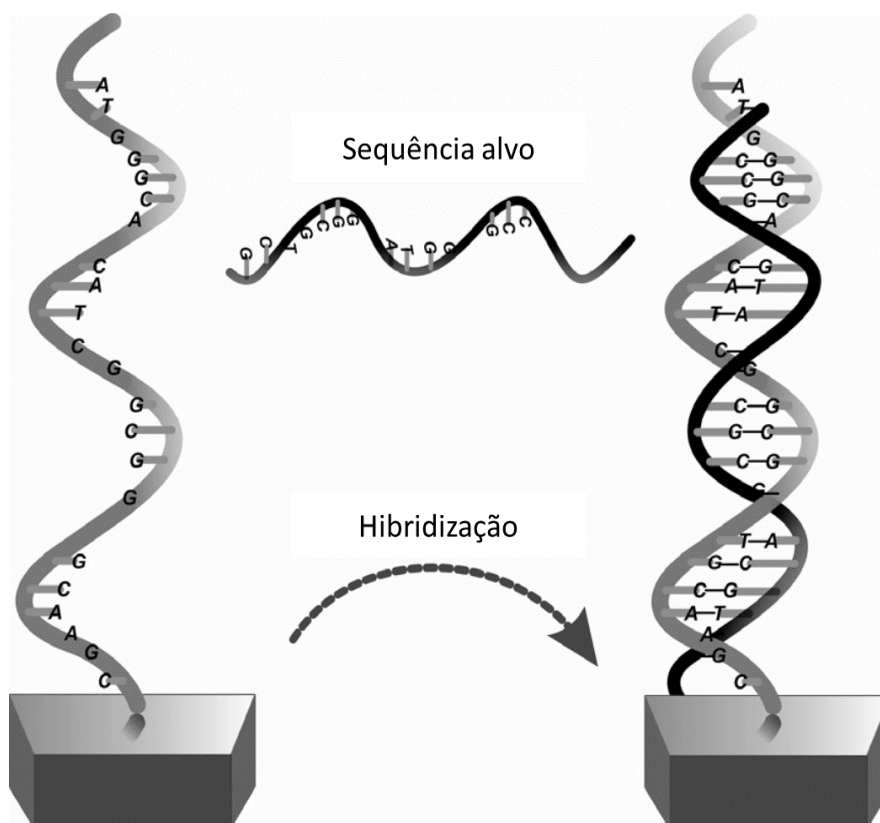
1.3.1. Genossensores

O desenvolvimento de genossensores têm atraído atenção considerável devido às suas potenciais aplicações, incluindo análise de genes, diagnóstico clínico, estudo forense, entre outros¹².

Os genossensores são dispositivos analíticos que possuem ácidos nucleicos de cadeia simples imobilizados na superfície de um transdutor. O reconhecimento ocorre após a hibridização da fita simples com a sua fita complementar, numa amostra através da formação de ligações de hidrogênio²⁰.

Estes dispositivos podem ser explorados para monitorar a hibridização específica por meio da mensuração do sinal de oxidação de bases eletroativas presentes no DNA. A figura 4 mostra um esquema do processo de hibridização em um genossensor¹².

Figura 4: Esquema do processo de hibridização em um genossensor.



Fonte: Dolatabadi, 2011

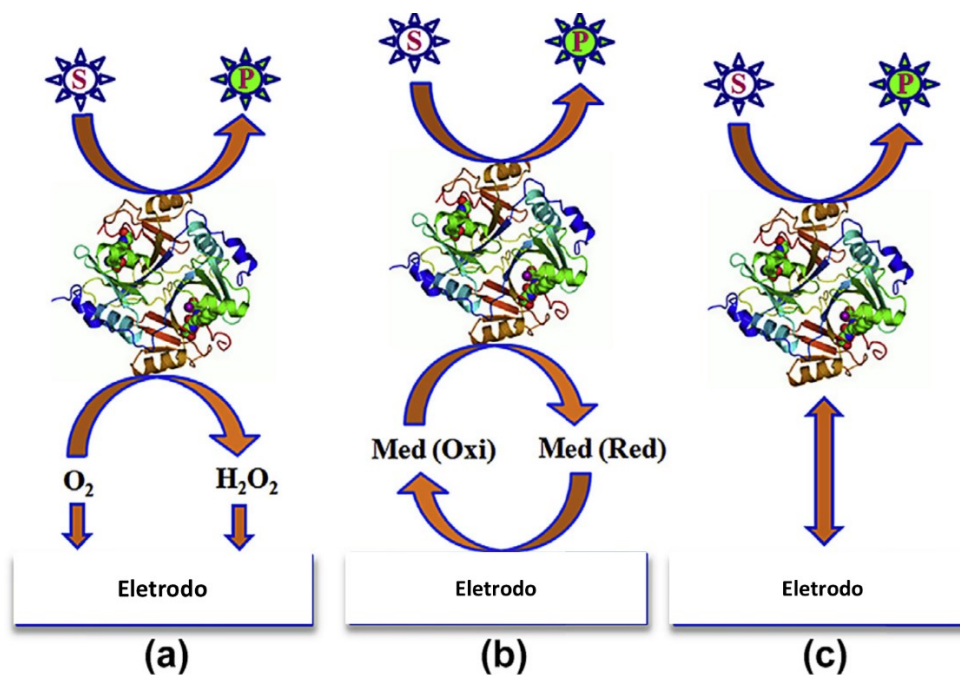
1.3.2. Biossensores enzimáticos

Os biossensores enzimáticos fundamentam-se na imobilização de enzimas na superfície do eletrodo e são divididos em dois tipos de acordo com a interação entre a enzima e o analito: (1) se a enzima metaboliza o analito, a concentração do mesmo pode ser mensurada através da transformação catalítica do analito pela enzima imobilizada, (2) se a atividade enzimática é inibida pelo analito, a detecção é feita através da monitoração da diminuição do produto enzimático formado¹⁸.

Os biossensores podem ser divididos em três gerações dependendo da forma que a molécula biorreceptora esteja à base do elemento de transdução. As três gerações de biossensores estão esquematicamente representados na figura 5¹².

Na primeira geração de biossensores, o acoplamento entre a enzima e eletrodo não ocorre por transferência direta de elétrons, mas se baseia na eletroatividade do substrato ou do produto da reação enzimática. Biossensores de segunda geração utilizam um mediador específico entre a reação de interesse e o transdutor para melhorar a sensibilidade. Isso envolve a adsorção ou ligação covalente do componente biologicamente ativo à superfície do transdutor e permite a eliminação da membrana semipermeável. Já nos biossensores de terceira geração existe uma ligação direta entre a biomolécula de reconhecimento biológico e o transdutor. Desta forma, a molécula biorreceptora torna-se parte integrante do biossensor ¹².

Figura 5: Representação esquemática de biossensores de (a) primeira, (b) segunda e (c) terceira geração.



Fonte: Karunakaran, 2015

1.3.3. Biossensores microbiológicos

Nos biossensores microbiológicos, a imobilização de células microbiológicas ocorre sobre a superfície de um transdutor e, seu modo de funcionamento baseia-se no uso das funções metabólicas e respiratórias do microorganismo para fazer detecção do analito, seja em substrato ou um inibidor do processo em questão. As principais

aplicações dos biossensores microbiológicos são no monitoramento ambiental, fermentação e uso em alimentos²².

1.3.4. Imunossensores

Os imunossensores são biossensores que se fundamentam na resposta imunológica entre um antígeno (Ag) – anticorpo (Ac), onde um dos dois se encontram imobilizados na superfície de um transdutor²³.

Eles podem ser classificados como diretos ou indiretos, o que significa que o mecanismo de detecção opera diretamente através da interação antígeno/anticorpo, ou é utilizado um marcador adicional, tal como uma enzima ou uma molécula fluorescente, para detectar se ocorreu um evento de ligação ou não²⁴.

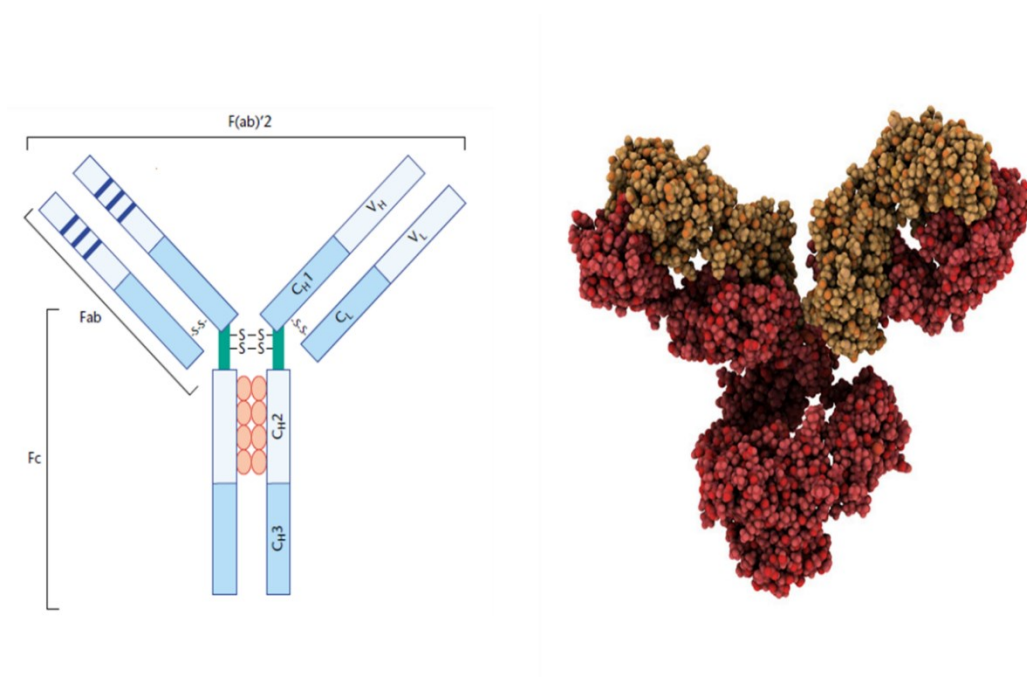
Com base na natureza da transdução do sinal, os imunossensores podem ser classificados como imunossensores eletroquímicos, ópticos e piezoelétricos¹².

1.3.4.1 Anticorpos como elemento de reconhecimento

Anticorpos são proteínas plasmáticas globulares (150 kDa) produzidos por mamíferos como uma resposta imunitária do organismo na presença de antígenos, tais como vírus, bactérias e parasitas. Os anticorpos também chamados de imunoglobulinas podem ser classificados em cinco grupos: IgG, IgM, IgA, IgE e IgD. Imunoglobulina G (IgG) é a espécie mais abundante presente no soro, e também a mais utilizada em aplicações de imunossensores¹².

A figura 6 mostra a representação esquemática de um anticorpo da classe IgG. Eles são glicoproteínas que apresentam quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas cadeias pesadas (C_H) formadas por 450 aminoácidos (55000 Da) e duas cadeias leves (C_L) contendo 212 aminoácidos (25000 Da) unidos entre si através da ligação dissulfeto²⁵. A cadeia leve (C_L) é composta por um domínio variável (V_L) e um domínio constante (C_L). A cadeia pesada (C_H), as cadeias γ , δ e α consiste num domínio variável e três domínios constantes C_{H1} , C_{H2} e C_{H3} respectivamente²⁶.

Figura 6: Representação da estrutura de um anticorpo



Fonte: Zouali, 2001

No imunoensaio, o anticorpo interage com o seu antígeno específico, formando um complexo antígeno-anticorpo, mostrado na equação 1, no qual apresenta uma alta constante de afinidade, K_a . Esta constante é definida pelas concentrações do complexo antígeno/anticorpo (AgAc), do antígeno livre (Ag) e dos sítios livres do anticorpo (Ac), como é mostrada na equação 2²⁷.

Equação 1:



Equação 2:

$$K_A = \frac{[AcAg]}{[Ac] [Ag]}$$

Os valores da constante de afinidade na ordem de 10^4 a 10^{12} exibem grande estabilidade, ocasionando a alta sensibilidade nos imunossensores²⁷.

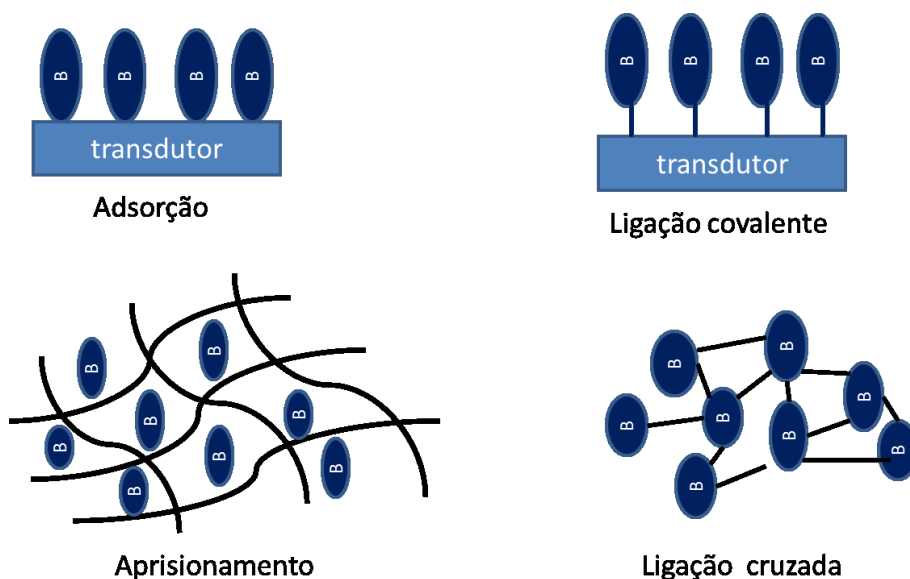
1.4. Técnicas de imobilização

Um dos passos primordiais na construção de um biossensor é a imobilização eficaz do material de reconhecimento biológico na superfície do transdutor, mantendo-se ao máximo a atividade da biomolécula e evitando que a mesma seja lixiviada. Os principais métodos de imobilização são: adsorção física, ligação covalente, imobilização por aprisionamento e imobilização por ligação cruzada²⁸.

No método de adsorção física, a solução contendo a biomolécula é colocada em contato com a superfície do eletrodo modificado com filme polimérico. O material biológico se mantém adsorvido fisicamente devido às interações de Van der Waals e ligações de hidrogênio entre a matriz polimérica e o componente biológico. A desvantagem deste método de imobilização está vinculada às condições experimentais tais como o pH, temperatura e força iônica²⁹.

Na utilização do método de ligação covalente, a biomolécula se liga covalentemente ao transdutor. Esta ligação é feita por meio de grupos funcionais presentes nas cadeias laterais de aminoácidos de proteínas, tais como grupos amino, carboxílicos, ou tióis, os quais são utilizados para acoplamento na superfície do eletrodo modificado³⁰. A figura 7 mostra uma ilustração dos principais tipos de imobilização de biomolécula.

Figura 7: Representação esquemática dos tipos de imobilização



Fonte: Autor, 2016

Na ligação cruzada, ocorre a ativação da superfície utilizando reagentes multifuncionais como o glutaraldeído ou carbodiimida, seguido do acoplamento do material biológico ao suporte ativado³¹. No método de imobilização por aprisionamento, o biocomponente se encontra preso dentro da malha polimérica. Este resultado é obtido quando se mistura a solução monomérica com a solução da biomolécula de reconhecimento. À medida que o processo de eletropolimerização ocorre, as biomoléculas que se encontram nas proximidades do eletrodo vão sendo incorporadas dentro da malha polimérica ficando retidas no mesmo^{29, 31}.

1.5. Funcionalização dos eletrodos

A fim de sensibilizar a superfície dos eletrodos para a imobilização de materiais biológicos no desenvolvimento de biossensores, materiais à base de grafeno e derivados, juntamente com filmes poliméricos têm sido utilizados para modificação dos mesmos. Estes materiais são interessantes, pois elevam a área superficial do eletrodo, aumentando a sensibilidade do sistema, além de apresentarem grupos funcionais expostos que facilitam a incorporação do material biológico.

1.5.1. Grafeno e seus derivados

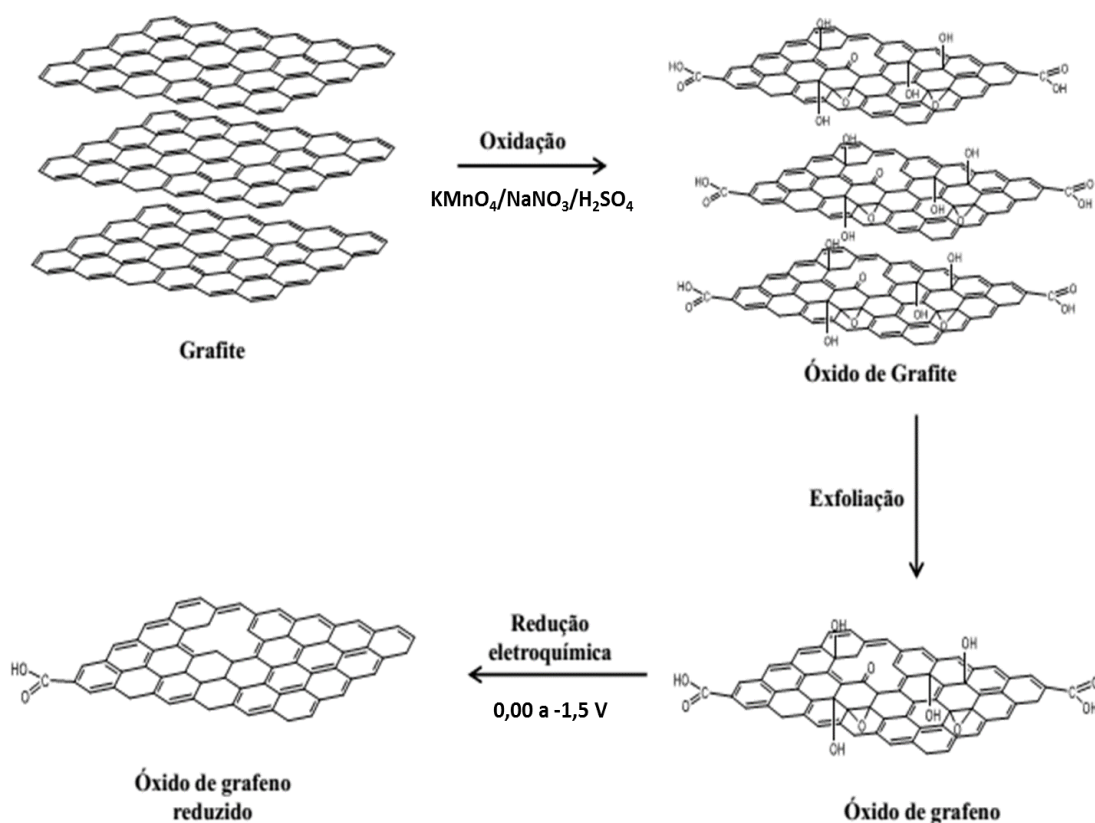
O grafeno é um alótropo do carbono, que consiste em uma monocamada plana de átomos de carbono híbridos em sp^2 . Esta configuração fornece propriedades extraordinárias a este material, como uma grande área superficial, teoricamente de $2630 \text{ m}^2/\text{g}$ para uma única camada, apresentando também excelente condutividade térmica ($K = 5 \times 10^3 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$) e condutividade elétrica³². Devido a estas características promissoras, o grafeno pode ser utilizado em vários domínios tecnológicos como na nanoeletrônica, sensores, biossensores, nanocompósitos, baterias, supercapacitores e armazenamento de hidrogênio³³.

Os métodos convencionais de produção de grafeno consistem no crescimento de grafeno por deposição química a vapor, na exfoliação mecânica do grafite, oxidação química de grafite para geração de óxido de grafite seguido de exfoliação. Este terceiro método é o mais utilizado na síntese de derivados de grafeno por produzir uma maior quantidade de material³⁴.

Este procedimento envolve tipicamente a oxidação de grafite por uma mistura de ácido nítrico e de oxidantes fortes, como KClO_3 ou KMnO_4 , que origina o óxido de grafite. A estrutura do óxido de grafite consiste em camadas de grafite com um aumento significativo do espaço entre as suas camadas, que é devido à presença de grupos funcionais de oxigênio sobre os planos basais da folha individual de grafeno. O óxido de grafite por sua vez é submetido a um tratamento térmico para exfoliação, produzindo assim o óxido de grafeno (OG)³⁵.

O OG é um derivado do grafeno, que contém na sua estrutura grupos funcionais de oxigênio, tais como epóxidos, hidroxilas, carboxilas e grupos carbonilas localizados nas bordas e planos basais. Assim, o OG pode ser prontamente disperso em água e formar uma suspensão coloidal estável devido à sua forte hidrofilicidade. Tais características facilitam a fabricação de nanocompósitos com polímeros baseados em OG³⁶. A figura 8 ilustra as etapas de preparo do OGRE a partir do grafite.

Figura 8: Etapas de obtenção de óxido de grafeno a partir de grafite



Fonte: Autor, 2016

Os métodos mais comuns de preparo do óxido de grafeno reduzido empregam a exfoliação do óxido de grafite. Posteriormente, a redução ocorre por um tratamento térmico ou pela redução química utilizando agentes redutores. Embora estes métodos sejam adequados para produção em massa de OGRE, as suas desvantagens também são evidentes: o tratamento térmico exige equipamentos específicos para o controle das condições de preparo, como o vácuo e calor, enquanto a redução química geralmente utiliza reagentes redutores perigosos tais como borohidreto de sódio, hidrazina ou hidretos de alumínio³⁷.

Desta forma, a metodologia eletroquímica torna-se interessante como alternativa para a redução do OG, pois é mais rápida e não utiliza solventes tóxicos, evitando a contaminação do produto final. Neste método, o elevado potencial negativo aplicado no eletrodo vence as barreiras de energia para a redução dos grupos funcionais de oxigênio, como $-OH$ e $C-O-C$, reduzindo eficazmente o OG³³.

1.5.2. Polímeros condutores

Polímeros condutores (PCs) são classificados como materiais que possuem uma alta conjugação π na sua cadeia polimérica, exibindo propriedades eletrônicas de metais e semicondutores associados com as propriedades mecânicas de macromoléculas orgânicas. O interesse de pesquisadores em polímeros eletroativos começou em 1977 quando foi sintetizado o poliacetileno, polímero altamente condutor e, eventualmente, Heeger, Shirakawa e MacDiarmid que foram agraciados com o Prêmio Nobel de Química em 2000 pela descoberta e desenvolvimento dos chamados polímeros condutores³⁸.


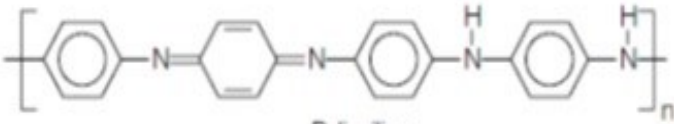
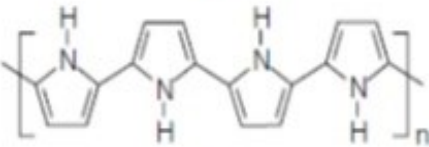
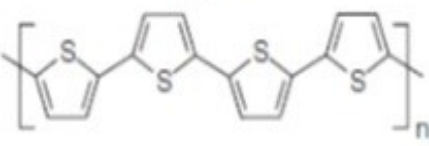
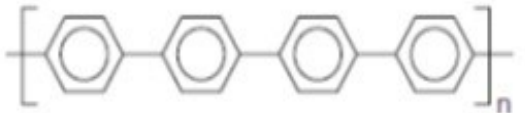
Eles têm atraído cada vez mais atenção devido às suas propriedades elétricas que são semelhantes às dos metais, possuindo também algumas características de polímeros orgânicos. Além disso, podem ser preparados de forma a serem aplicados em diferentes áreas. Os PCs podem ser utilizados como transistores de película fina, baterias, revestimentos anti-estáticos, em blindagem eletromagnética, músculos artificiais, diodos emissores de luz, biossensores, enchimentos e revestimentos protetores de corrosão³⁸.

PCs com diferentes estruturas químicas, como a polianilina (PANI), polipirrol, politiofeno, poli (p-fenileno), poli (fenilenovinileno) foram estudados extensivamente por pesquisadores e suas estruturas químicas são mostradas na tabela 2³⁹.

Estes materiais possuem propriedades eletroquímicas incomuns como alta condutividade elétrica, baixo potencial de ionização e alta afinidade eletrônica. Estas

propriedades são decorrentes da sua estrutura de elétrons π conjugados ao longo da cadeia polimérica⁴⁰.

Tabela 2: Estrutura química de alguns polímeros condutores

Polímero condutor	Condutividade / S cm ⁻¹
 Poliacetileno	10 ³ a 10 ⁶
 Polianilina	10 a 10 ³
 Polipirrol	600
 Politiofeno	200
 Poli(p-fenileno)	500

Fonte: Faez, 2000.

A condutividade eletrônica é oriunda da deslocalização de elétrons π ao longo da cadeia polimérica e também devido à presença de pólarons e bipólarons. Os polímeros condutores são sintetizados na forma oxidada e, apenas na presença do dopante (uma carga negativa/ânion na maioria dos casos), que a estrutura é estabilizada e a carga neutralizada. Paralelamente a isto, o dopante apresenta um portador de carga para este sistema, removendo ou adicionando elétrons na cadeia polimérica e delocalizando-os como pólarons e bipólarons (elétrons rodeados por uma distorção da rede cristalina).

Como o potencial elétrico é aplicado durante a síntese eletroquímica, os dopantes começam a mover-se dentro ou fora do polímero (dependendo da polaridade), permitindo a carga passar através do polímero em forma de pólarons e bipólarons acima mencionados²⁹.

Os polímeros condutores podem ser sintetizados por via química ou por via eletroquímica.

1.5.3. Síntese química

A síntese química é mais antiga e a rota mais popular para a preparação de grandes quantidades de polímeros condutores. A polimerização química utiliza fortes oxidantes químicos, tais como KIO_3 , KMnO_4 , FeCl_3 , K_2CrO_4 , KBrO_3 , KClO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$. Estes compostos são capazes de oxidar os monômeros em solução, que conduzem à formação de radicais. Estes por sua vez, reagem ainda com outros monômeros, oligômeros ou até mesmo polímeros insolúveis⁴².

A estrutura e as propriedades químicas e físicas dos polímeros obtidos dependem fortemente das propriedades do agente oxidante, a razão molar entre oxidante e monômero, o eletrólito, pH e a temperatura²⁹.

1.5.4. Síntese eletroquímica

A técnica eletroquímica tem recebido maior atenção por causa de sua simplicidade e a vantagem de se obter simultaneamente polímeros condutores dopados. Além disso, o processo de polimerização eletroquímica assegura o controle da espessura do filme, bem como a sua morfologia, e ainda fornece uma escolha mais ampla de cátions e de ânions como íons dopantes para a malha polimérica³⁹.

No geral, o método de oxidação química produz polímeros condutores com um maior rendimento enquanto que a síntese eletroquímica leva a deposição de camada de filmes poliméricos sobre a superfície do eletrodo devido à oxidação do monômero. Quando um potencial positivo é aplicado ao eletrodo de trabalho, a oxidação começa com a formação do cátion radical. Os cátions radicais, por sua vez, se acoplam, de modo a se formar em primeiro lugar o dímero. A extensão de conjugação no polímero resulta num abaixamento do potencial de oxidação em comparação com o monômero. A oxidação eletroquímica e o processo de acoplamento de radical são repetidos continuamente e,

finalmente, o filme polimérico é depositado sobre a superfície do eletrodo de trabalho. A dopagem do polímero é geralmente realizada simultaneamente pela incorporação do ânion dopante no polímero para assegurar a neutralidade elétrica do filme⁴⁰.

Eletrodos modificados eletroquimicamente com filmes poliméricos que apresentam várias funções orgânicas, como por exemplo, poliaminofenóis^{43,44}, poli(ácido hidroxifenilacético)⁴⁵, politiramina^{46,47}, poli(ácido hidroxibenzóico)⁴⁸ e poli(ácido fenilacético)⁴⁹, possibilitam o uso de filmes catiônicos e aniônicos para a incorporação de biomoléculas e desenvolvimento de biossensores⁴³, os quais têm sido extensivamente estudados pelo Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia – LAFIP.

Estudos anteriores indicam que monômeros contendo grupos aromáticos ligados diretamente ao oxigênio são mais fáceis de polimerizar, apresentam alta reprodutibilidade e resistência mecânica da película obtida, permitindo maior estabilidade aos eletrodos quimicamente modificados⁴⁷.

1.5.4.1. Tiramina

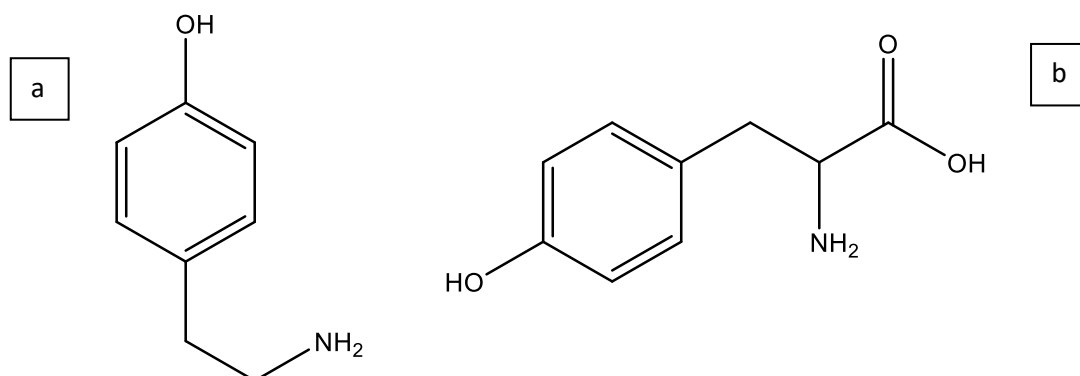
A tiramina [4-(2-aminoetil)fenol], é um monômero que tem atraído muito a atenção de pesquisadores devido ao fato de possuir um grupo amino livre que possibilita a ligação covalente entre moléculas orgânicas e biomoléculas. Ela tem sido eletropolimerizada com sucesso na superfície dos eletrodos para aplicação em biossensores e imunossensores⁵⁰.

Este composto possui uma estrutura semelhante ao do aminoácido tirosina, mostrada na figura 9, e a sua cadeia alquilamina exibe uma notável liberdade conformacional. A orientação do momento dipolar muda frequentemente entre os conformeros deste grupo, indicando uma mudança induzida na sua estrutura eletrônica e uma elevada significância para a relatividade⁵¹.

A utilização do meio aquoso ácido para a eletropolimerização da tiramina e produção de poli[4-(2-aminoetil)fenol], poli-Tir, permite a formação de películas mais espessas com propriedades condutoras melhoradas do que aquelas obtidas em soluções neutras ou alcalinas. Propriedades condutoras também podem ser melhoradas dependendo das condições experimentais sob o qual os eletrodos foram modificados⁴⁷.

Por esta razão, a tiramina mostrou-se interessante para a realização deste trabalho, na produção de nanocompósito.

Figura 9: Fórmula estrutural da tiramina (a) e da tirosina (b).



Fonte: Autor, 2016.

1.5.5. Nanocompósitos poliméricos

O termo nanocompósito polimérico é utilizado para se referir a um material que consiste em nanomateriais como nanopartículas metálicas, nanotubos de carbono ou grafeno associados a outros polímeros condutores. Estes materiais exibem propriedades especiais devido ao efeito sinérgico dos seus componentes individuais⁵².

Nanocompósitos poliméricos provaram ser excelentes transdutores em sensores eletroanalíticos, devido às suas características em comparação àqueles obtidos pelos seus homólogos, tais como variedades morfológicas e facilidade de síntese. Suas propriedades únicas oferecem vantagens como baixo custo, propriedades eletrônicas melhoradas, processos reversíveis de dopagens e desdopagens, controle das propriedades químicas e eletroquímicas, biocompatibilidade e estabilidade ambiental⁵³.

Estes materiais podem ser sintetizados por meio da polimerização química ou eletroquímica. As reações químicas costumam produzir nanomateriais em pó e podem ser produzidos em larga escala. Por outro lado, a eletropolimerização restringe as reações nas superfícies dos eletrodos, resultando em compósitos poliméricos depositados na superfície dos mesmos. Este método de síntese é vantajoso porque as variáveis eletroquímicas podem ser ajustadas de forma a controlar a espessura do filme na formação do nanocompósito⁵⁴.

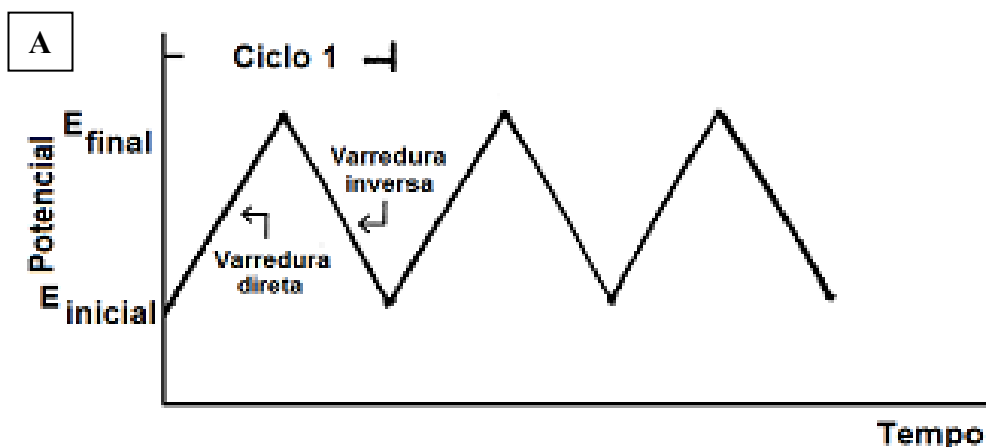
1.6. Técnicas utilizadas

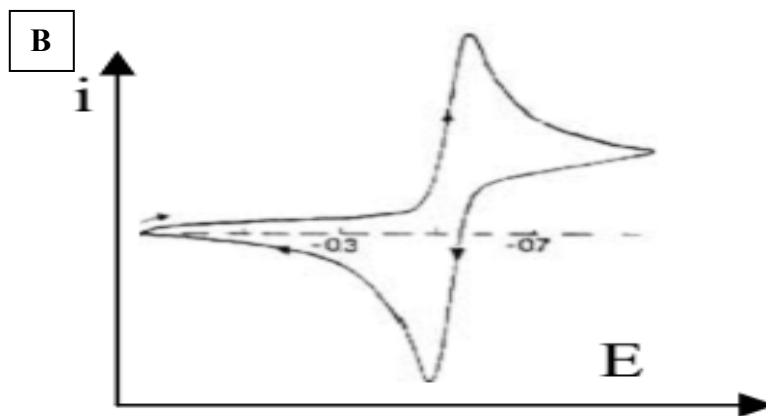
1.6.1. Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica muito utilizada para efetuar eletropolimerização e também para se obter informações qualitativas no estudo de processos eletroquímicos. Ela proporciona uma visão global na investigação de processos eletródicos, pois fornece rapidamente informações sobre a termodinâmica de processos redox, possibilita a elucidação de mecanismos de reação, e ainda permite fazer o estudo cinético de reações heterogêneas de transferência de elétrons e informa sobre a ocorrência de reações químicas acopladas a processos adsorptivos⁵⁵.

A técnica de VC fundamenta-se na aplicação de uma variação de potencial linear na forma de uma onda triangular (figura 10A) sobre o eletrodo de trabalho. O potencial inicial aplicado varia linearmente em um sentido até o potencial final, então, o sentido da varredura é invertido e o potencial volta ao valor inicial, provocando as reações redox na presença de espécies eletroativas existentes na solução ou na superfície do eletrodo. Durante a aplicação do potencial, numa velocidade constante de varredura, o potenciostato registra a corrente em função do potencial aplicado, gerando assim um voltamograma cíclico no qual é mostrado na figura 10B⁵⁵.

Figura 10: (A) Sinal de excitação para a voltametria cíclica e (B) Voltamograma cíclico para um processo redox reversível



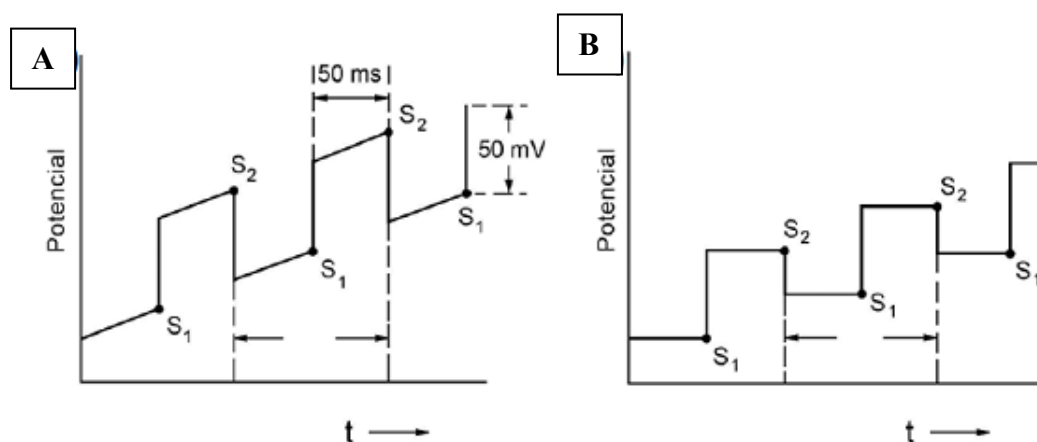


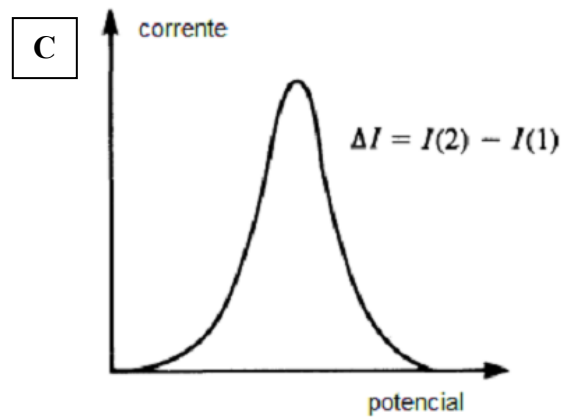
Fonte: Aleixo, 2015

1.6.2. Voltametria de pulso diferencial

Durante a voltametria de pulso diferencial (VPD), pulsos com valores de amplitude fixos são sobrepostos em uma rampa de potencial crescente e aplicados sobre o eletrodo de trabalho. Desta forma, a corrente é medida duas vezes: uma no início do pulso (S_1) e outra no final do pulso (S_2) mostrado na figura 11. Posteriormente, a primeira corrente medida é subtraída pelo equipamento da segunda corrente mensurada. O valor resultante da corrente é colocado em gráfico versus o potencial aplicado, gerando o voltamograma de pulso diferencial mostrado na figura 11C. A área do pico na forma de Gaussiana é diretamente proporcional à concentração de analito existente na solução. Esta técnica é mais sensível do que a VC porque minimiza a contribuição da corrente capacitiva, possibilitando um limite de detecção na ordem de $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ⁵⁶.

Figura 11: Representação esquemática da aplicação do potencial em função do tempo (t) em VPD: (A) em instrumentos analógicos, (B) em instrumentos digitais.



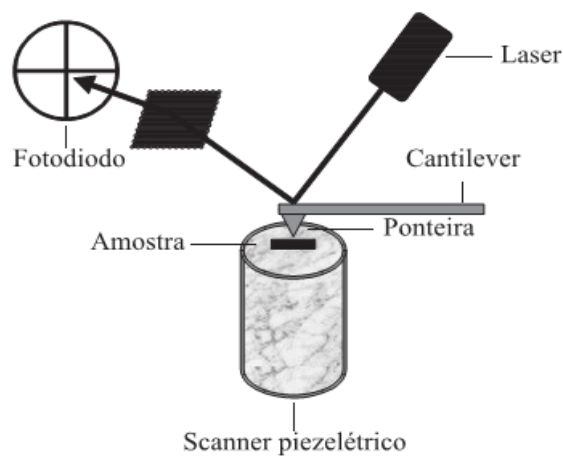


Fonte: Pacheco, 2013

1.6.3. Microscopia de Força Atômica

A Microscopia de Força Atômica (AFM) é uma técnica de caracterização morfológica que se fundamenta na varredura da amostra por uma ponteira piramidal, de 100 a 200 μm de comprimento, aderido a um cantilever. A força de interação entre a ponteira e a amostra faz com que o cantilever sofra uma deflexão provocada pela sua aproximação e afastamento devido à força de interação com a amostra. Na parte superior do cantilever existe um espelho que reflete um feixe de luz. Ao passar por uma lente, esse feixe refletido é incidido sobre um fotodetector de quatro quadrantes que mede as variações de posição e de intensidade da luz produzidas pelas deflexões do cantilever mostrado na (figura 12)⁵⁷.

Figura 12: Esquema de um microscópio de força atômica



Fonte: Ferreira, 2006

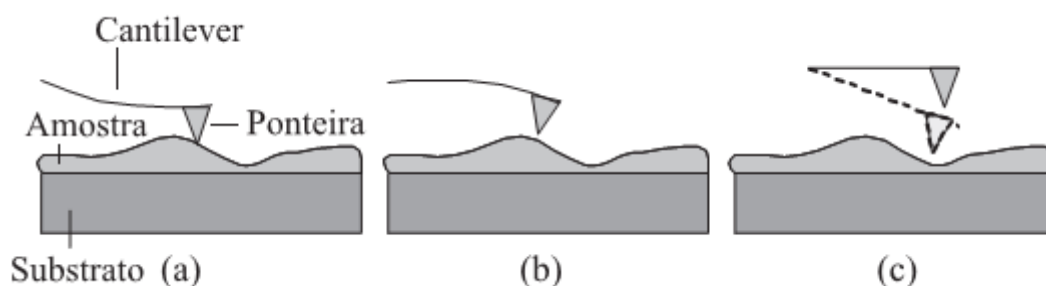
1.6.4. Modos de operação do AFM

Basicamente existem três modos diferentes de operação na técnica de AFM: o modo contato, o não contato e o contato intermitente que são mostrados no esquema representativo da figura 13. No modo contato, o cantilever fica a poucos ângstrons de distância da superfície da amostra e, a força interatômica entre a ponteira e a amostra é repulsiva. Neste modo, a ponteira faz um leve contato com a amostra, gerando imagens de alta definição, mas devido à sua aproximação com a superfície da amostra, podem ocorrer danos ao material biológico que são muito sensíveis à compressão.

No modo não contato, o cantilever se encontra mais afastado da amostra (cerca de centenas de ângstrons) e, a força de interação é atrativa. Nesta situação ocorre um aumento da frequência de oscilação da ponteira, aumentando assim a sensibilidade do microscópio, passando a detectar forças de Van der Waals e forças eletrostáticas.

Já no modo de operação contato intermitente, ocorre de forma semelhante ao modo não contato, diferindo apenas na distância entre a ponteira e a amostra, no qual a ponteira fica mais próxima da superfície da amostra⁵⁷.

Figura 13: Esquema representativo dos modos de operação em AFM: (a) modo contato, (b) modo não contato e (c) modo intermitente.



Fonte: Ferreira, 2006

1.6.5. Microscopia eletrônica de varredura

O princípio da técnica de microscopia eletrônica de varredura baseia-se em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para varrer a superfície da amostra, por linhas sucessivas, ponto a ponto, e fornecer o sinal do detector para uma tela catódica cuja

varredura é sincronizada com aquela do feixe incidente. Por um sistema de bobinas de deflexão, o feixe é guiado de modo a varrer a superfície da amostra. O sinal de imagem é consequência da interação do feixe incidente com a superfície da amostra. O sinal recolhido pelo detector é empregado para regular o brilho do monitor, possibilitando a observação da amostra⁶⁵.

A maior parte dos equipamentos utilizam como fonte de elétrons um filamento de tungstênio (W) aquecido, operando numa faixa de tensões de 1 a 50 kV. O feixe é acelerado pela alta tensão criada entre o filamento e o ânodo. Tal feixe é focalizado sobre a amostra por meio de uma série de três lentes eletromagnéticas com um spot menor que 4 nm. A interação do feixe com a amostra produz elétrons e fótons que podem ser coletadas por detectores e convertidas em um sinal de vídeo, gerando a imagem⁶⁵.

2.0. JUSTIFICATIVA

O hormônio L-triiodotironina (L-T3) é o hormônio ativo da tireoide, que tem ação praticamente sobre todos os órgãos do corpo humano. Entretanto, quando este hormônio se encontra desbalanceado, se não diagnosticado e tratado, podem ocorrer sérias complicações como delírio, insônia, anorexia, osteoporose, fraqueza muscular, fibrilação atrial, insuficiência cardíaca congestiva, tromboembolismo, estado mental alterado, colapso cardiovascular, hipertireoidismo, hipotireoidismo, câncer e morte.

As técnicas existentes para a detecção dos hormônios tireoidianos, como imunoensaio por quimioluminescência, imunoensaio por fluorescência polarizada, enzima imunoensaio, ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA), radioimunoensaio, são técnicas que demandam de um preparo minucioso de amostra e ainda requerem um maior tempo de análise.

Desta forma, torna-se fundamental o desenvolvimento de uma metodologia para detecção do hormônio L-triiodotironina, que seja de baixo custo, que efetue análise em tempo real e ao mesmo tempo, que seja sensível.

3.0. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver uma plataforma formada por EG/OGre/PTir capaz de imobilizar um anticorpo específico para a detecção de L-triiodotironina (L-T3), um dos hormônios produzido pela tireoide.

3.1. Objetivos específicos

- Incorporar o nanomaterial óxido de grafeno sobre eletrodo de grafite e reduzi-lo eletroquimicamente;
- Eletropolimerizar a tiramina sobre eletrodo de grafite (EG) e sobre o eletrodo de grafite modificado com óxido de grafeno reduzido (EG/OGre);
- Caracterizar eletroquimicamente o eletrodo de grafite e o mesmo modificado com óxido de grafeno reduzido, politiramina (PTir), e óxido de grafeno reduzido/politiramina (OGre/PTir);
- Aplicar os diagnósticos de reversibilidade da voltametria cíclica aos eletrodos modificados com polímero e com o compósito;
- Caracterizar morfologicamente as superfícies do eletrodo de grafite, EG/OGre, EG/PTir e EG/OGre/PTir por Microscopia de Força Atômica e por Microscopia Eletrônica de Varredura;
- Verificar o reconhecimento da plataforma desenvolvida EG/OGre/PTir com a sonda (anti L-T3);
- Detectar diretamente o alvo (L-T3) com o biossensor desenvolvido por meio de voltametria de pulso diferencial;
- Construir a curva analítica a partir dos voltamogramas de detecção direta;
- Caracterizar morfologicamente as superfícies da plataforma sensibilizada com sonda (anti L-T3), sonda/bloqueio (BSA) e sonda/BSA/alvo (L-T3) por Microscopia de Força Atômica e Microscopia Eletrônica de Varredura.

4.0. MATERIAIS E REAGENTES

Todas as soluções aquosas foram preparadas utilizando-se reagentes químicos de alta pureza analítica PA (pró-análise) e a água para o preparo das mesmas foi ultrapurificada em sistema Millipore Milli-Q, com uma condutância de 0,05 μS e autoclavada quando usada para preparação de soluções tampão.

Antes da realização de cada experimento, as soluções foram previamente desaeradas com nitrogênio ultrapuro durante 25 minutos e todos os experimentos foram conduzidos à temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$).

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando-se uma célula de três compartimentos com capacidade de 25 mL, acoplada em um potenciostato/galvanostato autolab PGSTAT 128N, por meio do software Geps para as técnicas de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial.

4.1. Soluções

4.1.1. Solução de ácido perclórico ($0,50\text{ mol L}^{-1}$): Em um balão volumétrico de 1,0 L já contendo um pouco de água deionizada, foi adicionado 43,20 mL de HClO_4 concentrado (Merck, 98 %) e completou-se o volume com água deionizada até o menisco.

4.1.2. Solução monomérica de hidrocloreto de tiramina ($2,50\text{ mmol L}^{-1}$): foram adicionados 0,04420 g de hidrocloreto de tiramina (AcrosOrganics, 98,0 %) em um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com solução aquosa de HClO_4 $0,5\text{ mol L}^{-1}$.

4.1.3. Solução de ferro/ferricianeto de potássio ($5,00\text{ mmol L}^{-1}$ contendo $0,10\text{ mol L}^{-1}$ de KCl): Em um balão volumétrico de 100 mL foram adicionados 0,1646 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Fluka, 99,0 %); 0,2112 g de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (AcrosOrganics, 99,5 %) e 0,7456 g de KCl (Neon, 99,0 %) e o volume foi completado com água deionizada.

4.1.4. Solução de hidróxido de sódio ($0,1\text{ mol L}^{-1}$): foram adicionados 0,40 g de NaOH (Vetec, 99,0 %) em um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água deionizada.

4.1.5. Solução de ácido clorídrico ($0,1\text{ mol L}^{-1}$): Em um balão volumétrico de 100,0 mL contendo um pouco de água deionizada, foram adicionados 0,985 mL de HCl (37 %) e o volume foi completado com água deionizada até o menisco.

4.1.6. Solução tampão fosfato (0,10 mol L⁻¹; pH 7,4): Em um balão volumétrico de 500 mL foram adicionados 5,48 g de Na₂HPO₄ (Neon, 99,0%) e 2,32 g de NaH₂PO₄ (Neon, 99,0 %) e o volume foi completado com água deionizada e autoclavada, ajustando-se o pH para o valor 7,4 com solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹.

4.1.7. Solução bloqueadora de soroalbumina bovina, BSA (0,50 %): foram adicionados 0,05 g de BSA (Sigma, ≥ 96,0 %) em balão volumétrico de 10,0 mL e o volume foi completado com solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹.

4.1.8. Solução de anticorpo Anti L-T3: A amostra contendo o anticorpo anti L-T3 puro obtido da Sigma Aldrich foi quantificado em 280 nm pelo método do Biureto no espectrofotômetro Biodrop. A partir de uma solução estoque de 406,6 µg/mL de anti L-T3 foram feitas outras diluições em tampão fosfato.

4.1.9. Solução de antígeno L-triiodotironina (L-T3) 1 mg/mL: O antígeno L-T3 foi fornecido pela Sigma Aldrich como pó (produto liofilizado). A solução estoque foi preparada adicionando-se 0,001 g de L-T3 em 600 µL de etanol e 400 µL de tampão fosfato. Todas as diluições foram feitas em tampão fosfato a partir da solução estoque.

4.20. Obtenção do Óxido de grafeno: o óxido de grafeno foi sintetizado e caracterizado por integrantes do próprio grupo de pesquisa

5.0. PROCEDIMENTOS

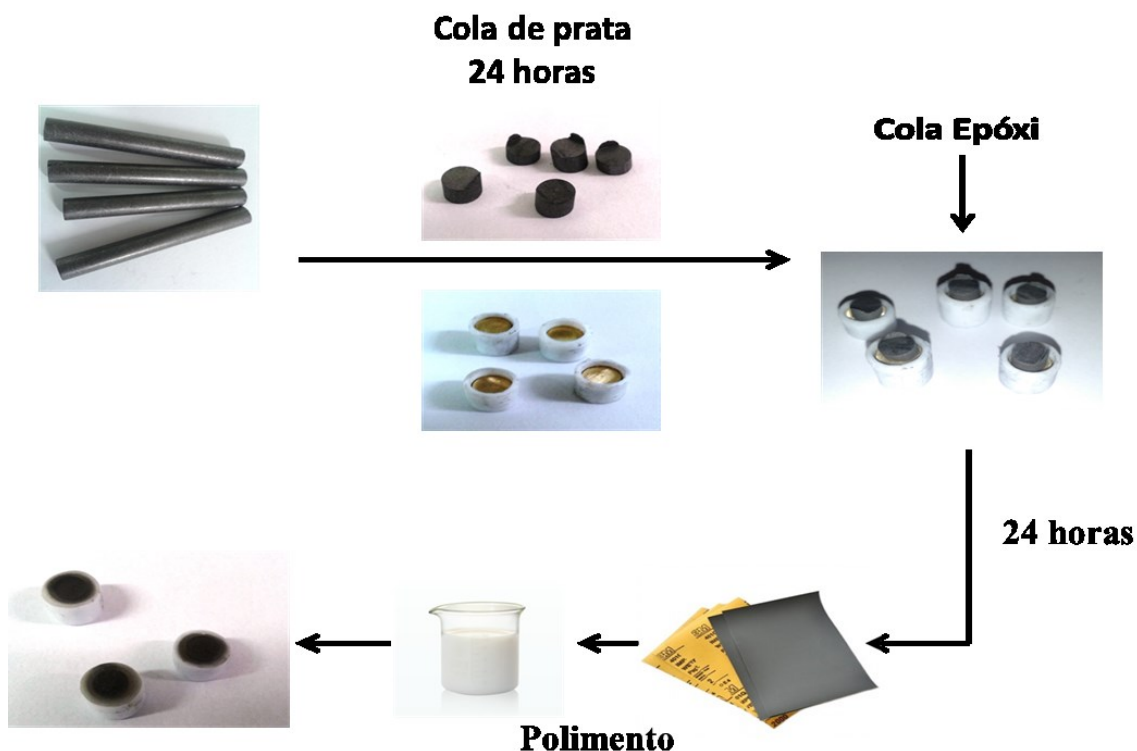
5.1. Preparação dos eletrodos de trabalho

Os eletrodos de grafite foram preparados conforme mostrado na figura 1. Inicialmente, as barras de grafite (100 x 0,6 mm) adquiridas da Alfa Aesar (99,9999%), foram cortadas em forma de discos com uma espessura de 3 a 4 mm.

Em seguida, os discos de grafite foram colados na superfície de um latão envolto de teflon por meio de cola condutora de prata. Após 24 horas, os espaços vazios existentes entre o grafite, teflon e o latão foram preenchidos com cola epóxi. Depois do tempo de cura de 24 horas, os eletrodos de grafite foram polidos com lixas d'água 400 e 1200 (marca 3 M) e posteriormente polidos com suspensão de alumina 0,3 µm (Buehler). Para a retirada da alumina aderida à superfície do grafite, os eletrodos foram sonicados durante 10 minutos em água deionizada e secos com nitrogênio ultrapuro. Antes das medidas

eletroquímicas, o eletrodo de grafite foi conectado em uma base de latão envolvido por teflon para contato elétrico, como mostrado na figura 14.

Figura 14: Esquema de preparação do eletrodo de trabalho.



Fonte: Autor, 2016

5.2. Preparação do eletrodo de referência

Uma placa de prata (0,2 mm x 5,0 cm x 2,0 mm) foi previamente polida com uma palha de aço e lavada com água deionizada em abundância. A eletrodeposição de AgCl na superfície do eletrodo de prata foi realizada em uma célula de um compartimento, contendo um eletrodo comercial de Ag/AgCl (como referência) e um eletrodo auxiliar de platina em 50 mL de solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol L⁻¹. Foi aplicado um potencial constante de 0,7 V (vs. Ag/AgCl) durante 2 minutos para a realização da cronoamperometria.

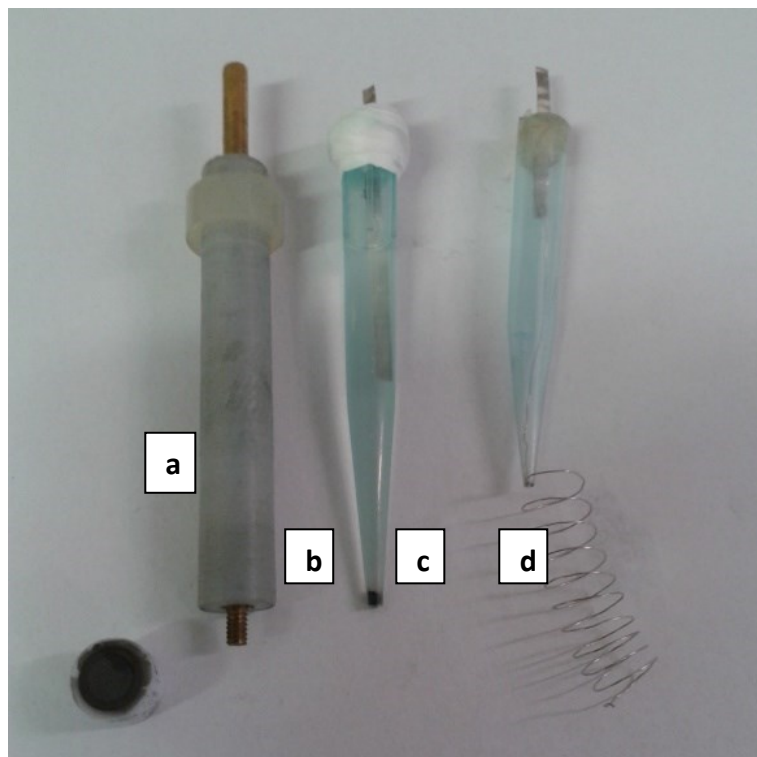
Posteriormente, colocou-se um pedaço de placa de bateria porosa na extremidade de uma ponteira azul, de capacidade de 1000 µL e a mesma foi preenchida com solução de KCl 3,0 mol L⁻¹. Em seguida, a placa de prata contendo AgCl eletrodepositado foi

mergulhada dentro da ponteira, vedando a superfície com teflon, deixando apenas uma haste de prata de 5,0 mm para contato elétrico (Figura 15c).

5.3. Preparação do eletrodo auxiliar

Um fio de platina (0,3 mm x 35 cm) foi colocado dentro de uma ponteira azul (de pipeta automática, capacidade de 1000 μL) e, com o restante do fio que ficou fora da ponteira, foi feita uma espiral com diâmetro igual a 0,9 cm, como pode ser visto na figura 12d.

Figura 15: Eletrodos utilizados neste trabalho: (a) eletrodo de grafite, (b) base de latão revestida por teflon, (c) eletrodo de referência $\text{Ag}_{(s)}/\text{AgCl}_{(s)}/\text{Cl}^{-}_{(\text{aq})}$ (3,0 mol L^{-1}) e (d) eletrodo auxiliar de platina.



Fonte: Autor, 2016

5.4. Escolha dos eletrodos de grafite

Antes do procedimento da redução eletroquímica do óxido de grafeno sob o eletrodo de grafite, os eletrodos foram condicionados e selecionados a fim de garantir um

padrão e reprodutibilidade do sistema através de dois experimentos. No primeiro, o eletrodo de grafite foi submetido a uma voltametria cíclica, utilizando-se ácido perclórico (HClO_4) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte, numa velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} , na janela de potencial de $0,00 \text{ V}$ a $+1,20 \text{ V}$, perfazendo um total de 4 ciclagens, sendo registrada o último ciclo.

O segundo experimento foi realizado em solução $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, por meio de voltametria cíclica, numa velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} , 6 varreduras, numa janela de potencial de $-0,20 \text{ V}$ a $+0,60 \text{ V}$, registrando-se o último ciclo para análise.

5.5. Redução eletroquímica do óxido de grafeno (OGre) sobre eletrodo de grafite

Para a redução eletroquímica do óxido de grafeno, foi preparada uma dispersão utilizando $1,0 \text{ mL}$ de água deionizada e $1,0 \text{ mg}$ do óxido de grafeno em banho ultrassônico durante duas horas. Em seguida, foi centrifugada a 3500 rpm durante 10 minutos e foram gotejados $20 \mu\text{L}$ do sobrenadante na superfície do eletrodo de grafite devidamente polido. Para secagem do mesmo, o eletrodo foi conduzido à estufa durante 15 minutos a 55°C .

Posteriormente, os eletrodos foram colocados numa célula de três compartimentos e a redução eletroquímica do OG foi realizada por voltametria cíclica, utilizando-se solução tampão fosfato como eletrólito suporte, na faixa de potencial de $0,00 \text{ V}$ à $-1,50 \text{ V}$, numa velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} , sob 10 varreduras, até estabilização da corrente elétrica.

5.6. Otimização do número de ciclos de varreduras para a funcionalização dos eletrodos de grafite com politiramina e eletropolimerização da mesma sobre EG e sobre EG/OGre

Inicialmente, foi feita uma otimização do número de varreduras durante a polimerização eletroquímica da tiramina $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$, empregando 20, 40, 60, 80 e 100 ciclos, na janela de potencial de $0,00$ a $+1,10 \text{ V}$, numa velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} por meio de voltametria cíclica sobre o eletrodo de grafite sem modificação. Para oxidação de monômero residual da superfície do eletrodo, os mesmos passaram por tratamento eletroquímico, via duas varreduras de potencial na faixa de $0,00 \text{ V}$ a $+1,10 \text{ V}$ e 3 varreduras de $0,00$ a $+0,85 \text{ V}$, efetuadas em solução de ácido perclórico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, livre de monômero.

Após esta otimização, a tiramina $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ foi eletropolimerizada sobre o EG e sobre EG/OGre, na janela de potencial de 0,00 a +1,10 V, numa velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} por meio de voltametria cíclica fixando-se 60 ciclos de potencial. Visando estudar o comportamento eletroquímico do EG e do mesmo modificado com OGre, PTir e OGre/PTir, os eletrodos foram avaliados por voltametria cíclica, utilizando-se HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ em ausência de monômero, numa velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} , sendo duas varreduras na faixa de potencial de 0,00 V a +1,10 V e 3 varreduras de 0,00 a +0,85 V, utilizando-se o último ciclo como parâmetro para análise.

5.7. Transporte iônico nos estudos de reversibilidade

Os eletrodos de grafite modificados com politiramina (EG/PTir) e com óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente/politiramina (EG/OGre/PTir) foram caracterizados por voltametria cíclica em função da velocidade de varredura, no intervalo de 10 a 100 mVs^{-1} . Neste experimento os voltamogramas cíclicos foram obtidos em solução aquosa de HClO_4 , na ausência de monômero. Os processos eletroquímicos foram avaliados por: 1) variação de potencial de pico anódico e catódico (ΔE_p) em função da velocidade de varredura (v); 2) variação de potencial e meia onda ($E_p - E_p/2$) em função de v ; 3) Relação entre corrente de pico anódica e catódica (I_{pa}/I_{pc}) em função de v e 4) I_p em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).

5.8. Estudo de transferência de carga

As propriedades de troca iônica para o eletrodo de grafite e para os eletrodos de grafite modificados com OG, OGre, PTir e OGre/PTir foram investigadas por voltametria cíclica, utilizando-se a sonda redox negativa de ferrocianeto/ferricianeto de potássio como eletrólito suporte, na janela de potencial entre -0,15 V a +0,6 V, numa velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} , durante 6 ciclagens, utilizando-se a última varredura de potencial como parâmetro para avaliação.

5.9. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Inicialmente, os eletrodos (EG, EG/OG, EG/OGre, EG/PTir e EG/OGre/PTir) foram preparados, secos e armazenados em atmosfera inerte de nitrogênio ultrapuro.

Posteriormente, os espectros de infravermelho dos eletrodos foram obtidos através do Espectrômetro FT-IR Spectrum Two da marca PerkinElmer. O porta amostra de seleneto de zinco (ZnSe) foi limpo com álcool isopropílico e, em seguida, cada eletrodo foi colocado separadamente na superfície do cristal de ZnSe para análise.

5.10. Otimização dos parâmetros da voltametria de pulso diferencial

Sobre os eletrodos de grafite modificados com OGre/PTir foram gotejados 20 μL de solução 60,0 ng/mL de anti-LT3. Esperou-se 45 minutos para interação da sonda com o nanocompósito e, em seguida, os mesmos foram lavados em tampão fosfato durante 5 segundos. Os eletrodos foram levados à estufa e secos a 37 °C durante 10 minutos e reservados para a detecção.

Para a otimização dos parâmetros da voltametria de pulso, fixou-se primeiramente a amplitude de 30 mV, variando-se a velocidade de varredura de 10 a 70 mVs^{-1} . Posteriormente, fixou-se a velocidade de varredura de 30 mVs^{-1} e variou-se a amplitude de 10 a 70 mV.

5.11. Investigação da concentração, tempo e pH de imobilização da sonda

Para a investigação da concentração do anticorpo a ser imobilizada na superfície do EG/OGre/PTir, foram preparadas diferentes soluções de anti L-T3 nas concentrações de 6,0 ng/mL, 60,0 ng/mL, 0,60 $\mu\text{g/mL}$ e 6,0 $\mu\text{g/mL}$, e gotejados 20,0 μL na superfície dos eletrodos. Esperou-se 45 minutos para interação da sonda com o nanocompósito e, em seguida, os mesmos foram lavados em tampão fosfato durante 5 segundos. Os eletrodos foram levados à estufa a 37°C durante 10 minutos e reservados para detecção.

Para a investigação do tempo de imobilização da sonda, foram gotejados 20,0 μL de solução de 6,0 ng/mL de anti L-T3 sobre EG/OGre/PTir, variando-se o tempo para imobilização nos seguintes intervalos: 15, 30, 45, 60 e 75 minutos. Posteriormente, os eletrodos foram lavados em tampão fosfato durante 5 segundos e colocados em estufa a 37°C durante 10 minutos, para finalmente serem detectados.

Para a investigação do pH de imobilização, foram preparadas soluções de 6,0 ng/mL de anti L-T3 em tampão fosfato nos diferentes pHs: 5,05, 7,01, 7,46 e 8,01. Em seguida, foram gotejados 20,0 μL destas soluções nos eletrodos e esperou-se 45 minutos

para interação da sonda com a plataforma desenvolvida. Posteriormente os eletrodos foram lavados em tampão fosfato nos seus respectivos valores de pH de imobilização, durante 5 segundos e colocados em estufa a 37 °C durante 10 minutos.

A detecção direta do anticorpo foi realizada por meio de voltametria de pulso diferencial, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4, com amplitude de pulso de 60 mV e com velocidade de varredura de 30 mVs⁻¹, na faixa de potencial de 0,4 V a 1,0 V, na célula de três compartimentos.

5.12. Construção do imunossensor

Sobre os eletrodos de grafite modificados com o nanocompósito OGre/PTir foram gotejados 20 µL de anticorpo (anti L-T3), esperando-se 45 minutos, sob temperatura ambiente, para interação do mesmo com a plataforma. Posteriormente, os eletrodos foram lavados com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4, durante 5 segundos, para retirada de anticorpos que não interagiram com a plataforma.

Posteriormente, os eletrodos foram imersos em solução bloqueadora de proteína do soro bovino (BSA) 0,5 % durante 1 hora, a 25 °C e, novamente lavada em tampão fosfato. O eletrodo foi levado à estufa e seco a 37 °C durante 10 minutos.

Após a sensibilização do eletrodo com o anticorpo e feito o bloqueio, foi gotejado sobre o mesmo 25 µL de antígeno L-triiodotironina 0,001 ng/mL em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, e deixado em contato durante 35 minutos, a 25°C. Em seguida, os eletrodos foram lavados durante 5 segundos em tampão fosfato e reservado para detecção como mostrado na figura 16.

O sinal eletroquímico foi mensurado utilizando voltametria de pulso diferencial com amplitude de pulso de 60 mV e com velocidade de varredura de 30 mVs⁻¹, na faixa de potencial de 0,4 V a 1,0 V versus Ag/AgCl, KCl (3,0 mol L⁻¹). Como eletrólito suporte, foi utilizado 25 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4, previamente desaerado durante 25 minutos com nitrogênio ultra puro.

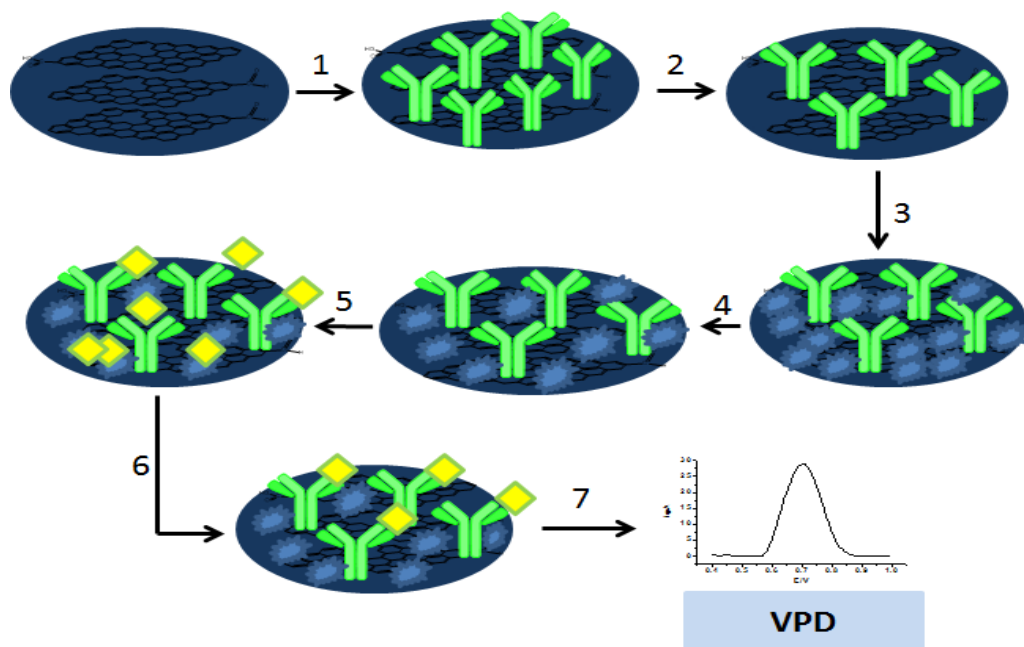
5.13. Caracterização morfológica

Inicialmente, os eletrodos com as diferentes superfícies (EG, EG/OG, EG/OGre, EG/PTir, EG/OGre/PTir, EG/OGre/PTir + anti L-T3, EG/OGre/PTir + anti L-T3 + BSA e EG/OGre/PTir + anti L-T3 + BSA + L-T3), preparados conforme descrito nos

procedimentos descritos anteriormente, foram armazenados em atmosfera inerte de nitrogênio ultra puro para obtenção das imagens de microscopia de força atômica (AFM) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), com voltagem de 20.00 kV.

As imagens de AFM foram geradas através do aparelho Shimadzu Scanning Probe Microscope – SPM 9600 sob temperatura ambiente. Para a geração de imagem no MEV, todos eletrodos foram metalizados com um jato de spray de ouro e, posteriormente foram conduzidos para o porta-amostra do detector.

Figura 16: Etapas de preparo do biossensor: (1) Imobilização da sonda (anti L-T3) sobre EG/OGre/PTir; (3) da superfície com BSA; (5) Interação anticorpo-antígeno; (7) Detecção do alvo (L-T3 bloqueio), (2, 4 e 6) etapas de lavagem.



Fonte: Autor, 2016.

5.14. Construção da curva de calibração

A curva de calibração foi construída a partir da análise dos voltamogramas de oxidação de aminoácidos na presença de tampão fosfato, onde o biossensor manteve a concentração de anticorpo específico anti L-T3 ($6,0 \text{ ng mL}^{-1}$) constante, variando-se a concentração do antígeno/ L-T3 ($0,001 \text{ ng mL}^{-1}$, $0,005 \text{ ng mL}^{-1}$, $0,05 \text{ ng mL}^{-1}$, $0,25 \text{ ng mL}^{-1}$, $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ e $5,0 \text{ ng mL}^{-1}$).

A leitura do sinal de corrente foi mensurado por meio da técnica de voltametria de pulso diferencial, utilizando-se um potenciostato/galvanostato autolab PGSTAT 128N. Como eletrólito suporte foi empregado 25 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4 previamente desaerado por 25 minutos. Os parâmetros utilizados para a leitura foram: amplitude de modulação de 60,0 mV e velocidade de varredura 30,0 mV.s⁻¹. Para a detecção, utilizou-se a faixa de potencial de +0,4 V a +1,0 V.

6.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente serão apresentados estudos de síntese, caracterização eletroquímica e morfológica do nanocompósito polimérico óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente/politiramina sobre eletrodo de grafite. Tais estudos são de suma importância para o desenvolvimento da plataforma funcionalizada para a imobilização do anticorpo (anti L-T3) e detecção do antígeno L-triiodotironina (L-T3). Posteriormente, serão mostrados resultados sobre a construção do biossensor, como a detecção do alvo e caracterizações morfológicas.

6.1. Escolha dos eletrodos de grafite

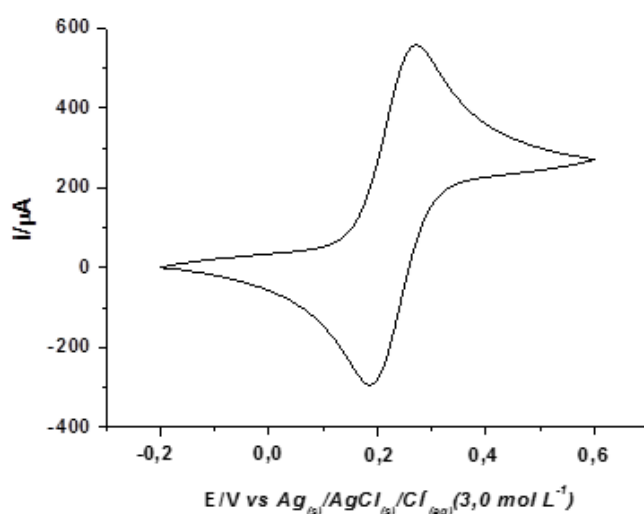
Após o polimento, os eletrodos de grafite passaram por duas análises voltamétricas para selecionar eletrodos que possuem áreas eletroativas semelhantes, visando à padronização do sistema e garantindo uma boa reprodutibilidade nos estudos posteriores.

A primeira seleção foi feita por voltametria cíclica utilizando K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹, no qual foram avaliados a relação entre as correntes de pico (I_{pa}/I_{pc}) que deve ser aproximadamente igual a 1 e a diferença entre os valores de potenciais de pico ($E_{pa}-E_{pc}$) que deve ser menor que $\Delta E_p = 59\text{mV/n}$. Eletrodos que apresentaram variações superiores a 10 % nos padrões acima foram descartados.

A segunda seleção foi realizada também por meio de uma voltametria cíclica, utilizando-se ácido perclórico 0,5 mol L⁻¹ como eletrólito suporte, para promover um polimento eletroquímico e visualizar a área eletroativa através de 4 varreduras na janela de potencial de 0,00 a +1,20V. O fato pelo qual se aplicou um potencial de +1,20, foi para garantir que a superfície do EG estivesse realmente limpa nesta faixa de potencial, uma

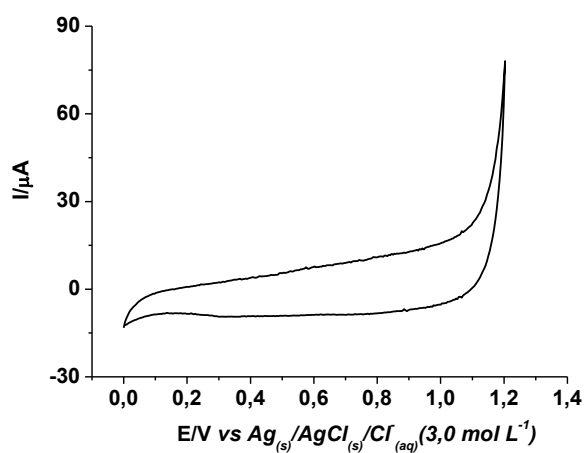
vez que o potencial para a eletropolimerização do monômero tiramina ocorre em +1,10V. Eletrodos de grafite que apresentaram valores de correntes maiores que 16 μA foram descartados. As figuras 17 e 18 mostram o perfil desejável do eletrodo grafite para os experimentos.

Figura 17: Último ciclo de voltametria do eletrodo de grafite no eletrólito suporte $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5,0 mmol L^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} , na velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} , 6 ciclos, na faixa de potencial de -0,2 a +0,6 V.



Fonte: Autor, 2016

Figura 18: Quarto ciclo de voltametria do eletrodo de grafite em HClO_4 0,5 mol L^{-1} , após 4 varreduras de potencial entre 0,00 e +1,2 V, 50 mV s^{-1} .



Fonte: Autor, 2016

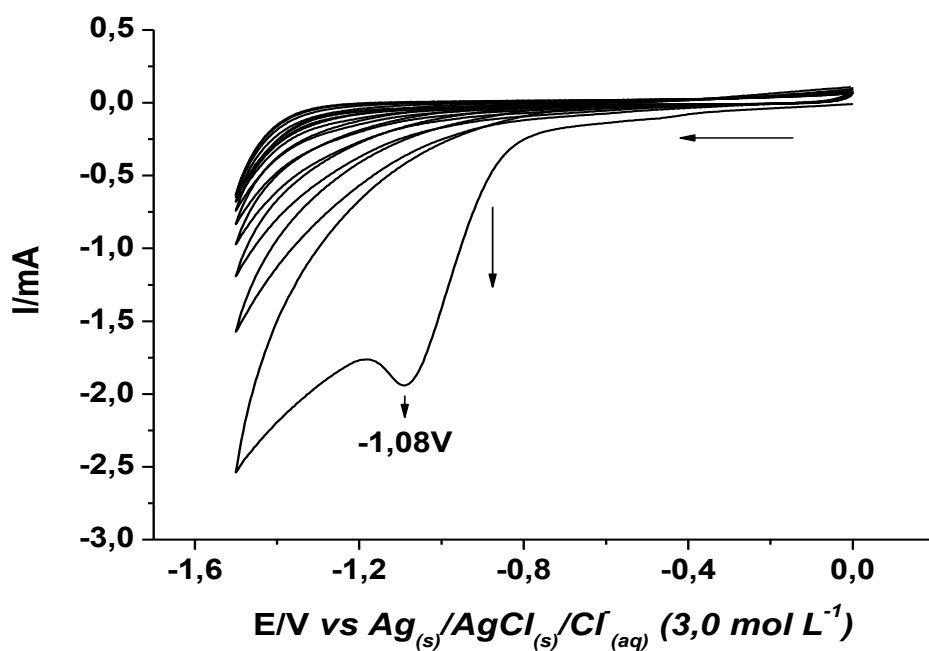
6.2. Redução eletroquímica do óxido de grafeno

Visando otimizar a resposta eletroquímica, aumentando-se a sensibilidade do sistema, buscou-se estratégias, como a incorporação do nanomaterial para alcançar esta meta. Antes da eletropolimerização da tiramina sobre o eletrodo de grafite, foi incorporado o material óxido de grafeno sobre a superfície do mesmo, sintetizado e caracterizado por Silva e colaboradores (resultados não publicados), integrantes do nosso grupo de pesquisa.

O óxido de grafeno é um material derivado do grafite e possui muitas funções oxigenadas em sua superfície, como grupos epóxidos, aldeídos e ácidos carboxílicos, tornando-o muito hidrofílico quando comparado com o grafeno. Em contrapartida, devido à presença destes grupos funcionais mencionados acima, ocorre uma quebra de parte da aromaticidade do OG tornando-o um material não condutor. Desta forma, neste trabalho foi realizada uma redução eletroquímica deste material sobre a superfície do eletrodo de grafite para restauração da nuvem π de elétrons.

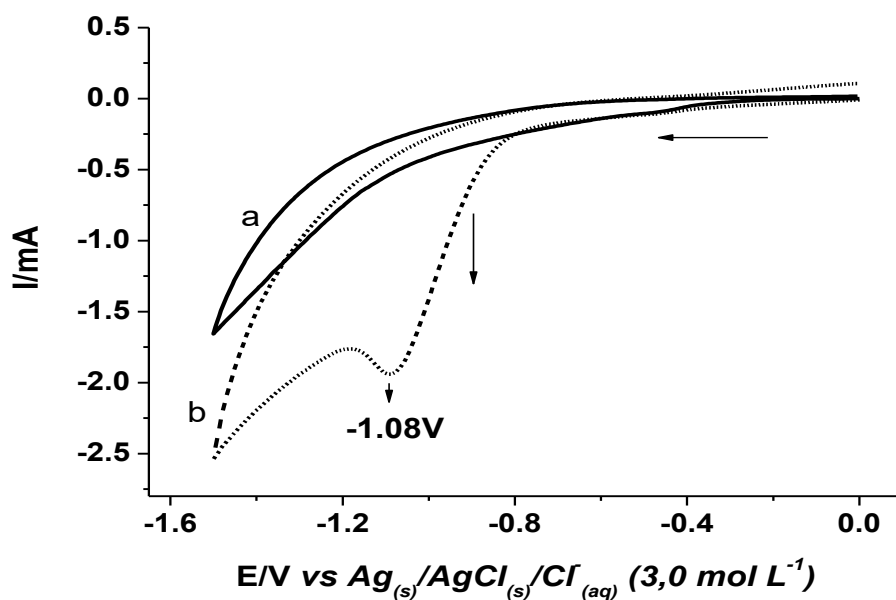
Como pode ser observado na figura 19, no primeiro ciclo aparece um pico de redução em -1,08V, o qual não é observado no eletrodo de grafite sem modificação (figura 20). Este pico está associado com a redução de grupos funcionais de oxigênio como epóxidos, peróxidos e aldeídos, que estão presentes na estrutura do OG⁵⁹. Na varredura inversa não ocorre mais a presença do pico indicando que o mesmo é irreversível.

Figura 19: Redução eletroquímica por voltametria cíclica do OG na superfície do eletrodo de grafite, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4, entre 0,00 a -1,50 V, 10 ciclos, 50 mVs⁻¹.



Fonte: Autor, 2016

Figura 20: Voltamograma cíclico da primeira volta de redução do EG (a) e OG (b) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4, 50 mV s^{-1} , na faixa de potencial de 0,00 a -1,50 V.



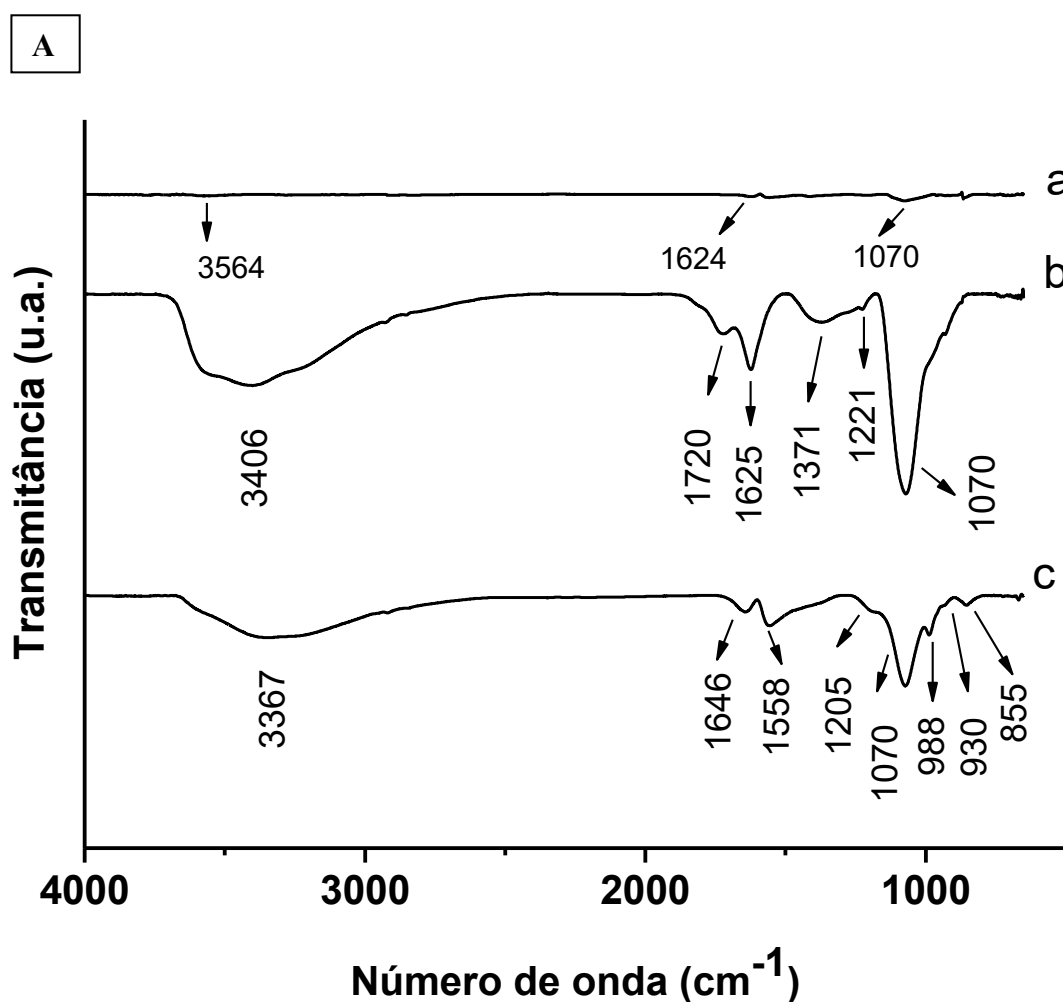
Fonte: Autor, 2016

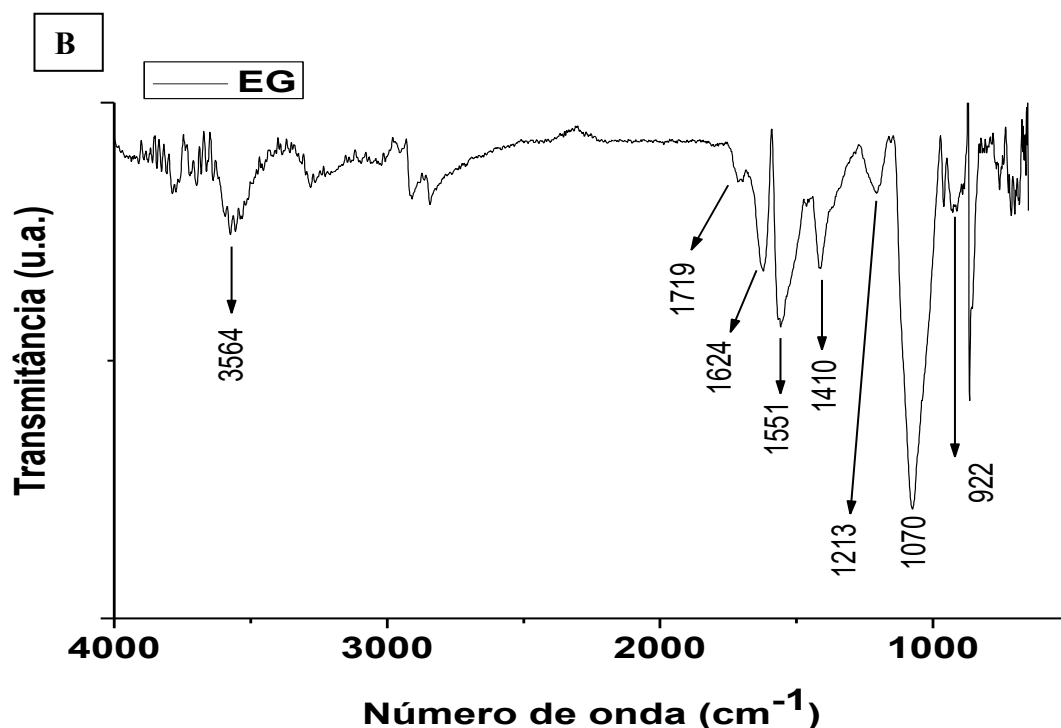
6.3. Caracterização do nanomaterial sobre o eletrodo de grafite

Após a redução eletroquímica do óxido de grafeno sobre a superfície do eletrodo de grafite, o EG e o mesmo modificado com OG e OGRE foram analisados por espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier mostrada na figura 21.

A fim de observar melhor as bandas do espectro obtido do eletrodo de grafite na figura 21 a, já que as bandas mais intensas do OG e do OGRE mascaram as do EG, foi feito um zoom do mesmo, no qual se encontra na figura 21 B.

Figura 21: Espectro de infravermelho com transformada de Fourier (A) do eletrodo de grafite (a), e do mesmo modificado com OG (b) e OGRE (c), (B) Zoom do espectro do EG.





Fonte: Autor, 2016

No espectro do eletrodo de grafite, pode-se observar bandas características do mesmo em 3564 cm^{-1} e 1624 cm^{-1} que são atribuídas ao estiramento da vibração do -OH e da dupla entre carbonos (-C=C-) de anéis aromáticos respectivamente. A banda de pequena intensidade da hidroxila é proveniente da oxidação do grafite com o oxigênio do ar. Pode-se notar que houve diferenças significativas no espectro do EG/OG em relação ao EG. No espectro do OG, aparece uma banda intensa em 3406 cm^{-1} característica de hidroxila devido à oxidação do grafite. Pode-se observar ainda o aparecimento de bandas em 1720 cm^{-1} , 1625 cm^{-1} , 1221 cm^{-1} que são provenientes respectivamente da vibração do estiramento da ligação C=O , estiramento da ligação C=C de anéis aromáticos, vibração de deformação axial de C-O-C e, em 1070 cm^{-1} , observa-se uma banda característica de C-O . Após a redução eletroquímica, houve o desaparecimento das bandas em 1720 cm^{-1} , 1371 cm^{-1} e 1221 cm^{-1} , como pode ser visto na figura 21 A do espectro de infravermelho. Observa-se ainda que houve uma diminuição da banda em 3367 cm^{-1} no espectro do EG/OGre, que é característica O-H .

A redução eletroquímica conduzida no pH 7,4 entre 0,00 a -1,50 V é interessante pois ocorre a preservação de grupos carboxílicos na superfície do óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente, facilitando a interação do mesmo com o polímero que será

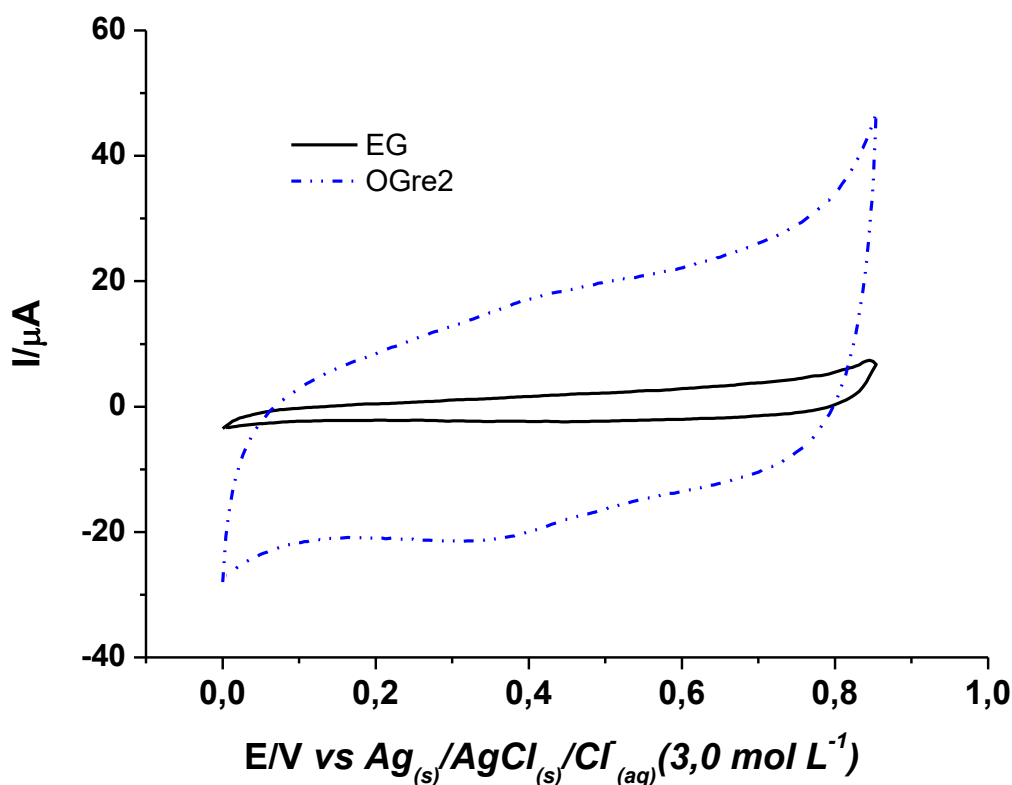
eletropolimerizado posteriormente para formação do nanocompósito. As principais bandas seguem compiladas na tabela 3.

Tabela 3: Bandas referentes ao espectro de infravermelho com Transformada de Fourier do EG, e do mesmo modificado com OG e OGre.

EG	Tipos de vibração	Referência
3564 cm⁻¹	Vibração de deformação axial de O–H	33
1719cm⁻¹	Deformação axial de C=O	
1624 cm⁻¹, 1561 cm⁻¹ e 1410cm⁻¹	Deformação axial entre carbonos (-C=C-) de anéis aromáticos	33
922 cm⁻¹	Vibração de deformação angular de C – H fora do plano	33
EG/OG		
3406 cm⁻¹	Vibração de deformação axial de O–H	57
1720 cm⁻¹	Deformação axial de C=O	57,60
1625 cm⁻¹	Deformação axial entre carbonos (-C=C-) de anéis aromáticos	57
1371 cm⁻¹	Deformação angular de O – H terminal	57
1221 cm⁻¹	Vibração de deformação axial de C – O – C	57, 60
1070 cm⁻¹	Vibração de deformação axial de C – O	57, 60
EG/OGre		
3367 cm⁻¹	Vibração de deformação axial de O–H	57,60
1646 cm⁻¹e 1558 cm⁻¹	Deformação axial entre carbonos (-C=C-) de anéis aromáticos	33
1205 cm⁻¹	Vibração de deformação axial de C – O – C	57, 60
1070 cm⁻¹	Vibração de deformação axial de C – O	57, 60
988 cm⁻¹	Vibração de deformação angular de C – H fora do plano	33
855 cm⁻¹	Vibração de deformação angular de C – H fora do plano (hidrogênio isolado)	33

A fim de verificar o perfil voltamétrico do EG e do mesmo modificado com OG e OGre foi realizada uma voltametria cíclica em solução HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ cujos voltamogramas se encontram na figura 22.

Figura 22: Voltamogramas cíclicos do EG e do mesmo modificado com OGre em HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, 50 mV s^{-1} , na janela de potencial de 0,00 a +0,85 V.

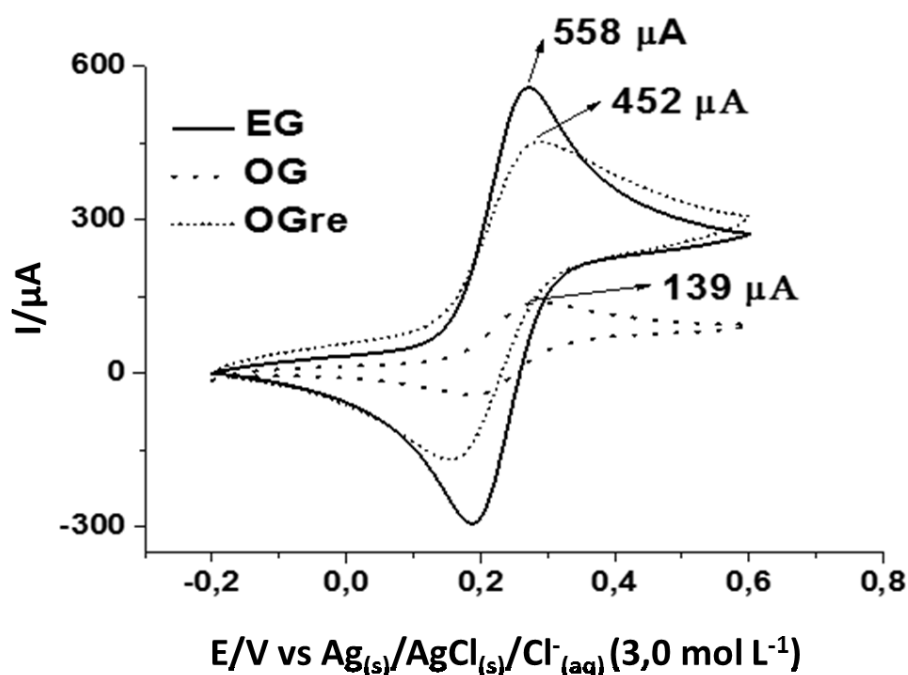


Fonte: Autor, 2016

Pode-se observar que o voltamograma do EG/OGre, mostrou um aumento de resposta de corrente quando comparado com o EG, devido à restauração da nuvem π de elétrons, tornando o material mais condutor.

A figura 23 mostra os voltamogramas cíclicos para o eletrodo de grafite e do mesmo modificado com OG e OGre em $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl.

Figura 23: Voltamograma cíclico das superfícies: (a) EG, (b)EG/OG e (c)EG/OGre em solução de $5,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, a 50 mV/s .

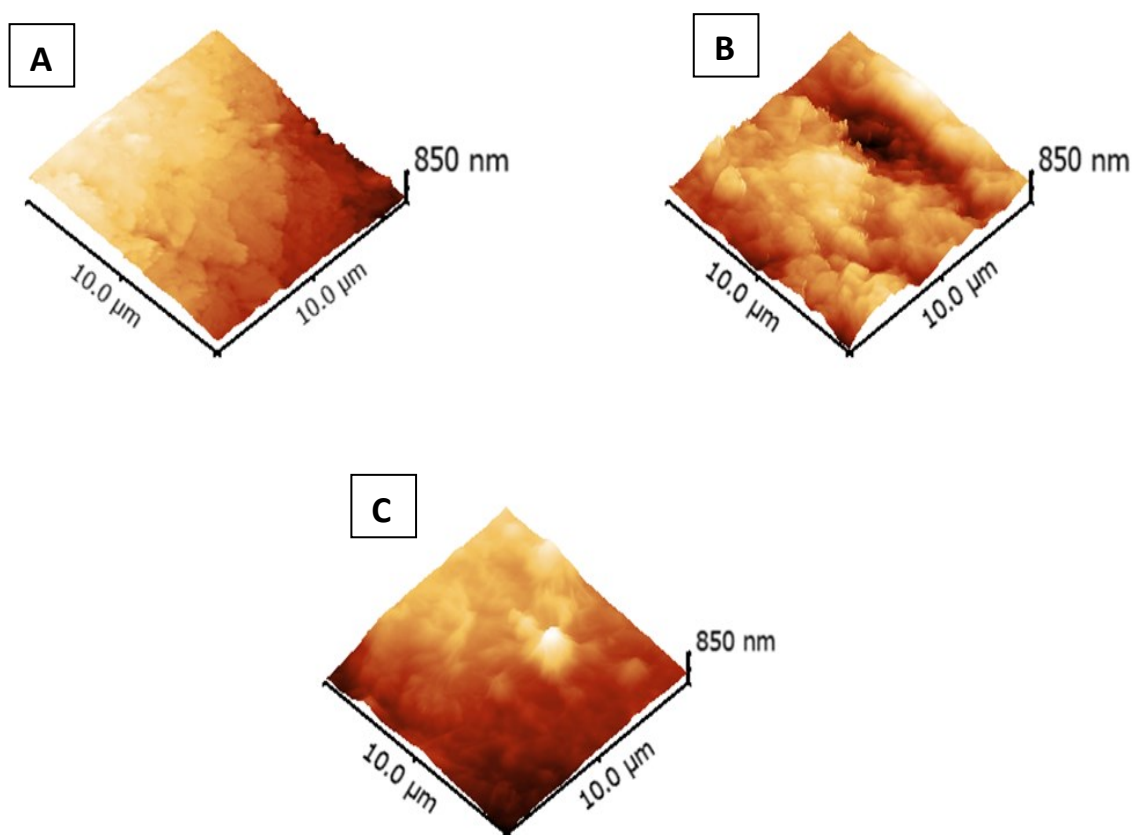


Fonte: Autor, 2016

Sabe-se que o OGre possui grupos $-\text{OH}$ e $-\text{COOH}$ e apresenta cargas negativas características. Quando o EG/OGre é analisado na sonda $\text{K}_3[\text{Fe(CN)}_6]/\text{K}_4[\text{Fe(CN)}_6]$, ocorre uma repulsão das cargas negativas, diminuindo a intensidade de corrente quando comparado com o EG, ($I_{\text{paEG}} = 558 \mu\text{A}$ e $I_{\text{paOGre}} = 452 \mu\text{A}$) possuindo assim um caráter aniônico. O baixo I_p do OG não reduzido ($I_{\text{pa}} = 139 \mu\text{A}$) pode ser explicado pela quebra da aromaticidade causado pelos grupos epóxi, peróxi e aldeídos presentes na sua estrutura dificultando a transferência eletrônica. Quando se reduz eletroquimicamente o OG na superfície do eletrodo de grafite, ocorre a restauração da aromaticidade facilitando a transferência eletrônica, tal fato pode ser observado no resultado experimental da figura 23.

Visando caracterizar morfologicamente as superfícies estudadas acima, foram realizadas medidas de microscopia de força atômica (AFM) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A figura 24 mostra as imagens de AFM para o EG e para o mesmo modificado com OG e OGre.

Figura 24: Microscopia de força atômica do EG (A), EG/OG(B) e EG/OGre(C).

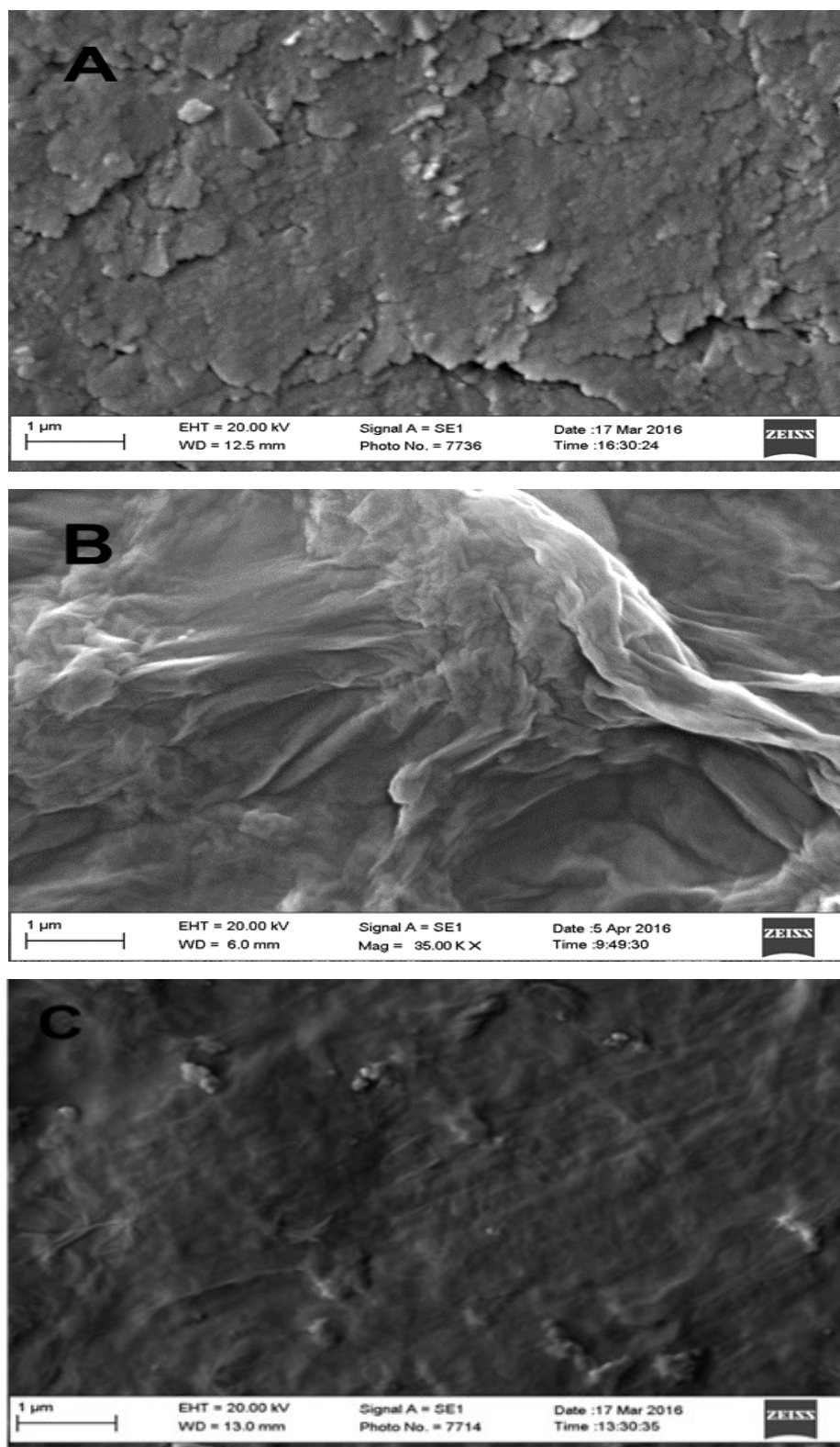


Fonte: Autor, 2016

As imagens de AFM mostram que o eletrodo de grafite (figura 24A) apresenta superfície com rugosidade de 53,8 nm e quando se adiciona o óxido de grafeno ao mesmo, ocorre um aumento da rugosidade ($R_q = 143,47$ nm) mostrado na figura 24 B. Depois do processo de redução eletroquímica, a rugosidade do EG/OGre diminuiu para 115,46 nm (Figura 24C), isto ocorre provavelmente por reduzir grupos oxigenados como epóxidos, aldeídos e peróxidos seguido da restauração de parte da nuvem π de elétrons.

A figura 25 mostra as imagens de microscopia eletrônica de varredura para o eletrodo de grafite e o mesmo modificado com OG e OGre.

Figura 25: Microscopia eletrônica de varredura do EG (A) e do mesmo modificado com OG (B) e OGre (C) na magnitude de 35000x, com voltagem de 20.00 kV.



Fonte: Autor, 2016

As imagens de microscopia eletrônica de varredura corroboram com os resultados de AFM, uma vez que o eletrodo de grafite apresenta folhas compactas características (figura 25A). Já o óxido de grafeno mostrado na figura 25B possui uma morfologia mais rugosa podendo ser devido à presença de ligações de hidrogênio entre os grupamentos, favorecendo a interação entre estes grupos, consequente aumento de rugosidade. Após a redução eletroquímica do óxido de grafeno (figura 25C) houve um recobrimento mais homogêneo da superfície do eletrodo de grafite pela folha de OGr devido a restauração da nuvem pi de elétrons e também pelo maior empacotamento provocado pela saída de grupos que foram reduzidos.

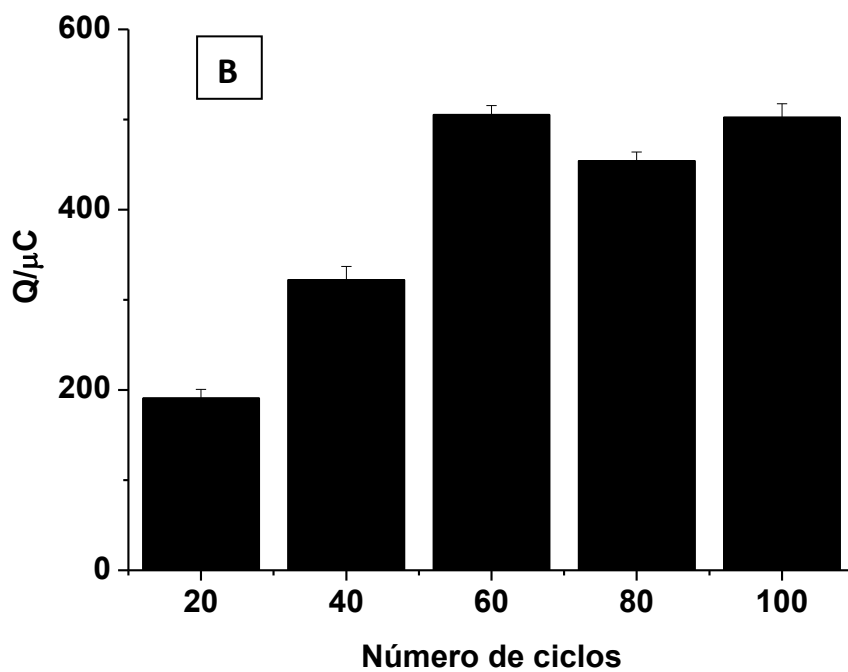
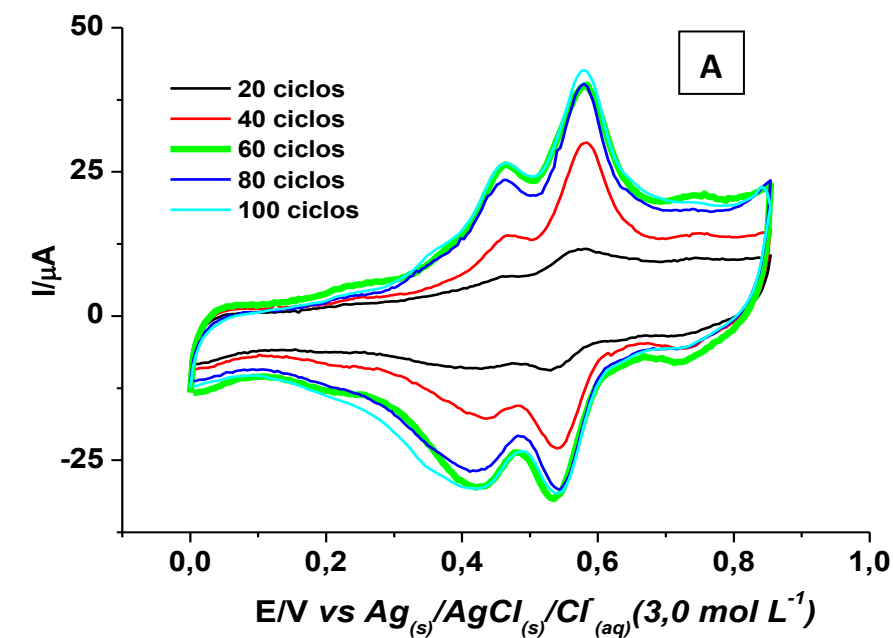
6.4. Padronização do número de ciclos para a eletropolimerização da tiramina sobre eletrodo de grafite

Um dos passos primordiais na construção de um biossensor é a imobilização eficaz do material biológico sobre a superfície do eletrodo para que não ocorra uma possível lixiviação da sonda. Como solução para este problema, o eletrodo de grafite foi revestido com uma malha polimérica de politiramina, sintetizada eletroquimicamente, ficando expostos grupos amino para interação com o material biológico.

Com o intuito de padronizar o número de ciclos para eletrodeposição do filme, foi feita a polimerização eletroquímica do monômero tiramina por voltametria cíclica sobre o eletrodo de grafite (mostrada na figura 26), variando o número de varreduras de potencial de 20, 40, 60, 80 e 100 ciclos, na janela de potencial de 0,00 a +1,10V.

Após os filmes prontos, os mesmos passaram por tratamento eletroquímico via voltametria cíclica em solução de ácido perclórico, visando a retirada de monômero residual. A última voltametria cíclica foi registrada e calculou-se a quantidade de carga anódica total.

Figura 26:(A) Quantidade de ciclos do filme politiramina em HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, na janela de potencial de 0 a $+0,85\text{V}$, 50 mVs^{-1} . (B) Quantidade de carga total referente ao número de ciclos da eletropolimerização.

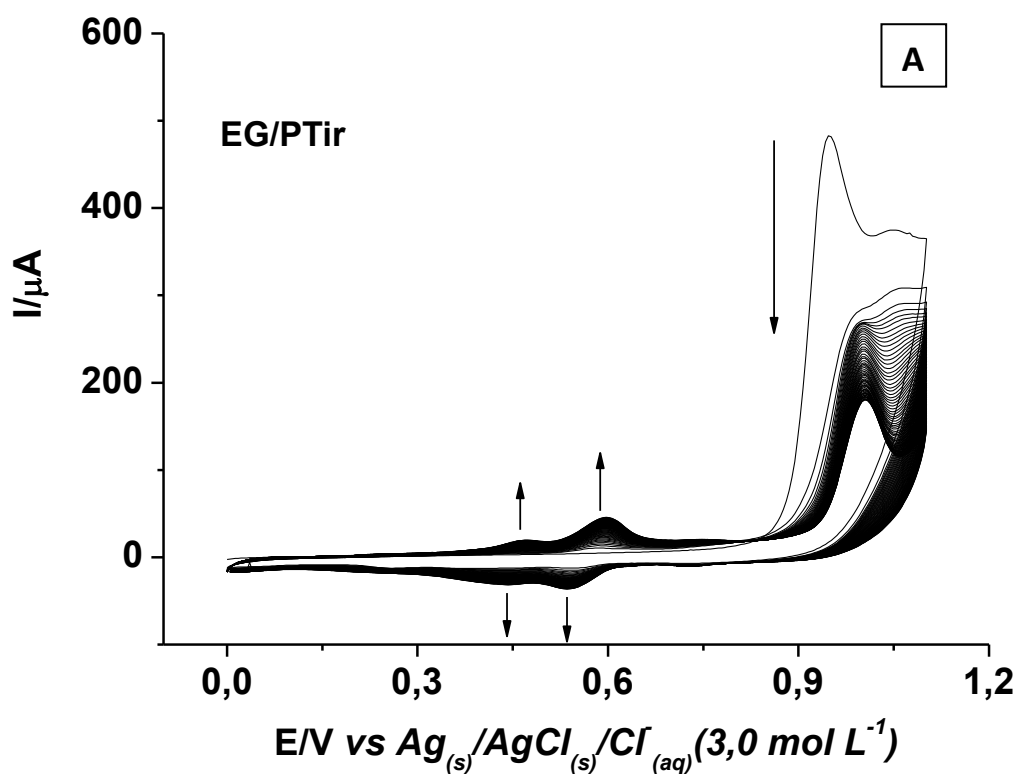


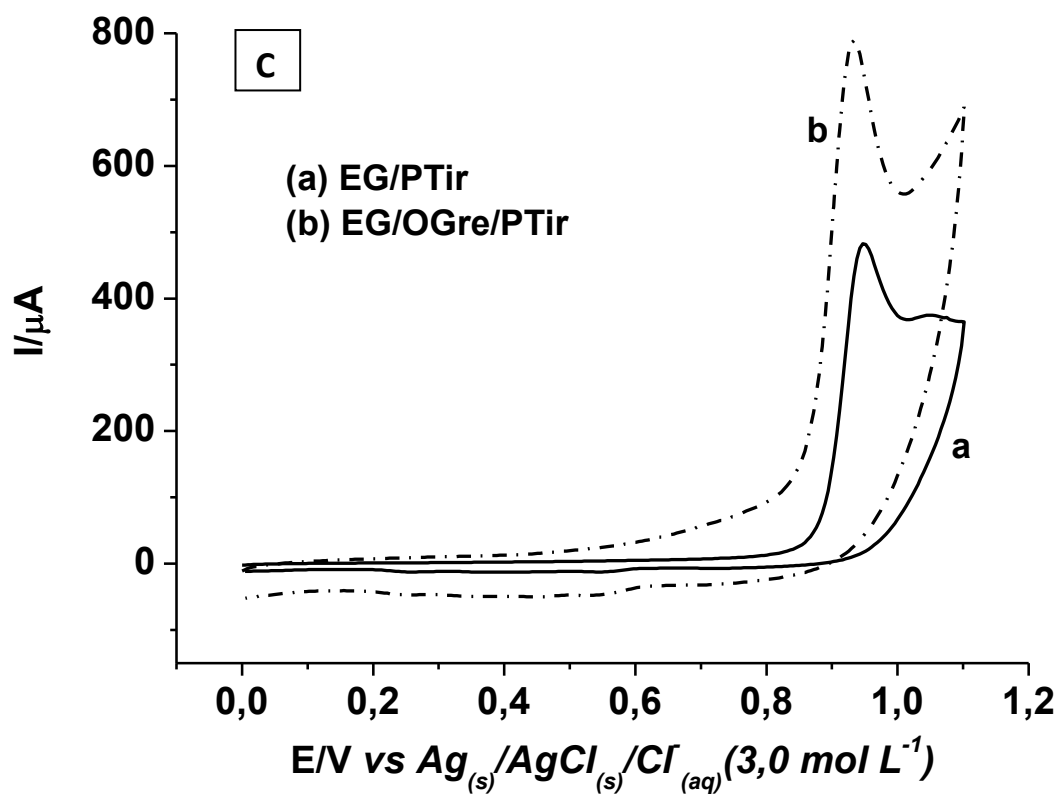
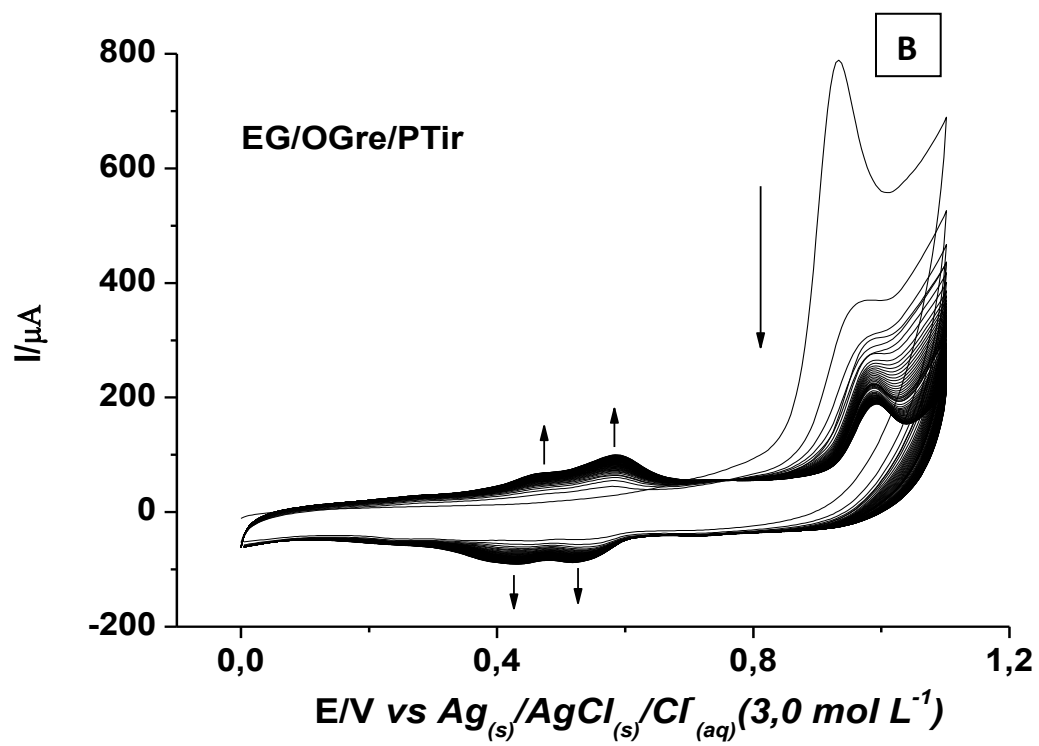
Fonte: Autor, 2016

Pode-se observar na figura 26A que o número de ciclos para a eletropolimerização da tiramina que possui uma maior intensidade de corrente foi o voltamograma correspondente a 60 ciclos. A figura 26B mostra a quantidade de carga total envolvida no processo de oxidação da eletropolimerização da tiramina nas diferentes quantidades de ciclos, evidenciando que o maior valor de carga total foi de 175 μC para 60 ciclos do filme. Desta forma, nos experimentos subsequentes, fixou-se o número de 60 varreduras para a síntese eletroquímica do polímero.

Depois de se padronizar o número de ciclos da PTir, a mesma foi eletropolimerizada sobre o EG e sobre EG/OGre, e estudado o seu comportamento eletroquímico. A figura 27 mostra os voltamogramas cíclicos de formação da politiramina sobre o EG e EG/OGre respectivamente.

Figura 27: Eletropolimerização da tiramina 2,5 mmol L⁻¹ em HClO₄ 0,5 mol L⁻¹ sobre (A) EG, (B) EG/OGre e (C) Primeira volta de varredura referente às letras A e B. Faixa de potencial de 0,00V a +1,10V, a 50 mV s⁻¹, 60 ciclos de varredura.





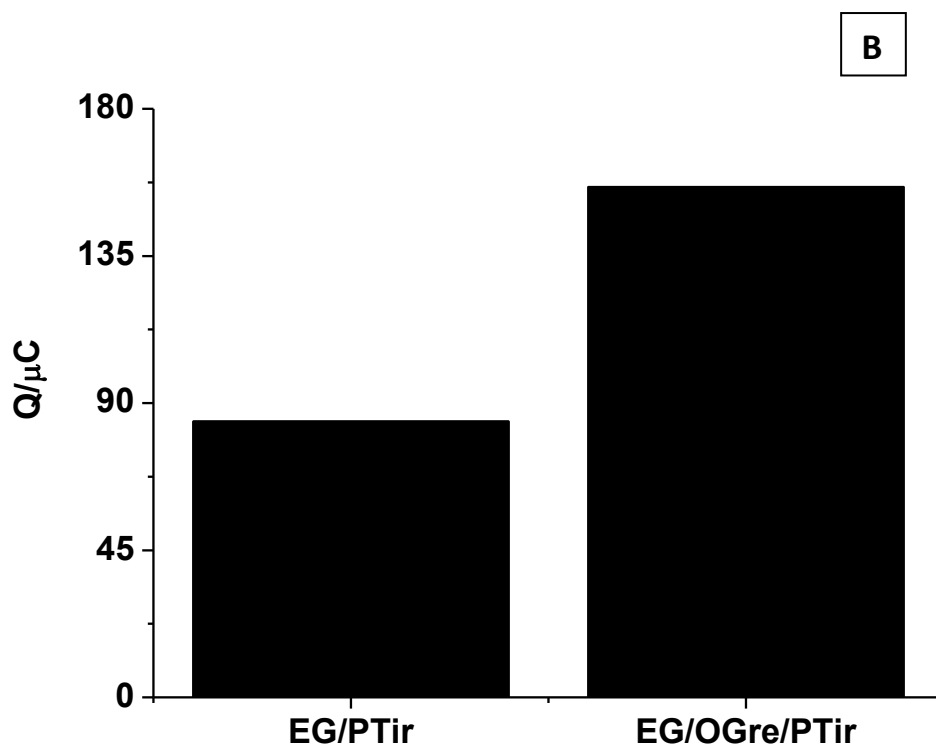
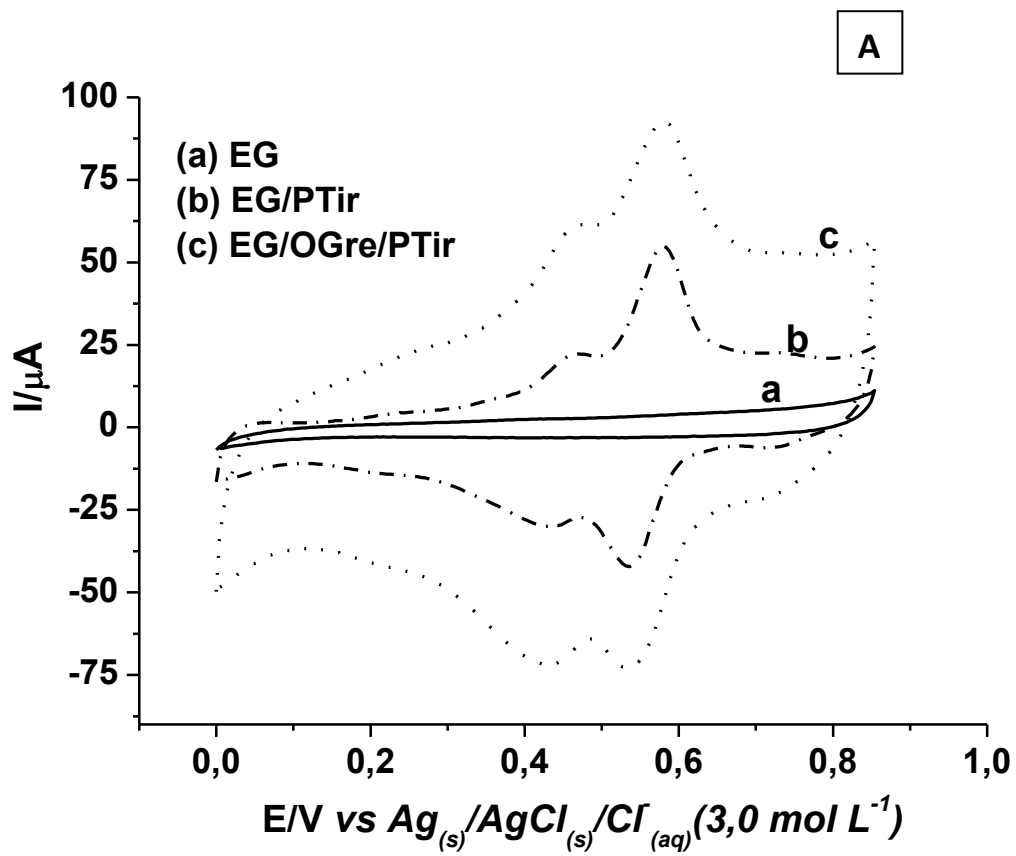
Fonte: Autor, 2016

Pode-se observar que o polímero (EG/PTir) (figura 27A) e o compósito (EG/OGre/PTir) (figura 27B) formados são semelhantes. Entretanto ao se comparar o primeiro ciclo de potencial do EG/PTir e EG/OGre/PTir, nota-se diferenças significativas como realçado na figura 27 C. A oxidação do monômero sobre a superfície do eletrodo de grafite inicia-se em 858 mV, já na superfície do EG/OGre o mesmo começa em 817 mV. Estes valores mostram que a incorporação do OG reduzido eletroquimicamente no EG desloca o valor de início do potencial de oxidação para um potencial menor, indicando que houve uma melhora da transferência eletrônica, facilitando assim a oxidação da tiramina. Esta oxidação do monômero observada no primeiro ciclo, leva à formação do cátion radical para a propagação da eletropolimerização.

Na varredura inversa, pode ser visto a formação de dois pequenos ombros nos potenciais 0,43V e 0,54V na superfície do EG e EG/OGre. Após sucessivos ciclos de voltametria cíclica, ocorre um crescimento e um deslocamento destes ombros para a formação de dois picos de redução sobre o EG em 0,43 V e 0,53 V e; 0,42 V e 0,53 V sobre EG/OGre. Concomitantemente, pode-se observar o aparecimento e crescimento de dois picos de oxidação em 0,45 V e 0,5 V sobre o EG e; 0,46 V e 0,58 V sobre o EG/OGre, ocorrendo uma diminuição do pico de oxidação do monômero devido o consumo do mesmo. Tais valores indicam o crescimento de um material eletroativo sobre o EG e sobre EG/OGre.

Os eletrodos contendo o filme polimérico (EG/PTir) e o nanocompósito (EG/OGre/PTir) foram avaliados em solução de HClO_4 (figura 28) para a oxidação de monômeros restantes na malha polimérica e para observar a resposta redox relativa aos filmes.

Figura 28:(A) Voltamogramas cíclicos do EG (a), e do mesmo modificado com PTir (b) e com OGre/PTir (c), no eletrólito suporte HClO_4 0,5 mol L^{-1} livre de monômero, velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , na janela de 0,00 a 0,85 V. **(B)** Quantidade de carga da varredura anódica referente ao EG modificado com PTir e com OGre/PTir



A figura 28 A mostra que houve modificação da superfície do eletrodo de grafite após a eletropolimerização. Os valores de corrente mostrados na tabela 4 são maiores para o nanocompósito polimérico EG/OGre/PTir produzido em relação ao seu análogo EG/PTir, indicando que o nanomaterial promove elevação de área superficial do eletrodo para formação de maior quantidade de polímero. Para obter maiores evidências, foram avaliados os valores de carga total da varredura anódica (figura 28B) e, foram obtidos os valores de 84,45 μC e 156,2 μC para o EG/PTir e EG/OGre/PTir respectivamente. Estes resultados indicam que a quantidade de politiramina formada sobre a superfície do EG/OGre é 1,85 vezes maior do que no EG sem a incorporação do nanomaterial.

Tal fato pode ser explicado pela presença das funções oxigenadas na superfície do OGre no qual fornecem um aumento de sítios ativos para a eletropolimerização da tiramina. Desta forma a plataforma EG/OGre/PTir foi escolhida para o desenvolvimento do biossensor.

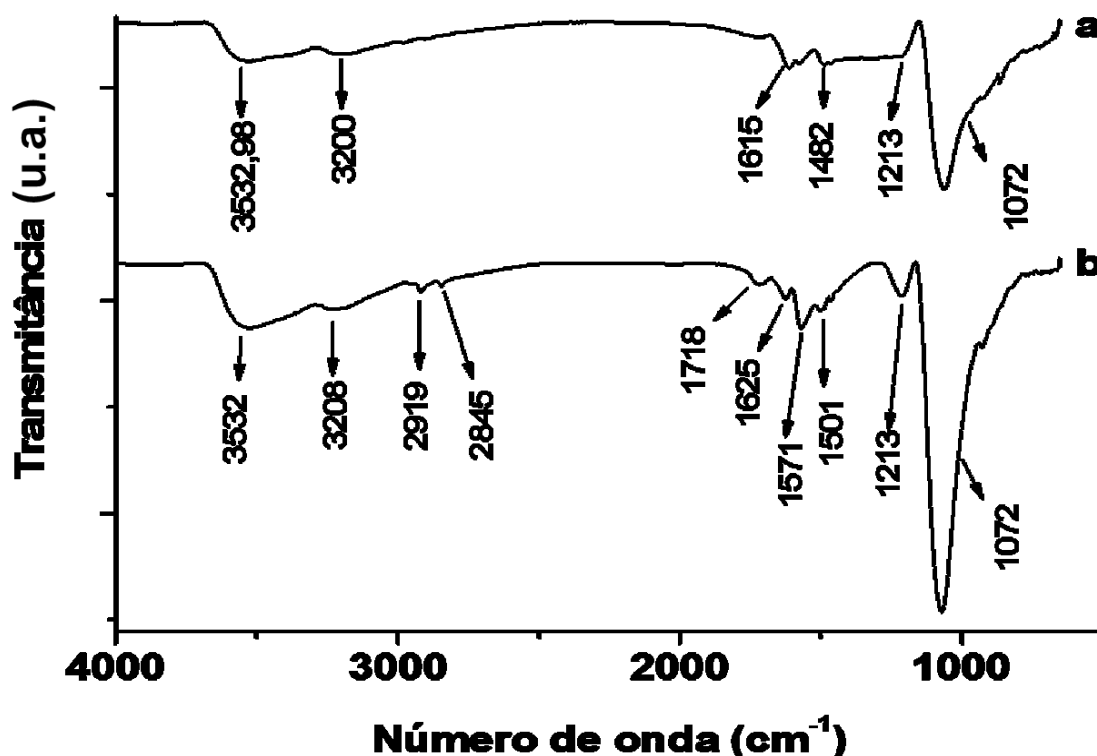
Tabela 4: Valores de potencial e de corrente de pico do EG/PTir e EG/OGre/PTir

	$E_{pa1}/E_{pc1}(V)$	$E_{pa2}/E_{pc2}(V)$
EG/PTir	0,46/0,43	0,58/0,53
EG/OGre/PTir	0,46/0,43	0,58/0,53
	$I_{pa1}/I_{pc1} (\mu A)$	$I_{pa2}/I_{pc2} (\mu A)$
EG/PTir	12,7/22	42,6/34,8
EG/OGre/PTir	20,5/37,5	43,2/42,9

Fonte: Autor

A fim de caracterizar o polímero EG/PTir e o seu nanocompósito análogo EG/OGre/PTir, foi obtido um espectro de infravermelho das superfícies dos eletrodos modificado, que são mostrados na figura 29.

Figura 29: Espectro de infravermelho com Transformada de Fourier do EG modificado com PTir (a) e com OGre/PTir (b).



Fonte: Autor, 2016

As bandas existentes no espectro da politiramina em 3532cm⁻¹, 3200 cm⁻¹, 1615 cm⁻¹e 1482 cm⁻¹ são características do estiramento de O – H, estiramento assimétrico de N – H, estiramento da ligação entre carbonos (-C=C-) de anéis aromáticos e deformação angular de N – H. Já as bandas presentes em 1213 cm⁻¹e 1072 cm⁻¹ evidenciam que a eletropolimerização da tiramina se deu pelo grupamento fenólico com o carbono presente no anel aromático de outro monômero, formando a função éter (C–O–C). Pode-se observar no espectro do nanocompósito EG/OGre/PTir o aparecimento de bandas em 2919 cm⁻¹ e 2845 cm⁻¹que são características de deformação axial de C – H alifático e um aumento das bandas 1213 cm⁻¹ e 1072 cm⁻¹, característicos do estiramento de C–O–C. O surgimento de novas bandas e aumento proporcional de outras, mostra que houve mais formação de politiramina no EG modificado com OGre. A tabela 5 mostra as principais bandas e suas vibrações referentes ao espectro da figura 29.

Tabela 5: Bandas referentes ao espectro de infravermelho com Transformada de Fourier do EG/PTir e EG/OGre/PTir

EG/PTir	Tipo de vibração	Referências
3532cm⁻¹	Vibração deformação axial de O–H	46, 60
3200 cm⁻¹	Estiramento assimétrico de N – H	46, 60
1615 cm⁻¹	Deformação axial entre carbonos (-C=C) de anéis aromáticos	46, 60
1482 cm⁻¹	Deformação angular de N – H	46, 60
1213 cm⁻¹ e 1072 cm⁻¹	Vibração de deformação axial de C – O – C	46, 60
EG/OGre/PTir		
3532 cm⁻¹	Vibração deformação axial de O–H	46, 61
3208 cm⁻¹	Estiramento assimétrico de N – H	46, 61
2919 cm⁻¹ e 2845 cm⁻¹	Deformação axial de C – H alifático	46, 61
1718 cm⁻¹	Deformação axial de C=O	46, 61
1625 cm⁻¹	Deformação axial entre carbonos (-C=C) de anéis aromáticos	46
1571 cm⁻¹ e 1501 cm⁻¹	Deformação angular de N – H	46
1213 cm⁻¹ e 1072 cm⁻¹	Vibração de deformação axial de C – O – C	46

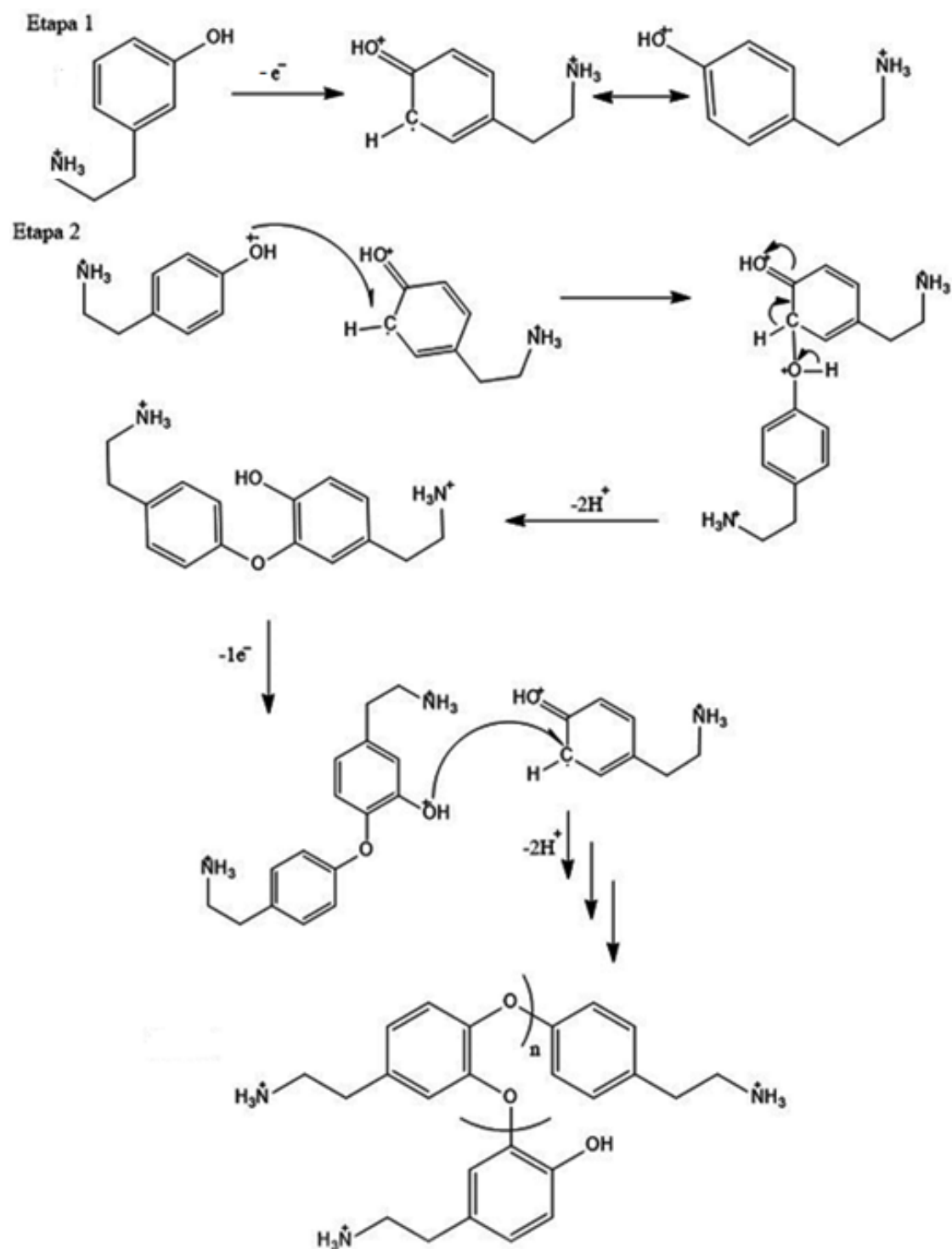
Fonte: Autor

6.4.1. Mecanismo de eletropolimerização da tiramina sobre EG/OGre

Com base nos resultados obtidos, foi proposto um mecanismo de eletropolimerização da tiramina (figura 30) sobre o eletrodo de grafite modificado com OGre em meio ácido, dividindo-se em duas etapas: 1^a) a inicialização ocorre através da oxidação eletroquímica do monômero, formando o cátion radical; 2^a) acoplamento do cátion radical pelo carbono aromático e oxigênio fenólico formando a ligação éter (banda em 1213 cm⁻¹ mostrada na figura 29 b, espectro de infravermelho) e, em seguida, a perda de dois prótons para a reconstituição da aromaticidade. A propagação da polimerização é determinada pela reoxidação do oligômero na superfície do EG/OGre durante os sucessivos ciclos de potencial; a etapa final ocorre no cessar da ciclagem de potencial,

obtendo os filmes adsorvidos na superfície do EG/OGre, formando o compósito polimérico OGre/PTir sobre o EG.

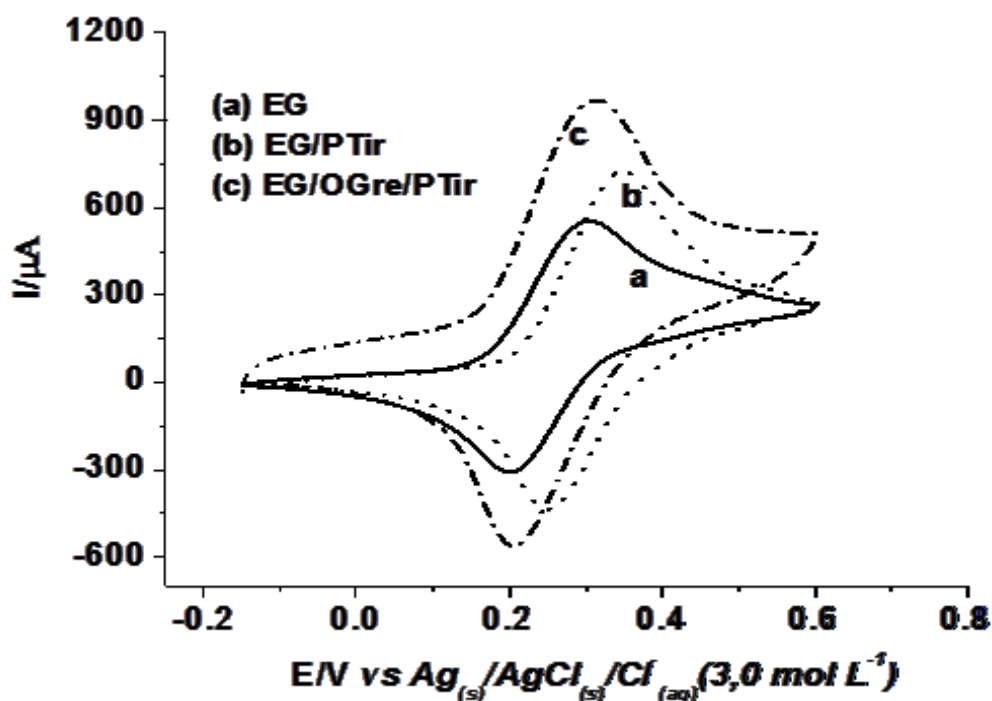
Figura 30: Mecanismo de eletropolimerização da tiramina



6.5. Estudo de transferência de carga

A fim de estudar as propriedades cinéticas de transporte ou troca iônica do EG modificado com PTir e com OGre/PTir, foi realizado um experimento de voltametria cíclica utilizando o par redox de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (sonda aniônica), no qual possibilita a avaliação da difusão das espécies redox contidas na solução. A figura 31 mostra os voltamogramas cíclicos do EG, EG/PTir e EG/OGre/PTir em $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$.

Figura 31: Voltamogramas cíclicos para EG, EG/PTir e EG/OGre/PTir em solução de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), 50 mV/s , na janela de potencial de $-0,15 \text{ V}$ a $+0,6 \text{ V}$, registro após variar 6 ciclos de varredura de potencial.



Fonte: Autor, 2016

A tabela 6 mostra os valores de corrente e de potencial de pico referentes aos voltamogramas da figura 31.

Tabela 6: Valores de corrente e de potencial de pico do EG e do mesmo modificado com PTir e com OGre/PTir

	I _{pa} (μA)	E _{pa} (V)	E _{pc} (V)	E _{pa} -E _{pc} (V)
EG	455	0,29	0,196	0,094
EG/PTir	614	0,346	0,250	0,096
EG/OGre/PTir	708	0,310	0,210	0,100

Fonte: Autor

Os eletrodos de grafite modificados com PTir e com OGre/PTir mostraram um aumento na intensidade de corrente de 614 μA e de 708 μA respectivamente em relação ao eletrodo de grafite sem modificação (455 μA). Tal fato pode ser explicado devido a presença de NH₃⁺ tanto no EG/PTir quanto no nanocompósito EG/OGre/PTir que interage com a sonda negativa, facilitando a transferência eletrônica, aumentando a intensidade de corrente elétrica. Desta forma, as superfícies estudadas, possuem um caráter catiônico e, a inserção do OGre promoveu uma elevação da área superficial no nanocompósito OGre/PTir (com valor de rugosidade de 133 nm) em relação ao EG/PTir (R_q = 122 nm). Pode-se observar também na tabela 6 que ao se adicionar o nanomaterial para a formação do compósito EG/OGre/PTir, tanto o E_{pa} quanto o E_{pc} se deslocam para potenciais menores favorecendo a transferência eletrônica.

6.6. Estudos de reversibilidade

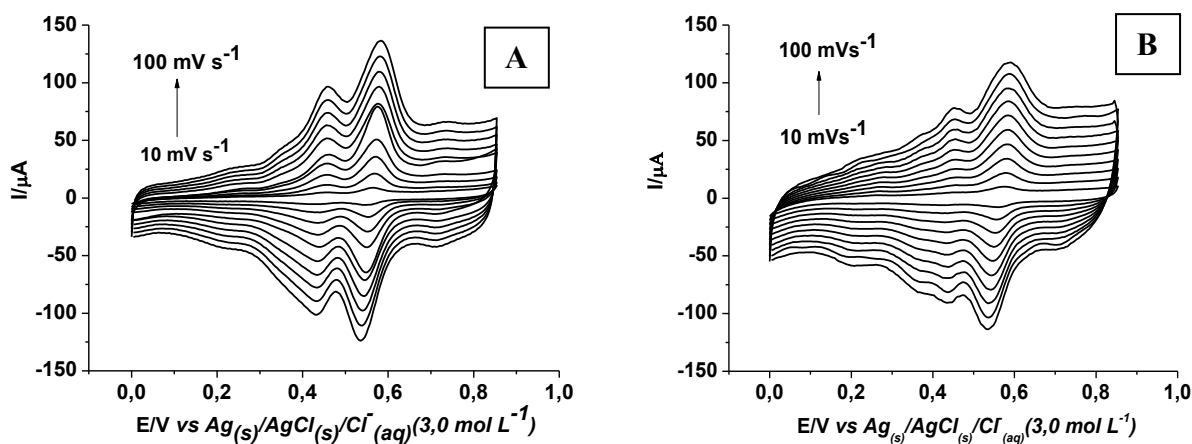
A fim de obter uma melhor compreensão dos processos de eletrossíntese do polímero e do compósito e transferência de massa na interface compreendida entre o seio da solução e a malha polimérica, foi feito um estudo aplicando-se diagnósticos de reversibilidade utilizados na voltametria cíclica.

Sabe-se que os processos eletroquímicos podem ser considerados reversíveis, quase reversíveis ou irreversíveis dependendo da relação entre as taxas de transferência de carga e das taxas de transferência difusional de massa do analito presente na solução até a superfície do eletrodo. Sistemas reversíveis possuem uma transferência de carga superior à taxa de transferência de massa, ou seja, a reação ocorre em velocidades relativamente altas, mantendo um equilíbrio dinâmico na superfície do eletrodo⁶². Nos sistemas irreversíveis, ocorre um aumento da transferência de massa equiparando-se a taxa de

transferência de carga. Neste caso, não se consegue manter um equilíbrio da superfície, ocorrendo assim uma maior separação dos picos anódicos e catódicos com o aumento da velocidade de varredura. O estudo de reversibilidade foi realizado variando-se a velocidade de varredura de 10 mVs^{-1} a 100 mVs^{-1} num intervalo de 10 mVs^{-1} no eletrólito suporte de HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

A figura 32 mostra os voltamogramas cíclicos do EG modificado com PTir e OGr/PTir, variando-se a velocidade de varredura:

Figura 32: Voltametrias cíclicas para o EG/PTir (A) e EG/OGr/PTir (B) em solução de HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, nas velocidade de varredura de 10 mVs^{-1} a 100 mVs^{-1}



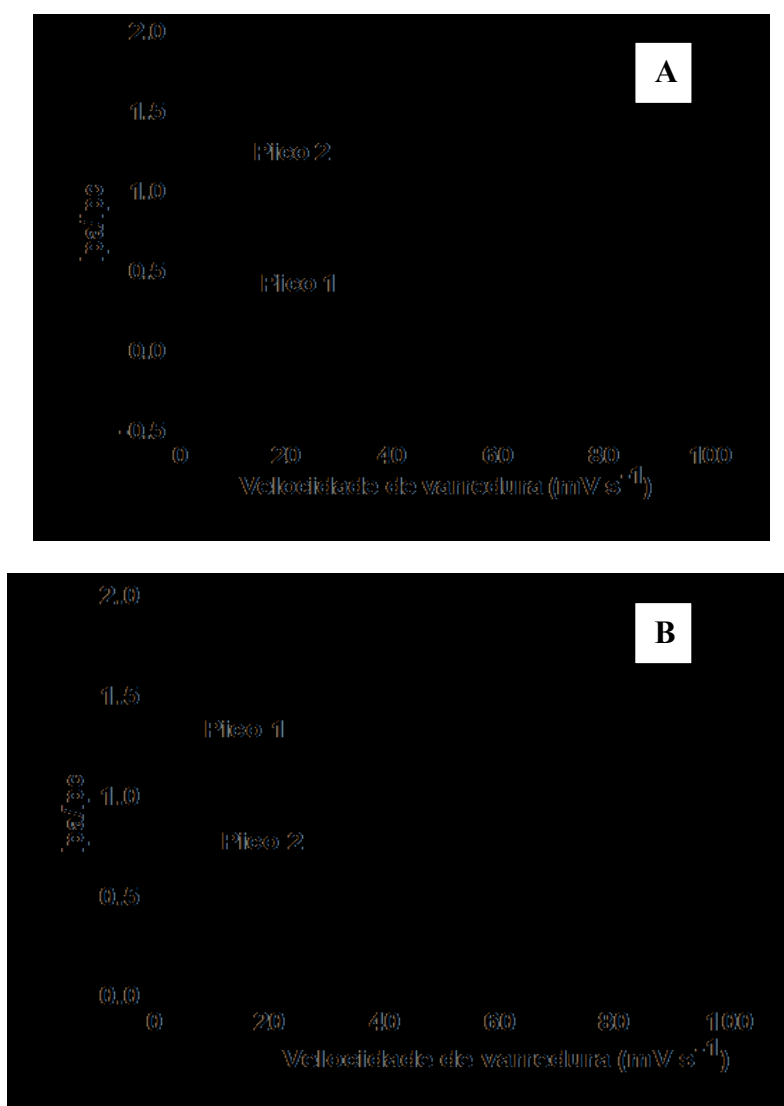
Fonte: Autor, 2016

Pode-se observar na figura 32 que nos voltamogramas correspondentes à politiramina, não houve deslocamentos significativos de potenciais anódicos e catódicos quando se compara ao seu composto análogo, onde houve a incorporação do nanomaterial.

Em seguida, foram aplicados 4 diagnósticos de reversibilidade utilizando-se a voltametria cíclica referente aos picos 1 e pico 2 presentes no polímero e no composto quando analisados no eletrólito suporte HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

A figura 33 mostra a razão do I_{pa}/I_{pc} em função da velocidade de varredura para o EG/PTir e EG/OGr/PTir.

Figura 33: Razão I_{pa}/I_{pc} em função da velocidade de varredura para o do (■) pico anódico e do (▼) pico catódico EG/PTir (A) e EG/OGre/PTir (B)

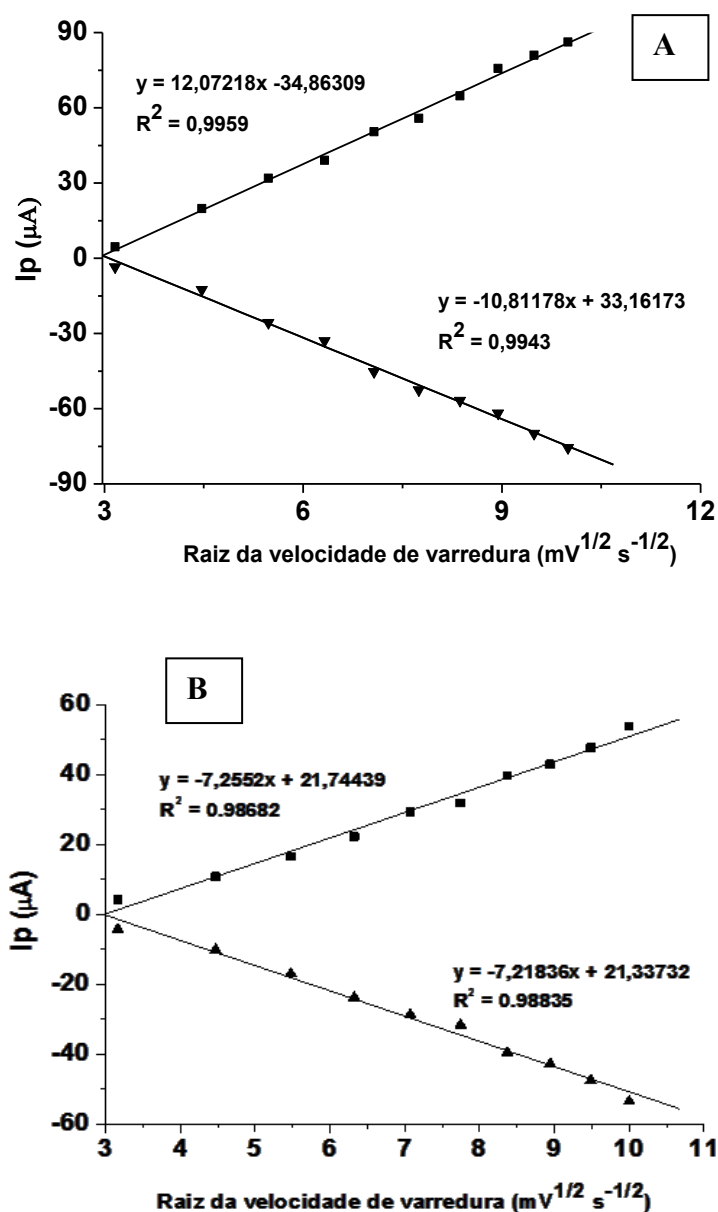


Fonte: Autor, 2016

Analisando-se os gráficos mostrados na figura 33, pode-se observar que a razão I_{pa}/I_{pc} para o pico 2 da PTir sobre o EG é bem próximo de 1 em relação a razão I_{pa}/I_{pc} do pico 1 da politiramina. O mesmo pode ser observado na razão I_{pa}/I_{pc} quando se incorpora o nanomaterial para a formação do composto OGre/PTir, indicando que o processo é quase reversível para o pico 2 tanto no polímero quanto no composto.

Visando comprovar o diagnóstico acima, foi calculado o I_{pa} e o I_{pc} do segundo pico do polímero e do composto e colocado em gráfico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura (figura 34).

Figura 34: Dependência linear das correntes de picos anódico e catódico para o segundo pico da PTir (A) e OGre/PTir (B) em função da raiz quadrada da varredura de potencial.

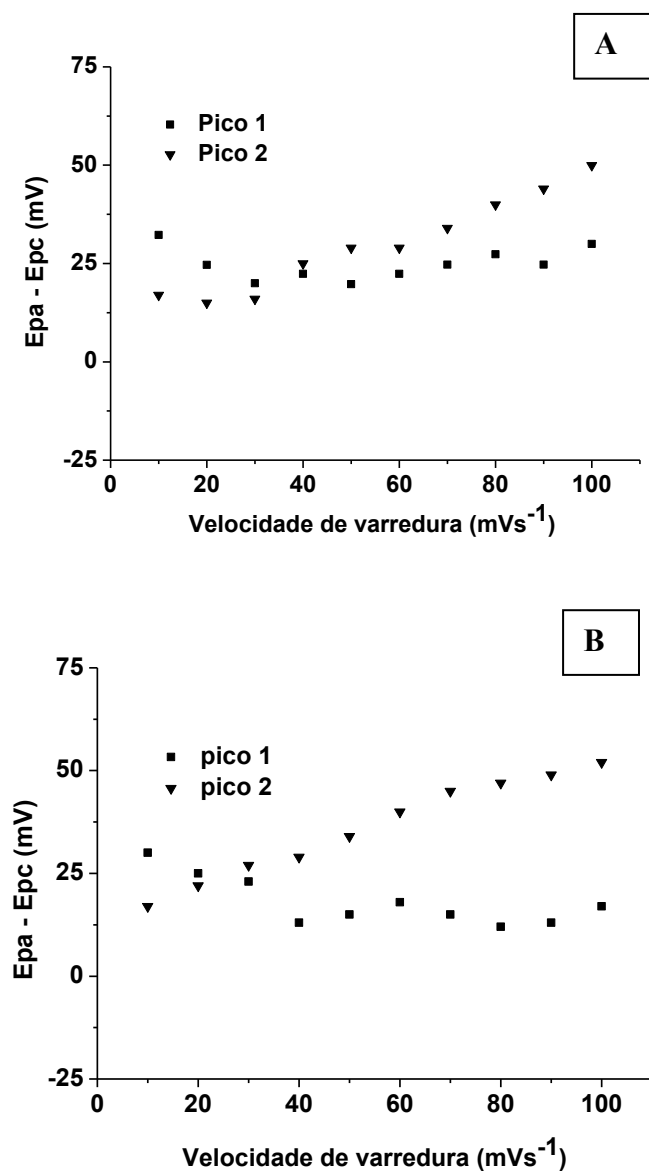


Fonte: Autor, 2016

Pode-se observar que existe uma dependência linear entre o I_{pa} e I_{pc} com a $V^{1/2}$, ou seja, o transporte de massa do seio da solução até a superfície do eletrodo é governado por difusão. Essa dependência linear também sugere que o processo eletródico do par redox 1 e 2 do polímero e do compósito ocorre de forma quase reversível.

A figura 35 mostra o comportamento da diferença de potencial em função da velocidade de varredura de potencial.

Figura 35: ΔE_p em função da velocidade de varredura em solução de HClO_4 0,5 mol L^{-1} do (■) pico anódico e do (▼) pico catódico para os eletrodos de EG modificados com PTir (A) e OGre/PTir (B).



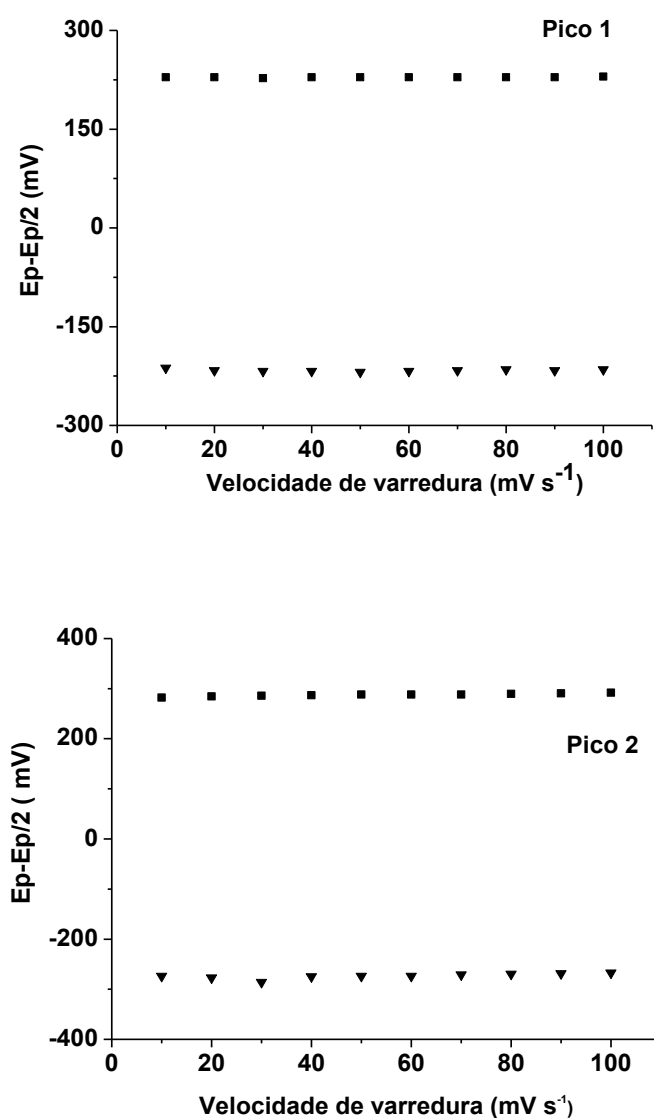
Fonte: Autor, 2016

Pode-se observar que, para os valores de ΔE_p para o pico 1 da PTir e do composto OGre/PTir, não houve uma variação pronunciada. Já para o segundo pico houve um aumento dos valores de ΔE_p de 10 a 75 mV para a PTir e 16,5 mV a 51,0 mV para o

OGre/PTir, ocasionado pelo aumento da velocidade de varredura, no qual é uma característica de sistema quase reversível.

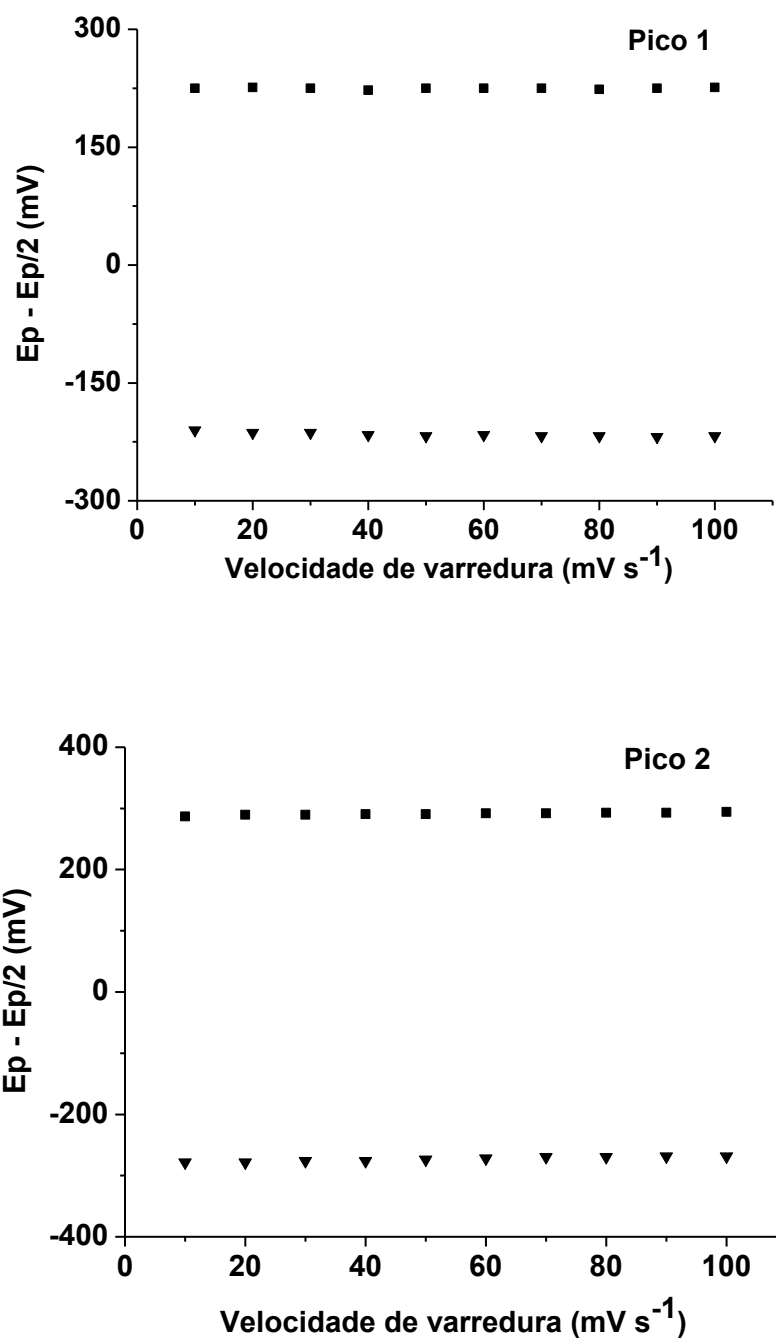
As figuras 36 e 37 mostram os valores de $E_p - E_{p/2}$ de pico anódico e pico catódico obtidos para o EG/PTir e EG/OGre/PTir respectivamente em função do incremento da velocidade de varredura. Pode-se observar que tanto o pico 1 quanto o pico 2 do polímero e do compósito apresentaram apenas 1 patamar constante de potencial, indicando que o processo é quase reversível.

Figura 36: Variação do $E_p - E_{p/2}$ vs a velocidade de varredura em HClO_4 0,5 mol L^{-1} do (■) pico anódico e do (▼) pico catódico para os eletrodos modificados com EG/PTir.



Fonte: Autor, 2016

Figura 37: Variação do $E_p - E_{p/2}$ vs a velocidade de varredura em HClO_4 0,5 mol L^{-1} do (■) pico anódico e do (▼) pico catódico para os eletrodos modificados com EG/OGre/PTir



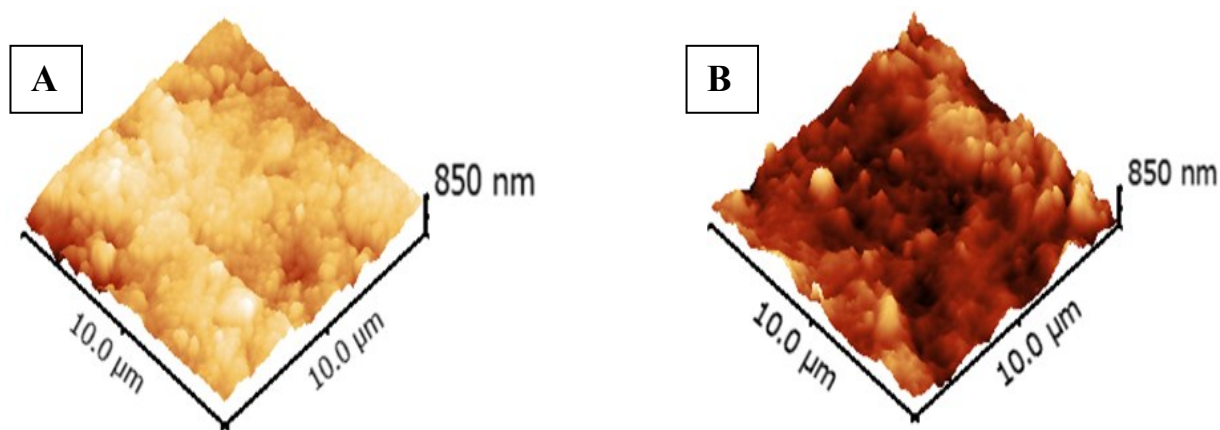
Fonte: Autor, 2016

Os resultados obtidos da aplicação dos diagnósticos de reversibilidade mostraram a possibilidade das transições redox da politiramina e do composto OGre/PTir serem classificadas como sendo quase reversíveis. Ao passo que o transporte de massa dos íons H_3O^+ e ClO_4^- no interior da malha polimérica foi conduzido pelo processo difusional. Este tipo de transporte de massa também deve predominar durante o processo de eletropolimerização da politiramina sobre o EG e sobre EG/OGre, pois a concentração do eletrólito suporte HClO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) foi 200 vezes superior à concentração de monômero ($2,5 \text{ mmol L}^{-1}$), minimizando assim o transporte por migração. Vale ressaltar também que durante estes experimentos não houve perturbação externa, para não ocorrer transporte de massa por convecção.

6.7. Caracterização morfológica

A figura 38 mostra as imagens topográficas do eletrodo de grafite modificado com politiramina e com óxido de grafeno reduzido/politiramina.

Figura 39: Imagens de microscopia de força atômica do EG/PTir (A) e EG/OGre/PTir (B).

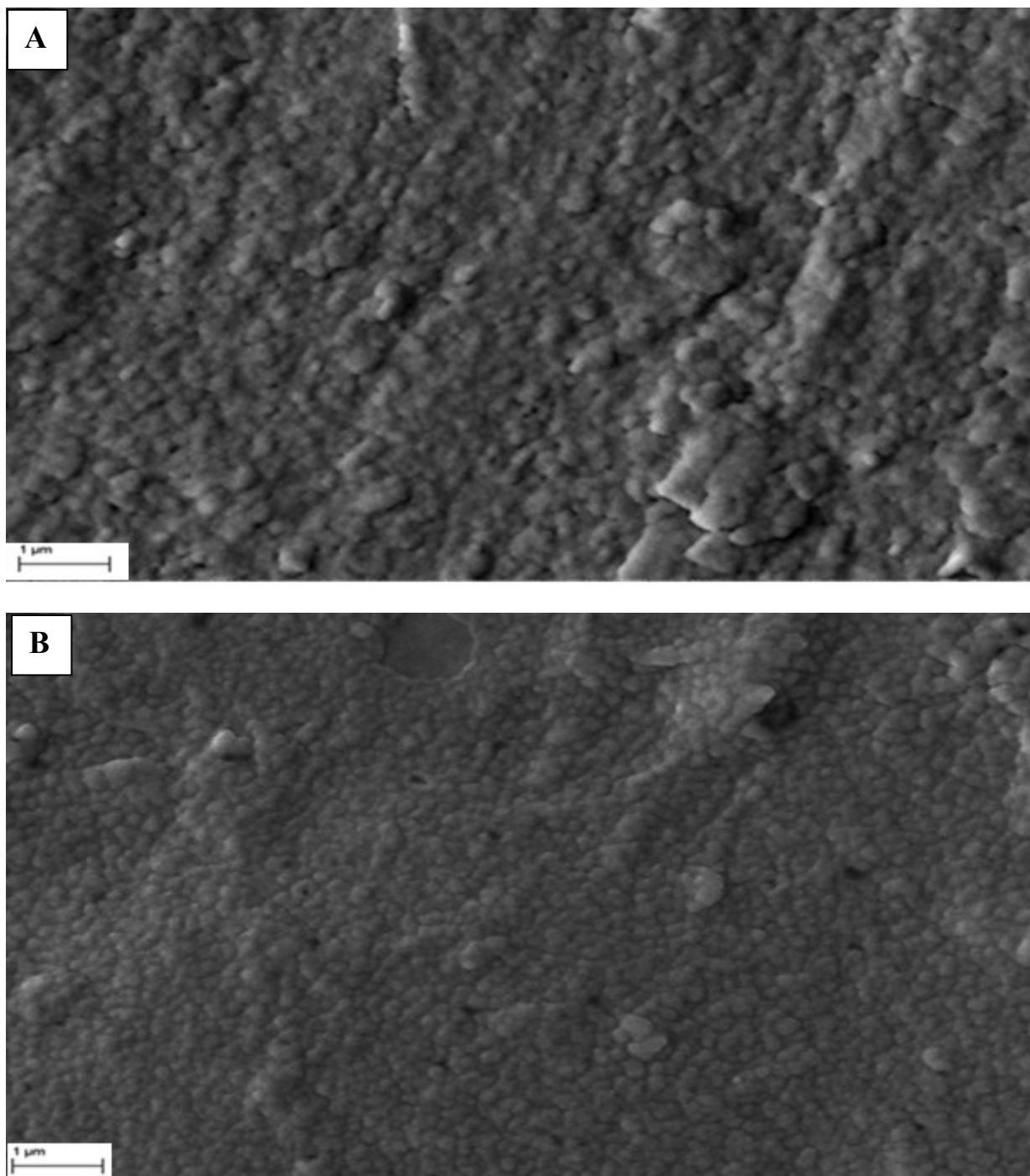


Fonte: Autor, 2016

Pode-se observar que houve um aumento da rugosidade quando se adiciona o nanomaterial para a formação do composto EG/OGre/PTir ($R_q = 133$) em relação ao EG/PTir ($R_q = 122$). Tal fato pode ser explicado pelo aumento da área ativa do eletrodo ocasionado pelo OGre, facilitando a formação de maior quantidade de filme.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura mostradas na figura 39 estão em consonância com os resultados de AFM.

Figura 39: Imagens de microscopia eletrônica de varredura do EG/PTir (A) e EG/OGre/PTir (B) na magnitude de 35000x, com voltagem de 20.00 kV.



Pode-se observar que a morfologia da politiramina possui um caráter mais globular. Quando se incorpora o nanomaterial na superfície para produzir o nanocompósito

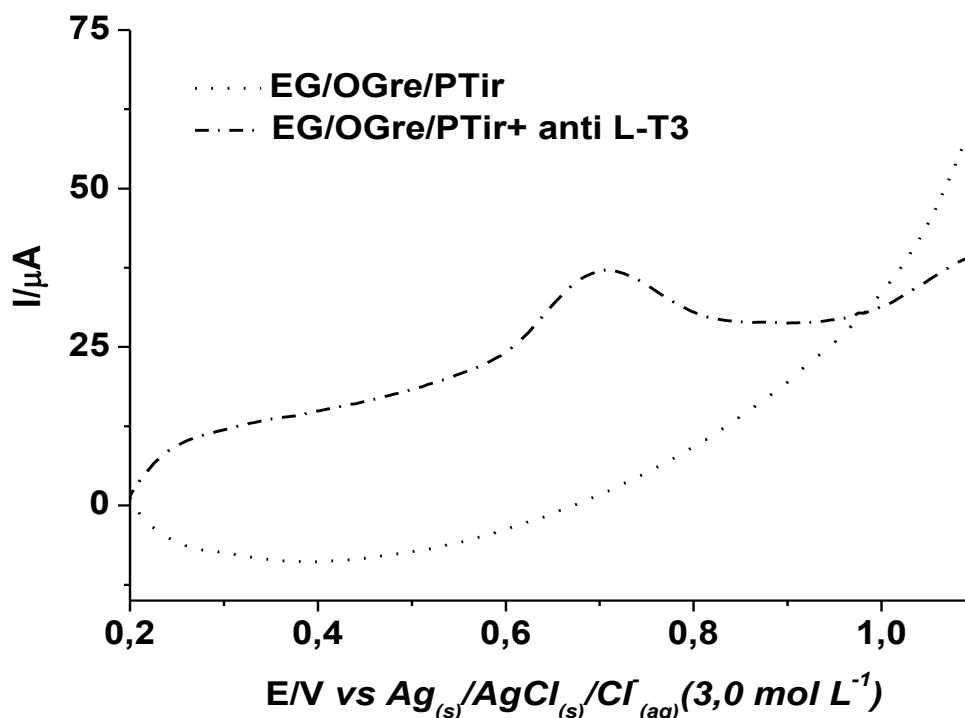
polimérico OGre/PTir, ocorre uma maior homogeneização destes glóbulos, aumentando a área superficial do eletrodo.

6.8. PREPARAÇÃO DO IMUNOSENSOR

Após a caracterização da plataforma desenvolvida (EG/OGre/PTir), foram feitos estudos sobre as melhores condições de incorporação do anticorpo anti L-triiodotironina (sonda – anti L-T3) sobre a plataforma, como a concentração, pH e tempo de imobilização. Tais análises são imprescindíveis para a otimização do sistema e posterior detecção do alvo L-triiodotironina (L-T3).

Inicialmente o anticorpo foi imobilizado por adsorção sobre o EG/OGre/PTir e detectado diretamente por voltametria de pulso diferencial, visando conhecer o seu comportamento eletroquímico no eletrodo utilizado. A figura 40 mostra a resposta eletroquímica do anti L-T3 sobre EG/OGre/PTir.

Figura 40: Voltamograma de pulso diferencial do anti L-T3 sobre o EG/OGre/PTir em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4 na janela de +0,15 V a +1,1 V, 30 mVs⁻¹.

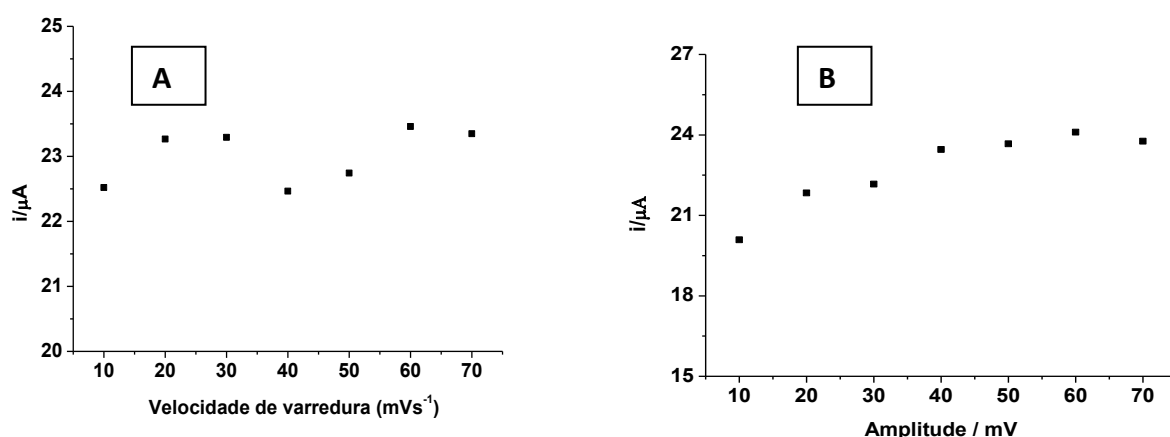


Pode-se observar na figura 40, que o anti L-T3 apresentou dois picos de oxidação: um em +0,7 V e outro não tão pronunciado em +1,09V. Estes picos são característicos da oxidação do triptofano presente na estrutura do anticorpo. O primeiro pico de oxidação do triptofano corresponde a oxidação do carbono 2 do anel pirrólico levando à geração de uma espécie de 2-oxi-indol. Já o segundo pico corresponde à oxidação do anel de benzeno para a formação de outra espécie 2,7-oxi-indol^{63, 64}.

Como o pico se encontra em 0,7 V, a faixa de análise dos voltamogramas posteriores será na janela de potencial de +0,4Va +1,0V.

Após a verificação do comportamento eletroquímico da sonda, foram padronizados os parâmetros da voltametria de pulso diferencial: a velocidade de varredura e a amplitude para as demais análises (figura 41).

Figura 41: Variação da corrente em função da velocidade de varredura (A) e da amplitude (B) Todas as medidas foram realizadas descontando a linha de base.



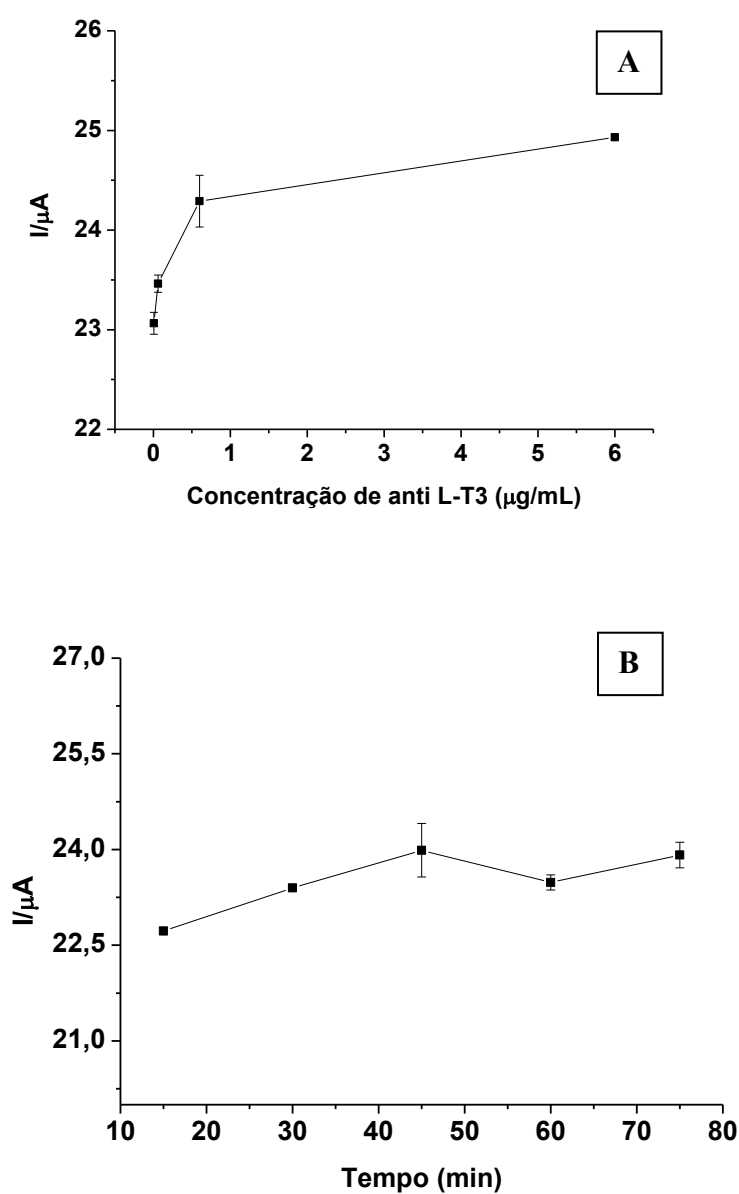
Fonte: Autor, 2016

Pode-se observar que não houve uma variação muito grande de corrente à medida que se variou a velocidade de varredura e a amplitude. Neste sentido, fixou-se a velocidade de $30 mVs^{-1}$ por apresentar o segundo maior valor de corrente e por ser uma velocidade relativamente baixa em relação a de $60 mVs^{-1}$. Já para a amplitude, fixou-se 60 mV por ter apresentado o maior valor de corrente.

6.8.1. Padronização das condições de imobilização da sonda

Após a padronização dos parâmetros da voltametria de pulso diferencial, variou-se a concentração de anti L-T3 com os seguintes valores: 6,0 ng/mL, 60,0 ng/mL, 0,60 µg/mL e 6,0 µg/mL, a serem imobilizados por adsorção na superfície do EG/OGre/PTir (figura 42).

Figura 42: Variação da corrente em função da concentração de anticorpo (A) e do tempo de imobilização (B).



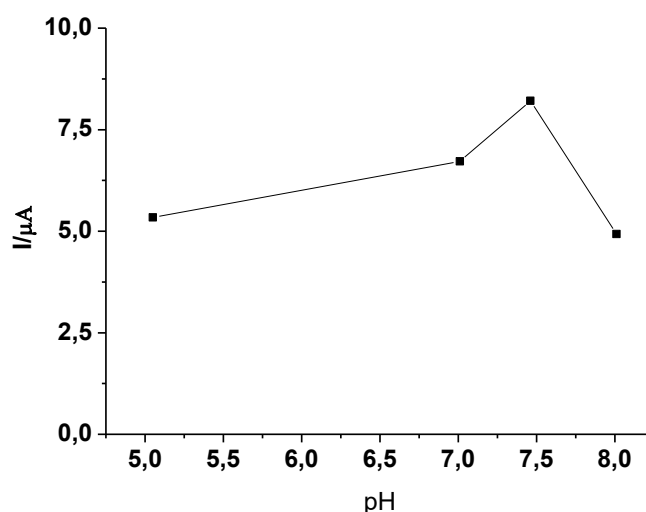
Fonte: Autor, 2016

Pode-se observar que não ocorre variação significativa da intensidade de corrente elétrica, indicando que ocorre saturação da superfície do eletrodo à medida que se aumenta a concentração de anti L-T3. Desta forma, fixou-se o valor de 6,0 ng/mL de anticorpo.

Posteriormente, foi feita a padronização do tempo de interação da sonda com a plataforma, variando-se os intervalos de 15 min, 30 min, 45 min, 60 min e 75 min. Pode-se observar na figura 42B que o melhor tempo para imobilização da sonda foi de 45 minutos, apesar de não haver variação significativa de corrente à medida que aumenta o tempo de interação da sonda com plataforma.

O pH de imobilização da sonda também foi avaliado, variando-se o mesmo nos valores de 5,05; 7,01; 7,46 e 8,01. Pode-se observar na figura 43 que o melhor pH de imobilização da sonda foi de 7,46, sendo o pH fisiológico.

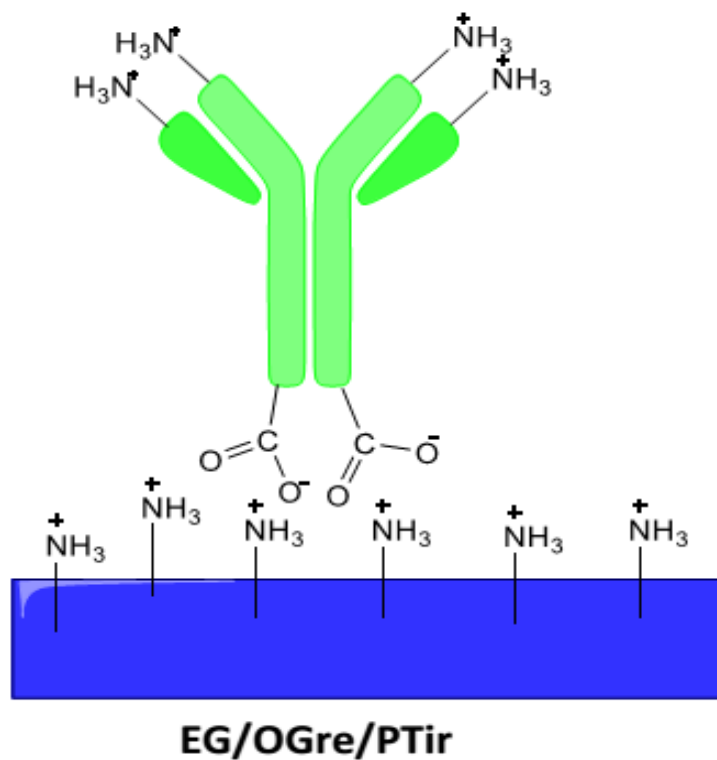
Figura 43: Variação da corrente em função da concentração do pH de imobilização da sonda.



Fonte: Autor, 2016

Como indicado no esquema da figura 44, foi possível sugerir um modelo de interação da sonda anti L-T3 com o EG/OGre/PTir. Os íons amônios presentes no compósito OGre/PTir podem se interagir com os grupos carboxílicos da porção Fc do anticorpo anti L-T3, no qual vai direcionar a porção Fab para cima, visando o reconhecimento do anticorpo com o antígeno.

Figura 44: Modelo sugerido da interação do anticorpo com a plataforma EG/OGre/PTir.

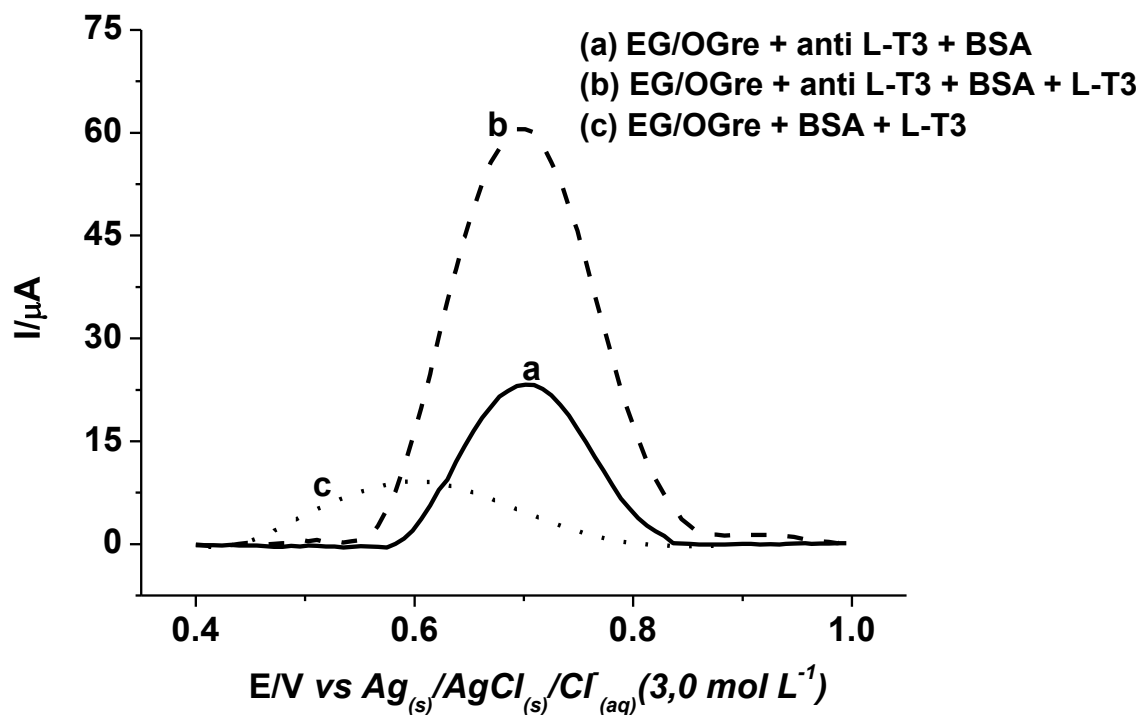


Fonte: Autor, 2016

Após a incorporação da sonda sobre o EG/OGre/PTir, torna-se necessário fazer um bloqueio da superfície com BSA (soroalbumina bovina), para evitar interação inespecífica do alvo complementar com a superfície do eletrodo onde o anticorpo não ficou aderido. Para isso, a superfície contendo a sonda ficaram imersos numa solução de BSA 5,0% durante uma hora, lavados em tampão e posteriormente submetidos à presença do alvo.

A figura 45 mostra a detecção direta do antígeno L-T3, utilizando-se a plataforma desenvolvida.

Figura 45: Voltamograma de pulso diferencial do anti L-T3 (6,0 ng/ml) + BSA (5 %) (a), anti L-T3 + BSA + L-T3 (b) e BSA + L-T3 (5,0 ng/mL) (c) sobre o EG/OGre/PTir em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4, numa velocidade de varredura de 30 mV s⁻¹, com amplitude de pulso de 60 mV.



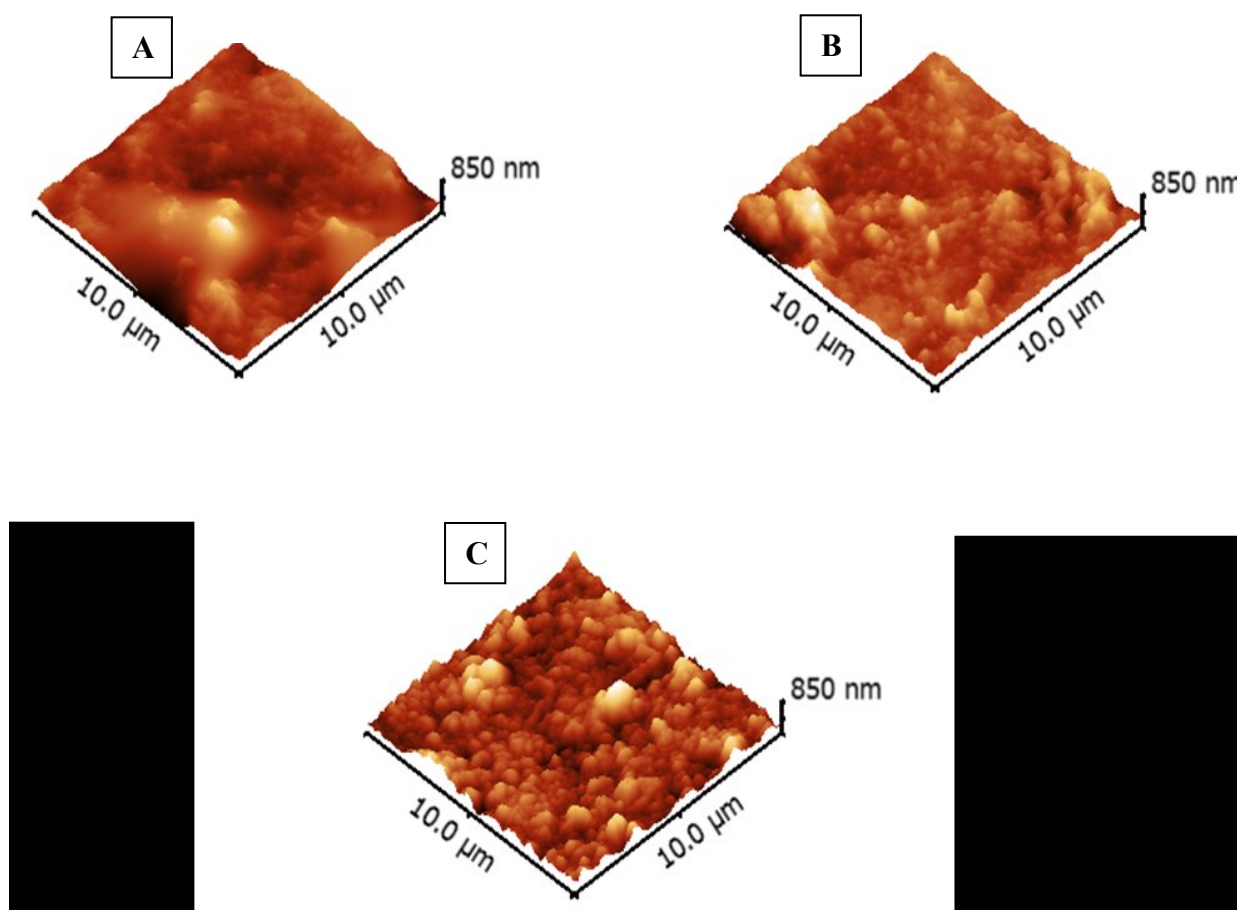
Fonte: Autor, 2016

Pode-se observar que mesmo o alvo L-T3 é eletroativo na superfície do EG/OGre/PTir recoberto com BSA na ausência do anticorpo. Ele responde eletroquimicamente em 0,6 V com pequena intensidade de corrente. Quando o mesmo interage com a sonda, formando o complexo anticorpo-antígeno, ocorre um deslocamento de potencial para 0,7 V e ao mesmo tempo, ocorre um aumento de intensidade de corrente elétrica para 60 μA. Provavelmente, a interação do anticorpo com o antígeno está ocorrendo de tal forma que, uma maior quantidade de aminoácidos de triptofano estão ficando expostos e mais passíveis de serem oxidados, aumentando assim o sinal de corrente.

6.8.2. Caracterização morfológica

Para estudar a superfície do biossensor, o mesmo foi caracterizado morfolologicamente por meio de imagens de AFM e de MEV. A figura 46 mostra as imagens de microscopia de força atômica.

Figura 46: Imagens de microscopia de força atômica do EG/OGre/PTir contendo os seguintes materiais biológicos: (A) Anti L-T3 (sonda), (B) Anti L-T3 + BSA (sonda + BSA) e (C) Anti L-T3 + BSA + L-T3 (sonda + BSA + alvo).



Fonte: Autor, 2016

Pode-se observar que no EG/OGre/PTir após adicionar o anti L-T3 sobre a superfície do mesmo, ocorre diminuição do valor de rugosidade, como mostrado na tabela 7. Tal fato acontece provavelmente devido ao anticorpo preencher os vales existentes na

estrutura do EG/OGre/PTir. Ao passo que o bloqueio da superfície com o BSA promove um aumento da rugosidade, pois o BSA é uma proteína globular utilizada no bloqueio da superfície do eletrodo onde o anticorpo não ficou imobilizado, visando minimizar interações inespecíficas. Após a interação do anticorpo com o antígeno observa-se também que houve um aumento da rugosidade.

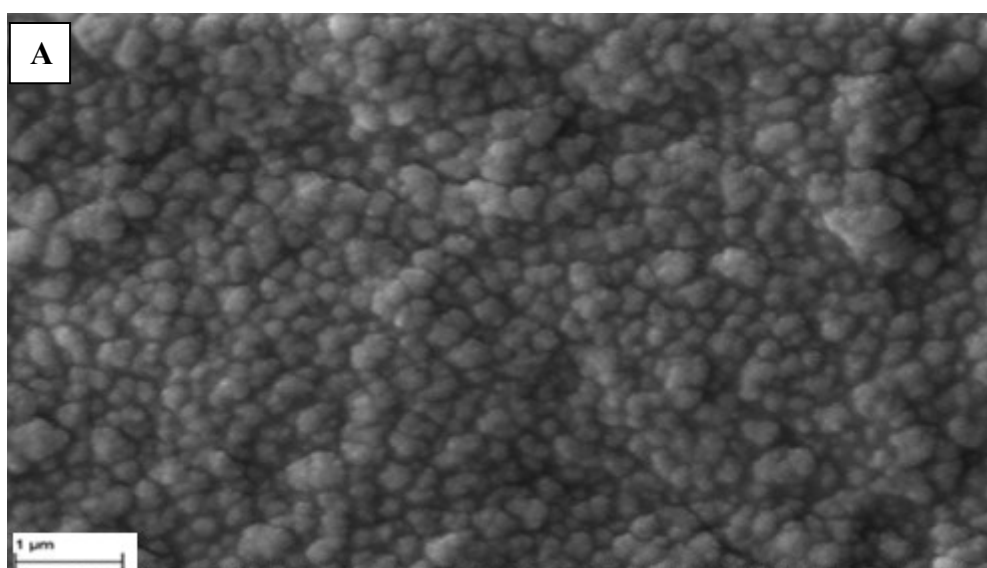
Tabela 7: Valores de rugosidade

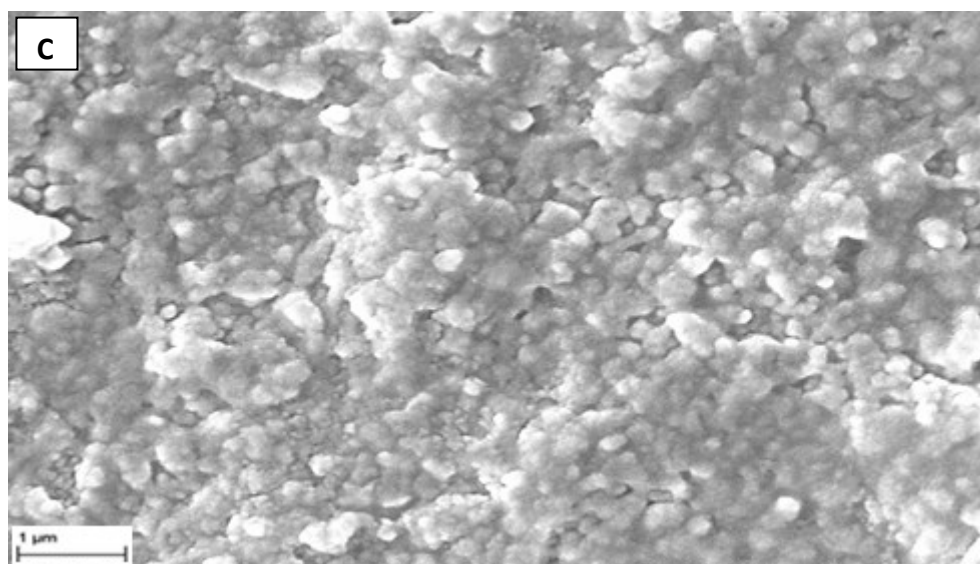
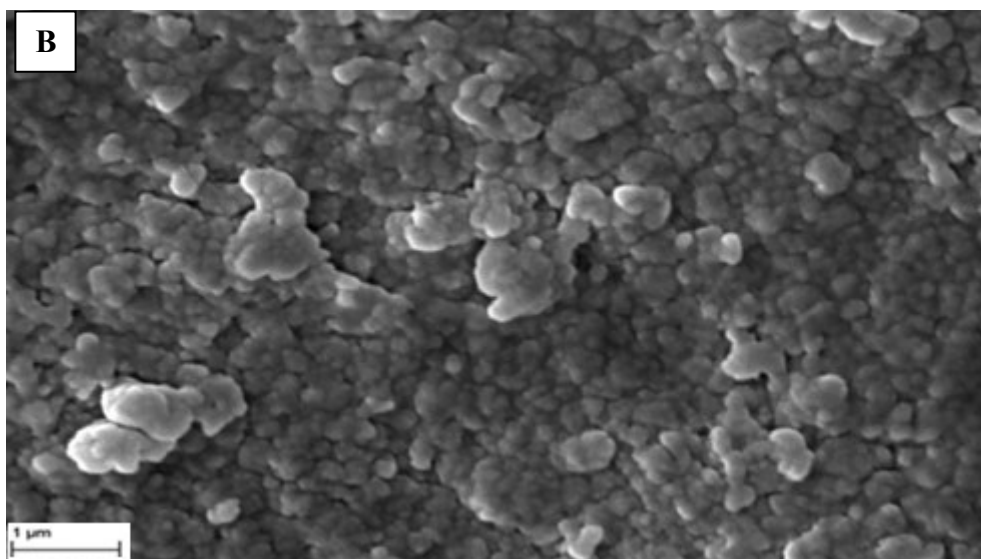
Material	Rq (nm)
EG/OGre/PTir	132
EG/OGre/PTir + anti L-T3	109
EG/OGre/PTir + anti L-T3 + BSA	121
EG/OGre/PTir + anti L-T3 + BSA + L-T3	136

Fonte: Autor

A plataforma EG/OGre/PTir sensibilizada com o anticorpo, anticorpo/bloqueio e anticorpo/bloqueio/alvo foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de varredura. A figura 47 mostra as imagens referentes ao MEV.

Figura 47: Imagens de microscopia eletrônica de varredura do EG/OGre/PTir contendo os seguintes materiais biológicos: (A) Anti L-T3 (sonda), (B) Anti L-T3 + BSA (sonda + BSA) e (C) Anti L-T3 + BSA + L-T3 (sonda + BSA + alvo), na magnificação de 35000x, com voltagem de 20.00 kV.





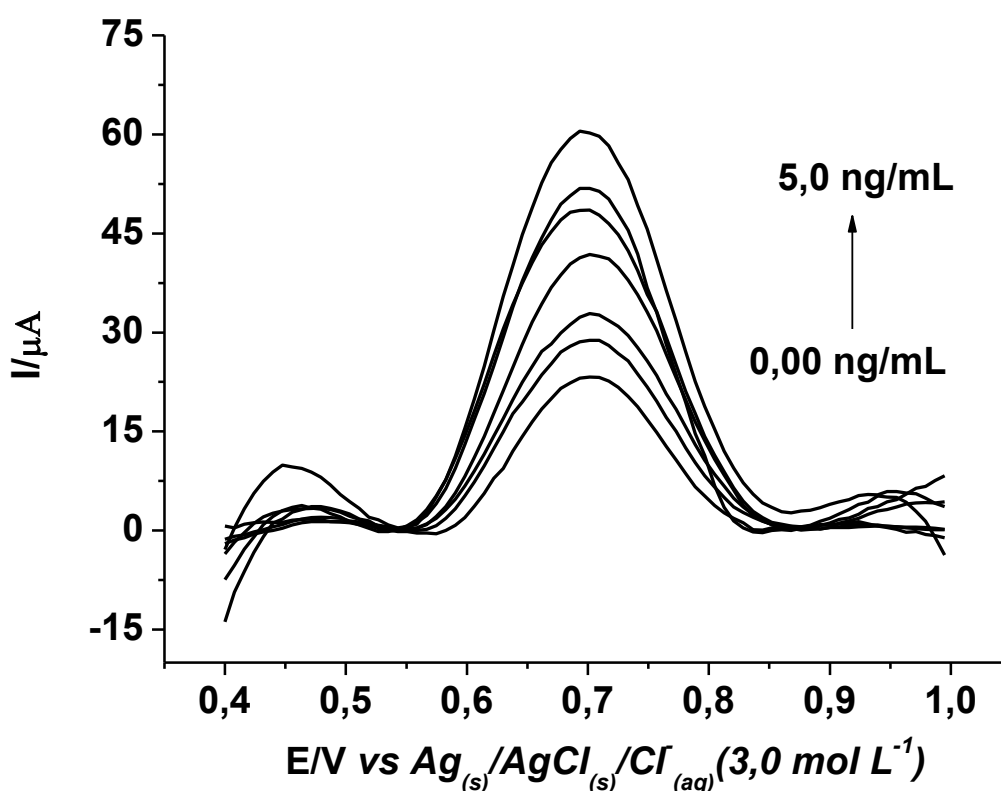
Fonte: Autor, 2016

As imagens de microscopia eletrônica de varredura mostradas na figura 47 evidenciam que o anticorpo (anti L-T3) apresentou uma estrutura com pequenos glóbulos sobre a plataforma desenvolvida. Quando se adiciona o BSA, o mesmo bloqueia a superfície do eletrodo onde não se ligou o anticorpo. Desta forma, pode ser observada alteração na morfologia, apresentando glóbulos maiores. Ao se adicionar o antígeno, houve mudança do aspecto para um formato devido a formação do imunocomplexo anticorpo-antígeno.

6.8.3. Construção da curva analítica

Após a otimização do sistema para a construção do biossensor e o estudo da interação anticorpo-antígeno, bem como o seu comportamento eletroquímico, foi feita a curva de calibração variando-se a concentração de L-T3 de 0,001 ng/mL, 0,005 ng/mL, 0,05 ng/mL, 0,25 ng/mL, 0,5 ng/mL e 5,0 ng/mL, fixando-se a concentração de 6,0 ng/mL de anticorpo. A figura 48 mostra os voltamogramas de pulso correspondentes à variação da concentração de alvo (L-triiodotironina).

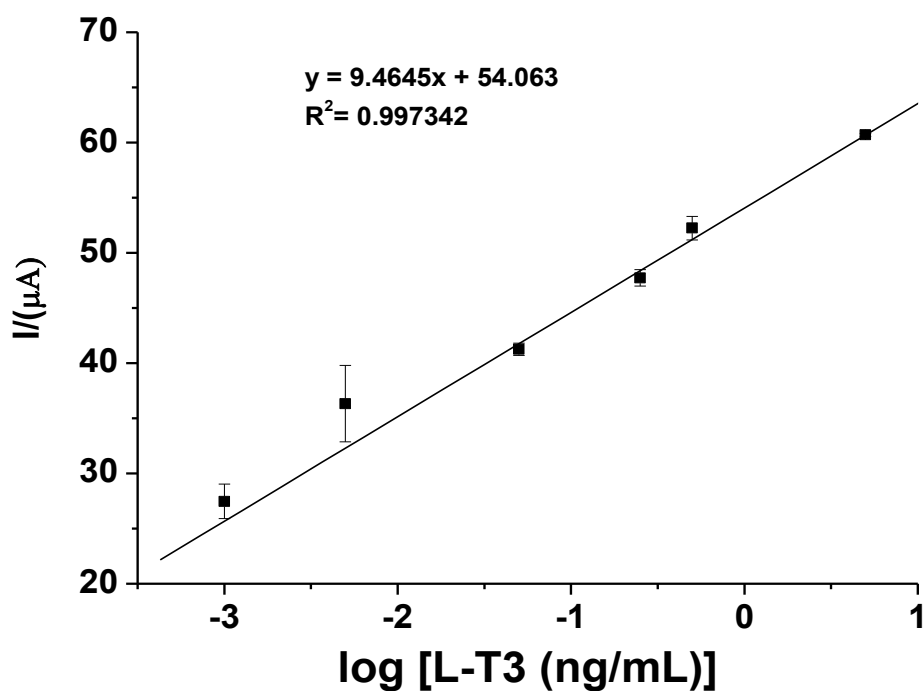
Figura 48: Voltamogramas de pulso diferencial do EG modificado com OGr/PTir após a adição de 20 μL de 6,0 ng/mL de anti L-T3, bloqueado com BSA 5,0% + 20 μL de L-T3 nas seguintes concentrações: 0,00 ng/mL, 0,001 ng/mL, 0,005 ng/mL, 0,05 ng/mL, 0,25 ng/mL, 0,5 ng/mL e 5,0 ng/mL, em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH 7,4, 30 mVs^{-1} , amplitude de pulso de 60 mV.



Fonte: Autor, 2016

A figura 49 mostra a curva de calibração para diferentes concentrações de alvo frente à plataforma desenvolvida EG/OGre/PTir sensibilizada com anti L-T3.

Figura 49: Curva de calibração do L-T3



Fonte: Autor, 2016

A análise de regressão linear de corrente (μA) versus o logaritmo das concentrações de antígeno 0,001 ng/mL, 0,005 ng/mL, 0,05 ng/mL, 0,25 ng/mL, 0,5 ng/mL e 5,0 ng/mL (figura 51) mostra o perfil de linearidade ($R^2 = 0,997342$). Estes resultados são promissores no desenvolvimento do biossensor, uma vez que a concentração detectada de 0,001ng/mL é menor do que a concentração do analito existente no sangue humano ($[\text{L-T3}_{\text{total}}] = 0,6 \text{ ng/mL a } 1,81 \text{ ng/mL}$)⁵. Concentrações de L-T3 acima de 1,81 ng/mL e abaixo de 0,6 ng/mL, o paciente pode vir a desenvolver hipertireoidismo e hipotireoidismo respectivamente. Um baixo limite de quantificação possibilita uma análise do analito com um pequeno volume de amostra.

7.0. CONCLUSÕES

- ✓ A redução do nanomaterial óxido de grafeno foi realizada com sucesso sob EG;
- ✓ A inserção do nanomaterial promoveu o aumento da área superficial do eletrodo de grafite;
- ✓ Testes de diagnóstico de reversibilidade aplicados EG/Pt_{ir} e EG/OGre/Pt_{ir}, indicaram que o processo de transferência eletrônica é reversível.
- ✓ Análises por VPD mostraram que o imunossensor desenvolvido foi capaz de detectar o L-T3 em baixas concentrações;
- ✓ O aumento progressivo das concentrações de alvo 0,001 ng mL⁻¹, 0,005 ng mL⁻¹, 0,05 ng mL⁻¹, 0,25 ng mL⁻¹, 0,5 ng mL⁻¹ e 5,0 ng mL⁻¹ foram detectadas e diferenciadas pelo biossensor desenvolvido.
- ✓ A corrente mensurada mostrou linearidade em função do logaritmo da concentração de L-T3 com faixa linear de resposta de 0,001 ng mL⁻¹ a 5,0 ng mL⁻¹ de L-T3, com $R^2 = 0,997342$.
- ✓ Tais resultados são promissores no desenvolvimento do biossensor, uma vez que a concentração detectada de 0,001 ng mL⁻¹ é menor do que a concentração do analito existente no sangue humano ([L-T3_{total}] = 0,6 ng mL⁻¹ a 1,81 ng mL⁻¹).

8.0. ESTUDOS FUTUROS

Como propostas futuras, o sistema poderia ser miniaturizado através da utilização de eletrodos impressos, tornando mais adequados para uma futura comercialização. Fazer detecções indiretas da sonda e alvo utilizando sondas redox.

Outra proposta futura seria o desenvolvimento de um biossensor para detecção do hormônio TSH (hormônio estimulante da tireoide) que, associado ao biossensor desenvolvido para a detecção de L-T3, poderia fornecer mais informações ao médico e ao paciente sobre as desordens metabólicas provocadas pelo mau funcionamento da tireoide ou pelo desbalanço hormonal.

9.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. STATHATOS, N. **Thyroid Physiology**. Medical Clinics of North America, v. 96, p. 165–173, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2012.01.007>
2. HASSAN, Y., ABOUL-ENEIN, STEFAN, R. I.; LITESCU, S.; RADU, G.L. **Biosensor for the enantioselective analysis of the thyroid hormones (+)-3,3',5-triiodo-L-thyronine (T3) and (+)-3,3',5,5'-tetraiodo-L-thyronine (T4)**. Journal immunoassay & Immunochemistry, v.23 (2), p.181–190, 2002. <https://doi.org/10.1081/IAS-120003660>
3. CABELLO, G.; WRUTNIAK, C. **Pituitary-Thyroid Axis Sensitivity and Neonatal Changes in Plasma Iodothyronine, Thyreostimulin, and Cortisol Levels in the Preterm Lamb: Comparison of Two Experimental Models**. Reproduction Nutrition Development, v. 29, p.387–402, 1989. <https://doi.org/10.1051/rnd:19890401>
4. GLESS, K-H; OSTER, P.; HUFNER, M. **Influence of D-Thyroxine on Plasma Thyroid Hormone Levels and TSH Secretion**. Hormone and Metabolic Research, v.9, p. 69–73, 1977. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1093587>
5. KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Farmacologia básica e clínica**, 12ª. Edição, página 683, 2014.
6. BLATT, J. M.; LANDMANN, Z. M. **Alterações nas dosagens do hormônio tireoestimulante em pacientes atendidos em um laboratório escola**. Revista Brasileira de Análises Clínicas, vol. v.39, n.3, p. 227-230, 2007
7. PASCHKE, R.; LUDGATE, M. **The thyrotropin receptor in thyroid diseases**. The New England Journal of Medicine; v.337, p.1675-1681, 1997. <https://doi.org/10.1056/NEJM199712043372307>
8. DEVEREAUX, D., TEWELDE, S. Z. **Hyperthyroidism and Thyrotoxicosis**. Emergency Medicine Clinics of North America, v. 32, p. 277-292, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.emc.2013.12.001>
9. DUDLEY, R. F. **Imunoensaio por quimioluminescência: uma alternative ao Radioimunoensaio (RIA)**. Socied. Amer. Patol. Clin., p. 5-10, n 28, v 4, 1990.
10. WU, Y., JU, H. X. **Extraction Techniques and Applications: Analytical Techniques for Scientists.Biological/Medical and Environmental/Forensics - Clinical Immunoassays and Immunosensing**. p. 143-167, v. 3, 2012.

11. GIL, E. S., KUBOTA, L. T., YAMAMOTO, Y. I. **Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica.** Química Nova, n. 22, p. 874-881 v. 6, 1999.
12. KARUNAKARAN, C.; PANDIARAJ, M.; SANTHARAMAN. M. **Immunosensors.** Biosensors and Bioelectronics. p. 205-245, 2015.
13. BAHADIR, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. **Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics.** Talanta, v.132, p.162–174, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.08.063>
14. TELES, F. R. R.; FONSECA, L. P. **Applications of polymers for biomolecule immobilization in electrochemical biosensors.** Materials Science and Engineering: C – Journal, v. 28, p. 1530–1543, 2008.
15. LIU, A.; WANG, K.; WENG, S.; LEI, Y.; LIN, L.; CHEN, W.; LIN, X.; CHEN, Y. **Development of electrochemical DNA biosensors.** Trends in Analytical Chemistry, V. 37, p. 101-111, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.03.008>
16. D’ORAZIO, P. D. **Biosensors in Clinical Chemistry.** Clinica Chimica Acta, v. 334, p. 41-69, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00241-9](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00241-9)
17. LAI, J., YI, Y., ZHU, P., SHEN, J., WU, K., ZHANG, L., LIU, J. **Polyaniline-based Glucose Biosensor: A Review.** Journal of Electroanalytical Chemistry, p. 138–153, v. 782, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.10.033>
18. WANG, X.; LU, X.; CHEN, J. **Development of biosensor technologies for analysis of environmental contaminants.** Trends in Environmental Analytical Chemistry, v. 2, p. 25–32, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2014.04.001>
19. MEHROTRA, P. **Biosensors and their applications – A review.** Journal of oral biology and craniofacial research 2015.
20. WANG, J. **DNA biosensors based on peptide nucleic acid (PNA) recognition layers.** A review. Biosensors and Bioelectronics, v.13, p. 757–762, 1998.
[https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(98\)00039-6](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(98)00039-6)
21. DOLATABADI, J. E. N., MASHINCHIAN, O., AYOUBI, B., JAMALI, A. A., MOBED, A., LOSIC, D., OMIDI, Y., GUARDIA. M. **Optical and electrochemical DNA Nanobiosensors.** Trends in Analytical Chemistry, p. 459-472, V. 30, N. 3, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.11.010>
22. LEI, Y.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A. **Microbial biosensors.** Analytica Chimica Acta, 568: (1-2), p. 200-210, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.065>

23. GOPINATH, S. C. B., TANG, T. H.; CITARTAN, M.; CHEN, Y.; LAKSHMIPRIYA, T. **Current aspects in immunosensors**. Biosensors and Bioelectronics, v.57, p. 292–302, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.02.029>
24. HOLFORD, T.R.J., DAVIS, F., HIGSON, S.P.J. **Recent trends in antibody based sensors**. Biosens. Bioelectron. p.12-24, v. 34, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.10.023>
25. PERUMAL, V., HASHIM, U. **Advances in biosensors: Principle, architecture and applications**. Journal of applied biomedicine, v. 12, 1-15, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.jab.2013.02.001>
26. ZOUALI, M. **Antibodies**. Encyclopedia of life sciences, p. 1-8, 2001.
27. RICCARDI, C. S.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. **Imunossensor amperométrico**. Química Nova. V. 25, N. 2, p.316-320, 2002.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000200020>
28. RODRIGUES, L. P.; FERREIRA, D. C.; SONODA, M. T.; MADURRO, A. G. B.; ABRAHÃO Jr. O.; MADURRO, J. M. **Electropolymerization mechanisms of hydroxyphenylacetic acid isomers**. Journal of molecular structure, v.1072, 25, p. 298–306, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.05.031>
29. BALINT, R.; CASSIDY, N. J.; CARTMELL, S. H. **Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering**. ActaBiomaterialia - Journal, p. 1-13, 2014.
30. SHARMA, S. K.; SEHGAL, N.; KUMAR, A. **Biomolecules for development of biosensors and their applications**. Current Applied Physics, v.3, p. 307–316, 2003.
[https://doi.org/10.1016/S1567-1739\(02\)00219-5](https://doi.org/10.1016/S1567-1739(02)00219-5)
31. SASSOLAS, A.; BLUM, L.J.; LECA-BOUVIER, B. D. **Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors**. Biotechnology Advances, v. 30, p. 489–511, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.003>
32. MARTÍN, A., ESCARPA, A. **Graphene: The cutting–edge interaction between chemistry and electrochemistry**. Trends in Analytical Chemistry, V. 56, p.13–26, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.12.008>

33. GUO, H. L., WANG, X. F., QIAN, Q. Y., WANG, F. B., and XIA, X. H. **A Green Approach to the Synthesis of Graphene Nanosheets**. American Chemical Society, v.3, n. 9, p. 2653–2659, 2009.
34. PUMERA, M. Graphene in biosensing. *Materials Today*. V. 14, N. 7-8, p. 308-315, 2011.
[https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70160-2](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70160-2)
35. ZHU, Y.; MURALI, S.; CAI, W.; LI, X.; SUK, J. W.; POTTS, J. R.; RUOFF, R. **S.Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications**. *Advanced Materials*, v. 22, p. 3906–3924, 2010. <https://doi.org/10.1002/adma.201001068>
36. FENG, H., WANG, B., TAN, L., CHEN, N., WANG, N., CHEN, B. **Polypyrrole/hexadecylpyridinium chloride-modified graphite oxidecomposites: Fabrication, characterization, and application in supercapacitors**. *Journal of Power Sources*, v. 246, p.621- 628, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2013.08.002>
37. ZHANG, Z., YAN, J., JIN, H., and YIN, J. **Tuning the reduction extent of electrochemically reduced grapheneoxide electrode film to enhance its detection limit for voltammetric analysis**. *ElectrochimicaActa*, v.139, p. 232–237, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.06.159>
38. CHIANG, C. K.; FINCHER, C. R.; PARK, Y. W.; HEEGER, A. J.; SHIRAKAWA, H.; LOUIS, E. J. **Electrical conductivity in doped polyacetylene**. *Physical Review Letters*, 39 (17), 1098, 1977.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.39.1098>
39. GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. **Application of conducting polymers to biosensors**. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 17, p. 345–359, 2002.
[https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00312-8](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00312-8)
40. BAGHERI, H.; AYAZI, Z.; NADERI, M. **Conductive polymer-based microextraction methods: A review**. *AnalyticaChimicaActa*, v. 767, p. 1–13, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.013>
41. FAEZ, R.; REIS, C.; SCANDIUCCI P.; KOSIMA, O. K.; RUGGERI, G.; PAOLI, M. **A. Polímeros Condutores**. *Química Nova na Escola*, nº 11, 2000.
42. FREUND, M. S. and BHAVANA, A. D. **Self-doped conducting polymers**. John Wiley & Sons, 2007.
<https://doi.org/10.1002/9780470061725>

43. AHUJA, T.; MIR, I. A.; KUMAR, D.; RAJESH. **Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications.** *Biomaterials*, v. 28, p. 791–805, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.09.046>

44. COELHO, N. M. ; MELO, E. I. ; REZENDE, H. C. ; MADURRO, A. G. B. ; MADURRO, J. M. **Surface properties of sensors based on aminophenol polymerized film.** *Journal of Solid State Electrochemistry*, v. 16, p. 945-951, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10008-011-1458-9>

45. SILVA, T. A. R.; FERREIRA, L. F.; BOODTS, J. F. C.; EIRAS, S. P.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G. **Poly(4-hydroxyphenylacetic acid): a new material for immobilization of biomolecules.** *Polymer Engineering & Science*. v. 48, p. 1963-1970, 2008b. <https://doi.org/10.1002/pen.21026>

46. ABRAHÃO Jr, O; MACHADO, A. E. H.; SILVA, F. F. S.; MADURRO, J. M.; CASTRO, C. M.; SONODA, M. T. **Tyramine electropolymerization revisited by DFT and experimental study.** *Journal of Molecular Structure*, v. 1037, p. 200–208, 2013. [h](#)

47. CASTRO, C. M.; VIEIRA, S. N.; GONCALVES, R. A.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. **Electrochemical and morphologic studies of nickel incorporation on graphite electrodes modified with polytyramine.** *Journal of Materials Science*. v.43, p. 475-482, 2008. <https://doi.org/10.1007/s10853-007-1880-7>

48. FERREIRA L. F.; SOUZA L. M., FRANCO D. L.; CASTRO A. C. H.; OLIVEIRA A. A.; BOODTS J. F. C.; BRITO-MADURRO A. G.; MADURRO J. M.. **Formation of novel polymeric films derived from 4-hydroxybenzoic acid.** *Materials Chemistry and Physics*. v. 129, p.46-52, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2011.03.053>

49. FERREIRA, D. C.; MACHADO, A. E. H. ; TIAGO, . S. ; MADURRO, J. M. ; MADURRO, A. G. B. ; ABRAHÃO, O . **Molecular modeling study on the possible polymers formed during the electropolymerization of 3-hydroxyphenylacetic acid.** *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, v. 34, p. 18-27, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2012.01.001>

50. SPATARU, T., MARCU, M., BANU, A., ROMAN, E., SPATARU, N. **Electrodeposition of platinum on polytyramine modified electrodes for electrocatalytic applications.** *Electrochimica Acta*, v. 54, p.3316–3319, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.12.050>

51. RICHARDSON, P. R.; BATES, S. P.; JONES, A. C. **A Molecular Orbital Study of the Conformational Properties of Tyramine and Phenethylamine.** *J. Phys. Chem. A*, 108 (7), p. 1233–1241, 2004.
<https://doi.org/10.1021/jp036900u>
52. STANKOVICH, S.; DIKIN, D. A.; DOMMETT, G. H. B.; KOHLHAAS, K. M.; ZIMNEY, E. J.; STACH, E. A. et al. **Graphene-based composite materials.** *Nature*; v. 442, p.282–286, 2006.
53. HU, K.; KULKARNI, D. D.; CHOI, I.; TSUKRUK. V. V. **Graphene-polymer nanocomposites for structural and functional applications.** *Progress in Polymer Science*, V. 39, p. 1934–1972, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.03.001>
54. GANGOPADHYAY, R.; AMITABHA, D. E. **Conducting polymer nanocomposites: A brief overview.** *Chemistry of Materials*, v.12, p. 608-622, 2000.
<https://doi.org/10.1021/cm990537f>
55. PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. **Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos.** *Revista Virtual de Química*. V. 5, N. 4, p. 517 – 537, 2013.
56. ALEIXO, L. M. **Voltametria: conceitos e técnicas** [Internet]. 2015 [acesso em 11 de agosto de 2015]. Disponível em www.chemkeys.com .
57. O'NEILL, A.; BAKIRTZIS, D.; DIXON, D. **Polyamide 6/Graphene composites: The effect of in situ polymerisation on the structure and properties of grapheme oxide and reduced graphene oxide.** *European Polymer Journal*,v. 59, p.353–362, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.07.038>
58. FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. **Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios.** *Química Nova*, v. 29, nº. 1, p.137-142, 2006.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100024>
59. CHNG, E. L. K.; PUMERA, M. **Solid-State Electrochemistry of Graphene Oxides: Absolute Quantification of Reducible Groups using Voltammetry.** *Chemistry an Asian Journal*. V. 6, p. 2899 – 2901, 2011.
<https://doi.org/10.1002/asia.201100464>
60. ZHU, W.; HUANG, H.; GAO,X.; MA, H. **Electrochemical behavior and voltammetric determination of acetaminophen based on glassy carbon electrodes modified with poly(4-aminobenzoic acid)/electrochemically reduced graphene oxide composite films.** *Materials Science and Engineering* ,V. 45, p. 21–28, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.08.067>

61. ZHANG, Q.; LI, Y.; FENG, Y.; FENG, W. **Electropolymerization of graphene oxide/polyaniline composite for high-performance supercapacitor**. *Electrochimica Acta*, v. 90, p. 95–100, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.11.035>
62. GREEFR, et al. **Instrumental Methods in Electrochemistry**. V.1, ed. 2, 1985, p. 435-443.
63. ENACHE, T. A. tese de doutorado: **Mecanismos redox de compostos aromáticos, aminoácidos e proteínas, em eléctrodos de carbono**. Universidade de Coimbra, Portugal, 2011, p. 254.
64. ÖZCAN, A; SAHIN, Y. **A novel approach for the selective determination of tryptophan in blood serum in the presence of tyrosine based on the electrochemical reduction of oxidation product of tryptophan formed in situ on graphite electrode**. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 31, 2012, p. 26–31.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.09.048>
65. DEDAVID, B. A., GOMES, C. I., MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: Aplicações e preparação de amostras Materiais Poliméricos, metálicos e semicondutores**. EDIPUCRS, Porto Alegre, v 1, 2007.