



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
INSTITUTO DE QUÍMICA



LABORATÓRIO DE FILMES POLIMÉRICOS E NANOTECNOLOGIA

MÔNICA SILVA SEGATTO

**DESENVOLVIMENTO DA PLATAFORMA DE GRAFITE FUNCIONALIZADA
COM POLI(ÁCIDO 4-HIDROXIFENILACÉTICO) SOBRE ÓXIDO DE GRAFENO
REDUZIDO-NANOPARTÍCULAS DE OURO, PARA DETECÇÃO DO HORMÔNIO
TRIIODOTIRONINA**

Uberlândia

2017

MÔNICA SILVA SEGATTO

**DESENVOLVIMENTO DA PLATAFORMA DE GRAFITE FUNCIONALIZADA
COM POLI(ÁCIDO 4-HIDROXIFENILACÉTICO) SOBRE ÓXIDO DE GRAFENO
REDUZIDO-NANOPARTÍCULAS DE OURO, PARA DETECÇÃO DO HORMÔNIO
TRIIODOTIRONINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia como exigência para obtenção do Título de Mestre em Química.

Áreas de Concentrações: Ciência dos Materiais: Química do Estado Sólido e Eletroquímica Aplicada

Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

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

Uberlândia

2017

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

S454d
2017 Segatto, Mônica Silva, 1992-
Desenvolvimento da plataforma de grafite funcionalizada com poli(ácido-4hidroxifenilacético) sobre óxido de grafeno reduzido-nanopartículas de ouro, para detecção do hormônio triiodotironina / Mônica Silva Segatto. - 2017.
113 f. : il.

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

1. Química - Teses. 2. Nanopartículas - Teses. 3. Triiodotironina - Teses. 4. Voltametria - Teses. I. Madurro, João Marcos. II. Brito-Maduro, Ana Graci. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.



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



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 261/PPQUI.

DATA: 21/07/2017

DISCENTE: Mônica Silva Segatto

MATRÍCULA: 11522QMI010

TÍTULO DO TRABALHO: Desenvolvimento da plataforma de grafite funcionalizada com poli(ácido 4-hidroxifenilacético) sobre óxido de grafeno reduzido-nanopartículas de ouro, para detecção do hormônio triiodotironina.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Ciência dos Materiais: Química do Estado Sólido

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Desenvolvimento de sensores biológicos para detecção de doenças parasitárias e infecciosas.

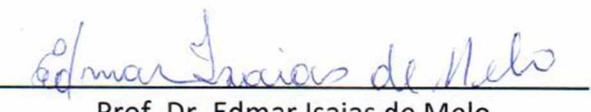
Às quatorze horas do dia vinte e um de julho do ano dois mil e dezessete, no Auditório A do Bloco 50, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Marcelo Mulato, da Universidade de São Paulo, Edmar Isaias de Melo e João Marcos Madurro, da Universidade Federal de Uberlândia, professor(a) 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 Interna 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 seqüência, 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) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será

O MEMO

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. 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 30 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.


Prof. Dr. Marcelo Mulato

USP


Prof. Dr. Edmar Isaias de Melo

UFU


Orientador(a): Prof Dr. João Marcos Madurro – IQUFU

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, o Autor de todas as coisas, que por sua infinita bondade permitiu que eu chegasse até aqui, conferindo a mim a força e entusiasmo diário.

Aos meus pais José Ricardo e Liliane pelo amor incondicional, por serem meus alicerces e me darem todo o apoio que sempre precisei.

Ao meu irmão Danilo, aos meus tios, avós e primos pelo aconchego familiar e orações, me mostrando que sempre tenho alguém a quem contar.

Ao meu namorado Gustavo H. pela paciência, carinho, compreensão e por todas as palavras de incentivo que me motivaram a sempre continuar.

A todos os membros da família LAFIP, Ana Cristina, Anna Clara, Bárbara, Danielle, Fábio, Héden, Heliane, Kênia, João Afonso, José Manoel, Laíse, Lívia, Priscilla, Rafael, Sandro, Vinícius por todos os momentos de aprendizado e também aqueles de descontração e, em especial, a Jussara por todo ensinamento e parceria durante esses dois anos.

Aos professores João Marcos e Ana Graci pela confiança a mim depositada ao me aceitarem para o desenvolvimento deste trabalho, me proporcionando um período de grande crescimento e amadurecimento intelectual e profissional.

A secretária Mayta pela ajuda de sempre. Aos técnicos Roni, Magayver, Guilherme por realizarem as medidas de caracterização e ao Edvando por preparar as aulas práticas de laboratório durante a disciplina de Química Orgânica Experimental 1.

Aos membros da banca pelo aceite de participação e por todas as contribuições para o aprimoramento do trabalho.

A CAPES, FAPEMIG e CNPQ pelo fomento a pesquisa.

A humildade é a chave que abre todas as portas.

São Francisco de Assis

RESUMO

Biossensores apresentam diversas vantagens como elevada sensibilidade, detecção em tempo real, volume reduzido de amostra e baixo custo, que os tornam uma ferramenta muito versátil no diagnóstico mais específico de doenças e distúrbios metabólicos. Essa pesquisa teve como objetivo principal o desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico para o diagnóstico do hormônio tireoidiano triiodotironina – T_3 , a partir de uma plataforma construída por modificação de eletrodos de grafite com o filme polimérico do ácido 4-hidroxifenilacético [poli(4-HFA)] sobre o nanocompósito preparado com o óxido de grafeno reduzido e nanopartículas de ouro (OGR-AuNP). OGR foi sintetizado em laboratório pelo método de oxidação-esfoliação-redução química, partindo do grafite e foi incorporado na superfície de eletrodos de grafite por adsorção física. AuNP foram sintetizadas eletroquimicamente sobre o eletrodo contendo OGR formando um nanocompósito. O poli(4-HFA) foi eletropolimerizado sobre o nanocompósito e, sobre ele foi imobilizada a biomolécula sonda de Anti- T_3 por ligação covalente. Moléculas bloqueadoras (glicina) foram adicionadas antes do contato com o alvo T_3 . Medidas de detecção foram obtidas por voltametria de pulso diferencial e espectroscopia de impedância eletroquímica. Caracterizações por espectroscopia na região do infravermelho evidenciam a redução de grupos oxigenados no OGR, resultantes do processo de síntese, enquanto imagens de microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura revelam a morfologia característica de folhas mais agrupadas. A incorporação de OGR e, posterior eletrodeposição de AuNP sobre a superfície de eletrodos de grafite mostra um aumento significativo na condutividade elétrica e transferência eletrônica do mesmo, além de facilitarem o processo de eletropolimerização do filme poli(4-HFA). Este nanocompósito leva a formação de uma maior quantidade do filme poli(4-HFA), realçando a presença de três pares redox. Esta maior quantidade de filme formada aumenta a probabilidade de imobilização de biomoléculas. Os melhores resultados no processo de imobilização de Anti- T_3 por ligação covalente e interação com o alvo T_3 foram obtidos com a concentração de 1 e 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Os resultados obtidos por espectroscopia de impedância eletroquímica corroboram as demais análises, comprovando o aumento da resistência a cada etapa de construção do imunossensor. A caracterização morfológica do imunossensor apresenta alterações significativas nos valores de rugosidade, concordantes com os estudos eletroquímicos. Detecções de diluições do Alvo T_3 mostram que o imunossensor proposto tem limite de detecção inferior a $2,0 \cdot 10^{-12} \text{ g mL}^{-1}$, sendo possível a construção de uma curva analítica de concentração de T_3 na ordem de 1,0 a $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, que aumenta a expectativa de aplicação em amostras reais de pacientes, por incluir a faixa de concentração de T_3 presente no sangue.

Palavras-chave: Triiodotironina – T_3 ; Imunossensores; Óxido de grafeno reduzido; Nanopartículas de ouro; ácido 4-hidroxifenilacético.

ABSTRACT

Biosensors show many advantages such as high sensitivity, possibility of point of care detection, small sample volume and low cost, which makes them a versatile tool for the specific diagnosis of diseases and metabolic disorders. This research had as main objective the development of an electrochemical immunosensor for the diagnosis of the thyroid hormone triiodothyronine – T₃, in a platform constructed by modifying graphite electrodes with the 4-hydroxyphenylacetic acid polymeric film [poly(4-HPA)] onto a nanocomposite prepared with reduced graphene oxide and gold nanoparticles (RGO-AuNP). RGO was synthesized in laboratory by the oxidation-exfoliation-chemical reduction method, starting from the graphite, and was incorporated into the surface of graphite electrodes by physical adsorption. AuNP were synthesized electrochemically onto electrode containing RGO forming a nanocomposite. The poly(4-HPA) was electropolymerized onto the nanocomposite, and on that the probe biomolecule Anti-T₃ was immobilized by covalent bond. Glycine was used as blocking molecules prior to the contact with target T₃. The detection measures were obtained by differential pulse voltametry and electrochemical impedance spectroscopy. Characterizations by infrared spectroscopy show the reduction of oxygens groups in RGO, resulting from the synthesis process, while atomic force microscopy and scanning electron microscopy images reveal the characteristic morphology of the more grouped sheets. The incorporation of RGO and the AuNP electrodeposition onto the surface of graphite electrodes show a significant increase in electrical conductivity and electron transfer, besides facilitating the electropolymerization process of poly(4-HPA). The combination of this nanocomposite with poly(4-HPA) leads to the formation of a larger amount of film, highlighting the presence of three redox pairs. This greater amount of film formed increases the probability of immobilization of biomolecules. The best results in Anti-T₃ immobilization process by covalent bond and with target T₃ interaction are obtained with 1 e 2 µg mL⁻¹ concentration, respectively. The results obtained by electrochemical impedance spectroscopy corroborate with the other analysis, proving the increase in resistance at each stage of immunosensor development. The morphological characterization of the immunosensor shows significant changes in roughness values that are concomitant with the explanations of the results in electrochemical study. Dilution detections of Target T₃ show that the proposed immunosensor has a detection limit less than 2 10⁻¹² g mL⁻¹, it being possible to construct an analytical curve of T₃ concentration in the order of 1.0 to 5.0 µg mL⁻¹, increasing the prospect of application in real samples of patients, since it include the T₃ concentration range present in the blood.

Keywords: Triiodothyronine – T₃; Immunosensors; Reduced graphene oxide; Gold nanoparticles; 4-hydroxyphenylacetic acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Representação estrutural dos hormônios tireoidianos T ₃ e T ₄	19
Figura 2 –	Equação de organificação.....	20
Figura 3 –	Representação básica da ativação das células alvos por hormônios tireoidianos.....	20
Figura 4 –	Representação esquemática de imunoenaios competitivos (a) e não-competitivos (b).....	22
Figura 5 –	Representação esquemática dos componentes básicos de um biossensor.....	24
Figura 6 –	Programação de pulso de potencial em uma cronoamperometria (a), perfis de concentração em diferentes etapas do processo (b), resposta obtida em corrente vs tempo (c).....	27
Figura 7 –	Programação da variação do potencial aplicado em função do tempo em uma VC (a), resposta de corrente vs potencial aplicado (b).....	27
Figura 8 –	Programação de pulsos sobrepostos em uma rampa de potencial em uma VPD (a), resposta de corrente vs potencial aplicado (b).....	28
Figura 9 –	Programação de onda senoidal em EIE (a), diagrama de Nyquist (b) e diagrama de Bode (c) como resposta da impedância no sistema complexo de um sistema eletroquímico simples.....	29
Figura 10 –	Representação esquemática da preparação do grafeno pelo método de oxidação, esfoliação e redução química, a partir do grafite.....	32
Figura 11 –	Representação da configuração estrutural de OG, proposta por Lerf e Klinowski.....	32
Figura 12 –	Representação esquemática do mecanismo proposto para a oxidação dos grupos epóxi com hidrazina.....	33
Figura 13 –	Representação esquemática da hibridização sp ² (a) e de orbitais híbridos formando ligações σ e π (c) em carbonos.....	35
Figura 14 –	Representação estrutural do monômero ácido 4-hidroxifenilacético.....	37
Figura 15 –	Mecanismo de eletropolimerização para o ácido 4-hidroxifenilacético, representando a iniciação por eletro-oxidação(i), a propagação pela formação de dímeros e, posteriormente, trímeros (ii) e a terminação da cadeia (iii).....	38
Figura 16 –	Primeiro e último VC da eletropolimerização de poli(4-HFA) (a) e deconvolução das VC dos processos de oxidação e redução do poli(4HFA)....	38
Figura 17 –	Representação estrutural de EDC e NHS.....	40

Figura 18 –	Esquema representativo do mecanismo de ativação de superfícies carboxiladas por adição de EDC-NHS.....	41
Figura 19 –	Representação esquemática da estrutura básica de um anticorpo com as cadeias pesadas e leves compreendendo nas regiões constantes e variáveis.....	43
Figura 20 –	Representação esquemática dos componentes de um MEV.....	46
Figura 21 –	Representação esquemática da movimentação de uma ponteira do AFM sobre a amostra, de acordo com a distância e as forças interativas.....	47
Figura 22 –	Diagrama esquemático de espectrofotômetro de transformada de Fourier.....	48
Figura 23 –	Diagrama esquemático de um equipamento de análise termogravimétrica.....	49
Figura 24 –	Representação de uma curva genérica em um experimento de TGA/DTA.....	50
Figura 25 –	Esquema representativo das etapas de síntese química de OG (a) e OGR (b)...	54
Figura 26 –	Analisador térmico Shimadzu modelo DTG 60 H.....	55
Figura 27 –	Prensa Shimadzu modelo DTG 60 H (a) e espectrofotômetro Perking Elmer spectrum 1000 (b).....	55
Figura 28 –	MEV Tescan modelo Vega3 LMU (a) e revestidor de pulverização Quorum 150 R (b).....	56
Figura 29 –	AFM Shimadzu modelo SPM 9600.	56
Figura 30 -	Potenciostato CH <i>Intruments</i> modelo 760C (a) e potenciostato/galvanostato Autolab modelo PGSTAT302N (b).....	57
Figura 31 –	Eletrodo auxiliar de platina (a) e eletrodo de referência de Ag/AgCl (b).....	58
Figura 32 –	Representação esquemática de cada etapa de preparação dos eletrodos de grafite.....	58
Figura 33 –	Eletrodos de grafites prontos para uso juntamente com base condutora de latão.....	59
Figura 34 –	Esquema representativo da modificação do EG com o nanocompósito e filme polimérico.....	61
Figura 35 –	Esquema representativo das diversas etapas de preparação do imunossensor para diagnóstico do hormônio tireoidiano T ₃	63
Figura 36 –	Foto ilustrativa do óxido de grafite obtido por oxidação química do pó de grafite e dispersão aquosa de OG (a) e óxido de grafite reduzido obtido pela redução química de OG e dispersão aquosa de OGR (b).....	68
Figura 37 –	Espectro de infravermelho para óxido de grafite (a) e óxido de grafite reduzido (b).....	69

Figura 38 –	Imagens de AFM de OG em duas dimensões (a) e perfil de seção de passagem (b).....	70
Figura 39 –	Curva TGA/DTA do óxido de grafite (a) e óxido de grafite reduzido (b) em atmosfera de nitrogênio, com razão de aquecimento de $10^{\circ} \text{C min}^{-1}$	71
Figura 40 –	Imagens de MEV para OG (a) e OGR (b) com ampliações de 30 000 vezes para ambos.....	73
Figura 41 –	Voltamogramas cíclicos dos EG em solução de HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}	73
Figura 42 –	Voltamograma cíclicos dos EG contendo diferentes volumes de OGR 1 mg mL^{-1} em solução de HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} (a) e relação entre resposta e volume de OGR gotejado (b).....	74
Figura 43 –	Voltamogramas cíclicos dos EG contendo diferentes volumes de OGR 1 mg mL^{-1} em solução de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} (a) e relação entre corrente de pico anódico e volume de OGR gotejado (b).....	75
Figura 44 –	Respostas cronoamperométricas de EG/OGR em solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo HAuCl_4 $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$, no potencial de $-0,25 \text{ V}$, utilizando diferentes tempos de eletrodeposição.....	76
Figura 45 –	Voltamogramas cíclicos dos EG/OGR modificados com AuNP em diferentes tempos de eletrodeposição, em solução de HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} (a) e relação entre área e tempo de eletrodeposição de AuNP (b).....	76
Figura 46 –	Voltamogramas cíclicos dos EG/OGR modificados com AuNP em diferentes tempos de eletrodeposição, em solução de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} a) e relação entre corrente de pico anódica e tempo de eletrodeposição de AuNP (b).....	77
Figura 47 –	Voltamogramas obtidos em HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , dos EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) em diferentes números de ciclos de potencial durante a eletropolimerização (a) e quantidade de carga relacionado com o número de ciclos (b).....	78
Figura 48 –	Voltametrias cíclicas consecutivas dos EG/OGR-AuNP modificados com poli(4-HFA) $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$, em HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, após 20 ciclos a 50 mV s^{-1} nas janelas de potenciais de $-0,6$ a $+1,2 \text{ V}$ (a); $-0,4$ a $+1,2 \text{ V}$ (b); $-0,2$ a $+1,2 \text{ V}$ (c); $-0,6$ a $+1,1 \text{ V}$ (d); $-0,4$ a $+1,1 \text{ V}$ (e); $-0,2$ a $+1,1 \text{ V}$ (f).....	79
Figura 49 –	Últimos ciclos obtidos por VC em HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} nos EG, EG/OGR, EG/OGR-AuNP, e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA).....	80

Figura 50 –	Primeiros ciclos obtidos por VC na eletropolimerização de poli(4-HFA) 2,5 mmol L ⁻¹ em meio de HClO ₄ 0,5 mol L ⁻¹ nas superfícies de EG (a), EG/OGR (b) e EG/OGR-AuNP (c).....	81
Figura 51 –	Eletropolimerização de poli(4-HFA) por VC em ácido 4-HFA 2,5 mmol L ⁻¹ em meio de HClO ₄ 0,5 mol L ⁻¹ , na faixa de potencial de -0,4 a +1,1 V, 20 ciclos, velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹ nas superfícies de EG (a), EG/OGR (b) e EG/OGR-AuNP (c).....	82
Figura 52 –	Últimos ciclos obtidos por VC em HClO ₄ 0,5 mol L ⁻¹ , velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹ nos EG/poli(4-HFA), EG/OGR/poli(4-HFA) e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) (a) e quantidade de carga relacionada com o número de ciclos para EG/poli(4-HFA) e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) (b)....	83
Figura 53 –	Último ciclo de voltametria dos EG, EG/OGR e EG/OGR-AuNP contendo o filme poli(4-HFA), em solução de K ₄ Fe(CN) ₆ /K ₃ Fe(CN) ₆ 5,0 mmol L ⁻¹ em meio de KCl 0,1 mol L ⁻¹ , 50 mV s ⁻¹ (a) e relação entre corrente de pico anódica e modificação de EG (b).....	84
Figura 54 –	Detecção dos EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) contendo a sonda Anti-T ₃ e alvo T ₃ em diferentes concentrações, obtido por VPD em solução de K ₄ Fe(CN) ₆ 5,0 mmol L ⁻¹ em meio de KCl 0,1 mol L ⁻¹ , com velocidade de varredura de 20 mV s ⁻¹ (a) e relação entre sinais de corrente e concentrações de sonda e alvo (b).....	85
Figura 55 –	Detecção dos EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) contendo Alvo T ₃ 2 µg mL ⁻¹ com diferentes tempos de interação, obtido por VPD em solução de K ₄ Fe(CN) ₆ 5,0 mmol L ⁻¹ em meio de KCl 0,1 mol L ⁻¹ , com velocidade de varredura de 20 mV s ⁻¹ (a), e intensidades de corrente dos EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/ALVO em diferentes tempos de interação (b).....	88
Figura 56 –	Detecção dos EG (a), EG/OGR-AuNP (b) e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA), (c) na presença e ausência de sonda, obtidos por VPD em solução de K ₄ Fe(CN) ₆ 5,0 mmol L ⁻¹ em meio de KCl 0,1 mol L ⁻¹ , com velocidade de varredura de 20 mV s ⁻¹	89
Figura 57 –	Diferença de sinais na presença e ausência de sonda para diferentes superfícies.....	89
Figura 58 –	Detecção dos EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA), EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/SONDA – sem bloqueio de glicina e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/SONDA, obtidos por VPD em solução de K ₄ Fe(CN) ₆ 5,0 mmol L ⁻¹ em meio de KCl 0,1 mol L ⁻¹ , com velocidade de varredura de 20 mV s ⁻¹	91
Figura 59 –	Diagramas de Nyquist (Z'' vs. Z') em K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe(CN) ₆ 5 mmol L ⁻¹ em meio de KCl 0,1 mol L ⁻¹ dos EG e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) (a); EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/Sonda (b) e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/Sonda e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/Alvo (c). Amplitude 10 mV; Intervalo de frequência: 10 000 a 0,01 Hz.....	92

Figura 60 –	Circuito elétrico equivalente proposto para os resultados de EIE para EG (a), EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/Sonda (b) e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/Alvo (c).....	93
Figura 61 –	Imagens de AFM para EG (a), EG/OGR-AuNP (b), EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) (c), EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/SONDA (sem bloqueio) (d) EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/Sonda (com bloqueio) (e) e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/Alvo (f).....	95
Figura 62 –	Imagens de MEV com ampliações de 10 000 e 30 000 vezes para EG (a), EG/OGR-AuNP (b) e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) (c).....	97
Figura 63 –	Imagens de MEV com ampliação de 30 000 vezes para EG/OGR (a) e EG/OGR-AuNP (b).....	98
Figura 64 –	Detecção dos EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/SONDA contendo o Alvo T ₃ em diferentes diluições, obtido por VPD em solução de K ₄ Fe(CN) ₆ 5,0 mmol L ⁻¹ em meio de KCl 0,1 mol L ⁻¹ , com velocidade de varredura de 20 mV s ⁻¹ (a) e relação entre corrente de pico anódica e diluição de T ₃ 2,0 g mL ⁻¹ (b).....	99
Figura 65 –	Curva analítica de T ₃ na faixa de 1,0 a 5 µg mL ⁻¹	100
Figura 66 –	Estabilidade do imunossensor proposto durante o tempo de 40 dias.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Alterações fisiológicas provocadas por distúrbios na tireoide.....	21
Tabela 2 –	Valores de correntes de pico e potenciais de pico anódicos e <i>gap</i> entre sinais de corrente sonda-alvo para EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) com diferentes concentrações de sonda e alvo.....	86
Tabela 3 –	Valores de resistências, elementos de fase constante e impedância dos eletrodos.....	93
Tabela 4 –	Valores de altura média (Rz), rugosidade média (Ra) e rugosidade média quadrática (Rq) dos eletrodos analisados por AFM.....	94

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

- ΔE_p – diferença de potencial de pico anódico e catódica
- 4-HFA – ácido 4-hidroxifenilacético
- AC – corrente alternada
- Anti-T₃ – Anticorpo Anti-hormônio triiodotironina
- AFM – microscópio de força atômica (*Atomic Force Microscope*)
- AuNP – nanopartículas de ouro (*Gold Nanoparticles*)
- BIOSENS – Laboratório de Biossensores
- C_{dl} – capacitância da dupla camada elétrica
- CPE – elementos de fase constante (*Constant phase element*)
- CNEM – Comissão Nacional de Energia Nuclear
- DIT – Diiidotirosina
- DTA – Análise térmica diferencial (*Differential Thermal Analysis*)
- EG – eletrodo de grafite
- E_i – potencial inicial
- EDC – N-etil-N'-(3-(dimetilamino)propil)carbodiimida
- EIA – Enzimaimunoensaio (*Enzyme Immunoassay*)
- EIE – Espectroscopia de impedância eletroquímica
- E_{P1/2} – potencial de meia-onda de pico
- E_{máx} – potencial de máximo
- E_{mín} – potencial de mínimo
- Fab – região de ligação do antígeno (*Fragment Antigen-Binding*)
- Fc – fragmento cristalizável
- HOMO – orbitais de maior energia ocupado (*Highest Occupied Molecular Orbital*)
- HT – Hormônios Tireoidianos
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- Ig – imunoglobulinas
- I_p – Corrente de pico (I_{pa} para pico anódico e I_{pc} para pico catódico)

IQ-UFU – Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia

IV – infravermelho

LAFIP – Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia

LUMO – orbitais de menor energia desocupado (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*)

MEV – Microscópio Eletrônico de Varredura

MIT – Monoiodotirosina

NHS – N-hidroxissuccinimida

OG – óxido de grafeno

OGR – óxido de grafeno reduzido

pH – potencial de Hidrogênio

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

R_{ct} – resistência à transferência de cargas

RIE – Radioimunoensaio

R_s – resistência da solução

SBEM – Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia

T – elementos de difusão

T_3 – hormônio triiodotironina (3,5,3'-triiodo-L-tironina)

T_4 – hormônio tiroxina (3,5,3',5'-tetraiodo-L-tiroxina)

TGA – Análise termogravimétrica (*Thermal Gravimetric Analysis*)

TPO – enzima peroxidase tireoidiana (*Thyroid Peroxidase*)

TSH – hormônio tirotrófico ou tirotrófina (*Thyroid Stimulating Hormone*)

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

VC – Voltametria Cíclica

VPD – Voltametria de Pulso Diferencial

W – impedância de Warburg

Z'' – valores imaginários de impedância

Z' – valores reais de impedância

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Hormônios Tireoidianos	19
1.2 Biossensores	23
1.2.1 Classificação de biossensores quanto ao sistema de transdução.....	25
1.2.2 Técnicas eletroquímicas.....	26
1.2.2.1 Cronoamperometria.....	26
1.2.2.2 Voltametria Cíclica.....	27
1.2.2.3 Voltametria de Pulso Diferencial.....	28
1.2.2.4 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	29
1.2.3 Eletrodos Modificados.....	30
1.2.3.1 Grafeno.....	31
1.2.3.2 Nanopartículas de Ouro.....	34
1.2.3.3 Polímeros.....	34
1.2.3.4 Polímero do Ácido 4-hidroxifenilacético.....	37
1.2.4 Agentes de ligação cruzada.....	40
1.3 Imunossensores Eletroquímicos	42
1.4 Caracterização dos eletrodos modificados e nanomateriais	45
1.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	45
1.4.2 Microscopia de Força Atômica.....	46
1.4.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho.....	47
1.4.4 Análise Termogravimétrica.....	49
2. OBJETIVOS GERAIS	51
2.1 Objetivos específicos	51
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	52
3.1 Soluções preparadas para desenvolvimento do trabalho	52
3.2 Equipamentos e métodos	53
3.2.1 Síntese de óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido.....	53
3.2.2 Caracterização do óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido sintetizados....	55
3.2.3 Preparação dos eletrodos utilizados e da célula eletroquímica.....	57
3.2.4 Seleção dos eletrodos de grafite.....	59
3.2.5 Incorporação do OGR sobre a superfície de EG.....	59

3.2.6	Eletrodeposição das AuNP sobre a superfície de EG/OGR.....	60
3.2.7	Avaliação da faixa de potencial e número de ciclos da eletropolimerização do filme do ácido 4-hidroxifenilacético sobre EG/OGR-AuNP.....	60
3.2.8	Caracterização eletroquímica e estudo de transferência de carga dos EG modificados.....	61
3.2.9	Imobilização de biomoléculas na superfície do EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) para construção do imunossensor.....	62
3.2.10	Avaliação das concentrações e tempo de interação sonda-alvo.....	63
3.2.11	Caracterização eletroquímica do imunossensor.....	64
3.2.12	Caracterização morfológica de todas as etapas de construção da plataforma do imunossensor.....	65
3.2.13	Definição da faixa de concentração e construção da curva analítica.....	66
3.2.14	Estudo de estabilidade do imunossensor.....	66
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	68
4.1	Caracterização dos nanomateriais sintetizados.....	68
4.1.1	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho.....	69
4.1.2	Microscopia de força atômica.....	70
4.1.3	Análises termogravimétricas.....	71
4.1.4	Microscopia eletrônica de varredura.....	72
4.2	Seleção dos eletrodos de grafite.....	73
4.3	Incorporação de OGR sobre a superfície de EG.....	74
4.4	Eletrodeposição de AuNP sobre a superfície de EG/OGR.....	75
4.5	Faixa de potencial e número de ciclos da eletropolimerização do filme do ácido 4-hidroxifenilacético sobre EG/OGR-AuNP.....	78
4.6	Plataforma EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA).....	80
4.7	Concentrações e tempo de interação sonda-alvo.....	85
4.8	Caracterização eletroquímica do imunossensor.....	88
4.8.1	Espectroscopia de impedância eletroquímica.....	91
4.9	Estudo morfológico das etapas de construção da plataforma e do imunossensor.....	94
4.10	Faixa de concentração e curva analítica.....	98
4.11	Estabilidade.....	101
5.	CONCLUSÕES.....	102
6.	PERSPECTIVAS.....	104
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105

1. INTRODUÇÃO

Distúrbios nas funções tireoidianas geram um desequilíbrio na produção dos hormônios da tireoide, levando a ocorrência de disfunções metabólicas em todo o organismo, que são primeiramente diagnosticadas por sintomas clínicos. Segundo a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM), aproximadamente 300 milhões de pessoas em todo o mundo sofrem de disfunções da tireoide, apesar de mais da metade desconhecerem essa condição¹. No Brasil cerca de 15% da população sofre de problemas na tireoide, conforme dados divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), sendo os idosos e as mulheres os mais suscetíveis às disfunções².

Quando esses casos não são diagnosticados e tratados, as doenças da tireoide podem evoluir para quadros mais graves. Assim, um diagnóstico simples, rápido e de baixo custo é uma boa proposta para a identificação de pacientes com distúrbios tireoidianos. Os biossensores surgem como uma alternativa promissora, pois eles apresentam tais vantagens, e funcionam como uma ferramenta útil no diagnóstico de diversas doenças, como os já conhecidos comercialmente disponíveis para monitoramento de diabetes, diagnóstico de tuberculose, malária, HIV, câncer, doenças cardíacas, dentre várias outras³.

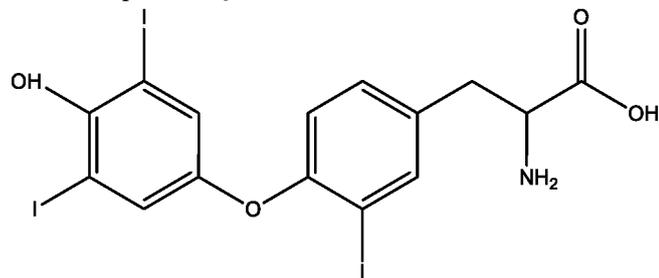
Nesse sentido, biossensores eletroquímicos apresentam como diferencial a capacidade da modificação de eletrodos com nanomateriais e/ou polímeros condutores. Essas modificações fornecem características sinérgicas como melhoras nas propriedades elétricas e mecânicas⁴, podendo levar ao aumento de sensibilidade e um ambiente favorável para a imobilização de biomoléculas⁵.

Este trabalho teve como enfoque a construção de uma plataforma de imunossensor para a detecção do hormônio da tireoide triiodotironina (T_3). Esta plataforma é baseada na combinação de um nanocompósito, constituído por nanomateriais a base de carbono e nanopartículas metálicas, com um filme polimérico sobre eletrodo de grafite, que serviu como matriz para a imobilização do anticorpo específico anti-triiodotironina (anti- T_3). As técnicas eletroquímicas mais utilizadas para o desenvolvimento desse trabalho foram cronoamperometria, voltametria cíclica (VC) e voltametria de pulso diferencial (VPD).

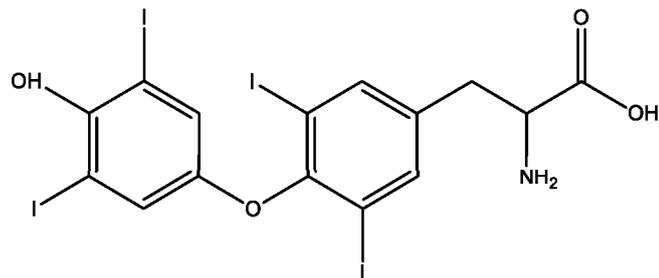
1.1 Hormônios tireoidianos

Os principais Hormônios Tireoidianos (HT) são a 3,5,3'-triiodo-L-tironina (triiodotironina ou T_3) e a 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina (tiroxina ou T_4), representados na Figura 1. Esses hormônios atuam no metabolismo de praticamente todas as células e tecidos corporais, sendo o principal efeito a ativação da transcrição nuclear de grande número de genes, resultando em um aumento generalizado da atividade funcional de todo o organismo⁶.

Figura 1– Representação estrutural dos hormônios tireoidianos T_3 e T_4 .



3,5,3'-Triiodotironina (T_3)

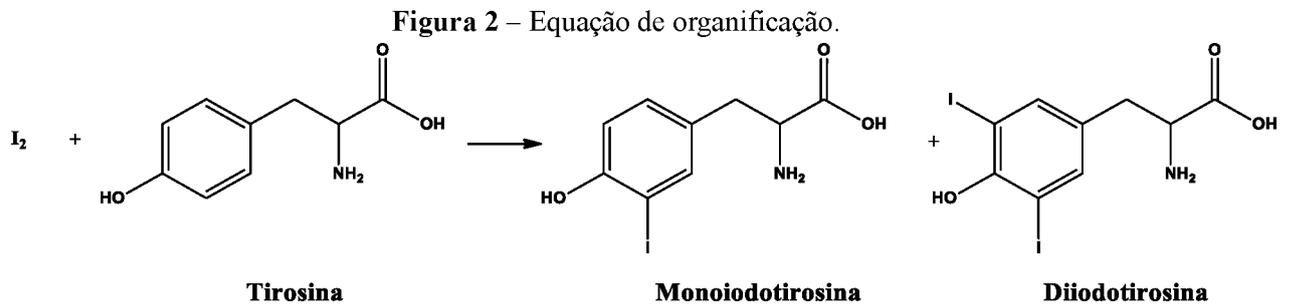


Tiroxina (T_4)

Como observado na Figura 1, os hormônios tireoidianos apresentam em sua estrutura três ou quatro átomos do elemento iodo, sendo este indispensável para a síntese biológica dos mesmos. O iodo é obtido por meio de dieta, sendo absorvido no trato gastrointestinal na forma de iodeto (I^-) para o sangue, onde são capturados pela glândula tireoide, uma das maiores glândulas do sistema endócrino.

No interior da glândula tireoide, o iodeto migra em direção à tiroglobulina, uma glicoproteína grande que contém cerca de setenta aminoácidos tirosina, os quais são a base para a incorporação do elemento iodo. Para tanto, o iodeto deve ser previamente oxidado no interior da glândula por reação com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a qual é catalisada pela enzima peroxidase tireoidiana (TPO, do inglês *Thyroid Peroxidase*). A TPO também promove a incorporação do elemento iodo aos resíduos de tirosina da tiroglobulina, reação chamada de organificação, mostrada pela equação não balanceada de formação da monoiodotirosina

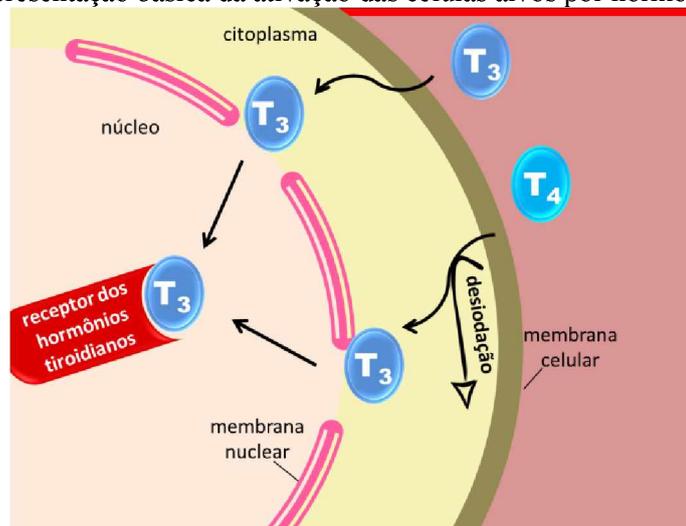
(MIT) na Figura 2. A MIT, ainda acoplada na tiroglobulina, pode sofrer nova oxidação com a incorporação de um segundo átomo de iodo formando a diiodotirosina (DIT)⁷.



A TPO também atua no acoplamento das iodotirosinas (MIT e DIT) para a formação dos HT, cujo principal produto hormonal da reação é a molécula de T_4 , sendo o T_3 representado por cerca de 1/15 do total de hormônios. Praticamente todos esses processos de síntese dos HT são controlados pelo hormônio tirotrófico ou tirotrófina (TSH, do inglês *Thyroid Stimulating Hormone*)⁷.

Em seu funcionamento normal, a tireoide produz diariamente cerca de 30 e 80 μg de T_3 e T_4 , respectivamente⁸. Parte desses HT é secretado pela glândula tireoide e carregados no sangue por interação com proteínas plasmáticas, uma vez que os mesmos são hidrofóbicos e praticamente insolúveis em meio aquoso. Contudo, essa ligação reversível às proteínas carreadoras torna os HT inativos e somente suas frações livres, que correspondem a 0,02% do $T_{4(\text{livre})}$ e 0,2% do $T_{3(\text{livre})}$, são capazes de se ligarem aos receptores específicos presentes nos tecidos e desenvolver atividade biológica⁹, ficando evidente que os HT livres estão em pequena quantidade na corrente sanguínea.

Figura 3 – Representação básica da ativação das células alvos por hormônios tireoidianos.



FONTE: Autora, 2017.

Apesar de T_4 ser produzido e secretado em quantidade significativamente maior que T_3 , o responsável pela maioria, ou até mesmo todas as funções tireoidianas no organismo é o T_3 , devido a maior afinidade dos receptores celulares a ele. Além disso, as proteínas plasmáticas se ligam a T_4 mais fixamente que em T_3 . Acredita-se que o T_4 sofre uma desiodação para a forma de T_3 ao entrar em contato com os receptores celulares presentes nos tecidos-alvo (Figura 3), ou até mesmo durante o processo de carreamento pelo sangue⁷.

Qualquer mutação gênica nas proteínas presentes no interior da glândula tireoide ou alterações nos níveis de TSH afetam diretamente na síntese ou no controle da secreção dos HT, podendo causar doenças e distúrbios na tireoide como o Hipertireoidismo, quadro de hiperfunção da glândula tireoide com um aumento na produção, secreção e concentração dos HT; e o Hipotireoidismo, resultante da diminuição da produção e da redução dos níveis de HT na corrente sanguínea, provocando deficiência nos tecidos-alvo. Esses distúrbios causam diversas alterações fisiológicas⁶, sendo algumas listadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Alterações fisiológicas provocadas por distúrbios na tireoide.

Alterações fisiológicas	
Hipertireoidismo	Hipotireoidismo
Crescimento excessivo	Crescimento retardo
Agilidade mental	Lentidão mental
Taquicardia	Bradicardia
Perda de peso	Aumento de peso
Graus variáveis de diarreia	Constipação
Sudorese excessiva	Sensibilidade ao frio
Hiperatividade	Não consegue praticar atividade física
Fadiga extrema – insônia	Fadiga extrema – sonolência
Irritabilidade	Depressão

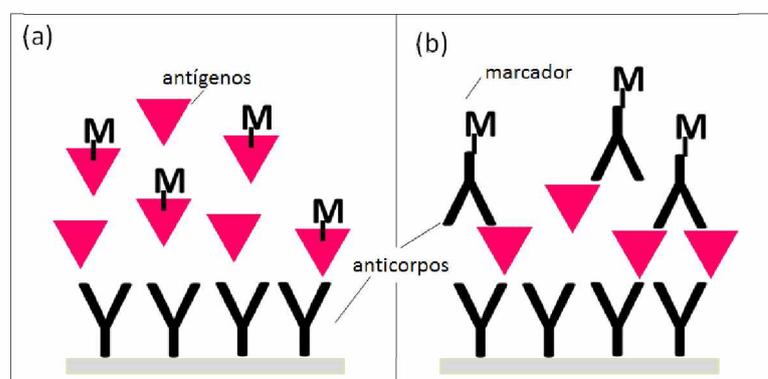
A ocorrência desses defeitos tireoidianos durante o desenvolvimento fetal pode levar a casos de anomalias congênitas e hormonogênese defeituosa. Na ausência dos HT nos primeiros meses de vida, os efeitos no desenvolvimento do sistema nervoso central são irreversíveis, com retardo mental grave e distúrbios neurológicos, como ataxia, incoordenação, estrabismo, movimentos coreiformes e perda auditiva neurosensorial, devendo iniciar terapia adequada como tentativa de prevenção de tais danos⁷.

Exames laboratoriais são de extrema importância no diagnóstico de disfunções e monitoramento dos níveis de HT. A dosagem específica de $T_{3(Livre)}$ é bastante útil, principalmente na avaliação de pacientes em estados hipertireoideos, particularmente no

diagnóstico da tirotoxicose, quadro clínico decorrente do excesso da ação dos HT, em que o $T_{3(Liv\text{re})}$ está elevado e o $T_{4(Liv\text{re})}$ normal. E ainda em pacientes com tumores hipofisários secretores de TSH ou com síndrome de resistência aos HT sem clínica de hipertireoidismo, em que os níveis de $T_{3(Liv\text{re})}$ também se mostram altos¹⁰.

A maioria dos exames laboratoriais atualmente utilizam imunoenaios primários para a determinação da concentração de $T_{3(Liv\text{re})}$. Esses ensaios baseiam-se na interação antígeno-anticorpo, cuja interação fornecerá um sinal útil para análise. Os ensaios podem ser divididos em dois tipos: competitivos ou não-competitivos¹¹, representados na Figura 4.

Figura 4 – Representação esquemática de imunoenaios competitivos (a) e não-competitivos (b).



FONTE: Autora, 2017.

No método competitivo, Figura 4(a), uma quantidade limitada de anticorpo específico para T_3 é fixada em uma matriz. No meio reacional são adicionadas amostras de soro do paciente que contém o alvo T_3 para promover a interação entre antígeno e anticorpo, porém também é adicionado no meio reacional uma quantidade definida de T_3 análogo ligado a um marcador, fazendo com que haja uma competição pelo sítio de ligação do anticorpo entre o $T_{3(Liv\text{re})}$ proveniente do soro do paciente com o T_3 marcado adicionado. Nesse procedimento, quanto maior a concentração do $T_{3(Liv\text{re})}$ no soro do paciente, menor o sinal observado¹².

Já no método não-competitivo, Figura 4(b), são usados dois anticorpos no meio reacional, um deles fixado a uma matriz, sendo adicionado um outro contendo um marcador; quando em contato com o soro do paciente, o anticorpo fixo permite a ligação com o $T_{3(Liv\text{re})}$, enquanto que o anticorpo marcado se liga em outra região da molécula de $T_{3(Liv\text{re})}$. Neste procedimento, quanto maior a concentração de $T_{3(Liv\text{re})}$ no soro do paciente, maior o sinal observado¹².

Os marcadores mais utilizados para o diagnóstico de $T_{3(\text{Livre})}$ são os marcadores radioativos, geralmente empregando o I^{125} , marcadores quimioluminescentes, e os marcadores enzimáticos que dão os nomes para os ensaios laboratoriais de Radioimunoensaio (RIE), Quimioluminescência, e Enzimaimunoensaio (EIA, do inglês *Enzyme Immunoassay*), respectivamente. Estes ensaios são muito utilizados devido à alta sensibilidade, porém demandam aquisição de aparelhos de alto custo e pessoal especializado, como no caso dos RIE, que exigem pessoal credenciado na Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN)¹³.

Conforme já mencionado, a quantidade de $T_{3(\text{Livre})}$ no sangue é baixa se comparada à quantidade de T_3 ligado a proteínas plasmáticas. Os exames laboratoriais devem ser altamente específicos e sensíveis para a forma livre, que apresenta concentração de 2,30 a 3,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de soro, em pacientes adultos com funcionamento normal da glândula tireoide⁸. Os imunoensaios estão em constante desenvolvimento para garantir esse equilíbrio $T_{3(\text{Livre})}/T_{3(\text{Ligados a proteínas})}$ e minimizar a diluição dos soros de pacientes. Porém, os resultados obtidos dos imunoensaios são, ainda, muito suscetíveis às variações que ocorrem nas proteínas plasmáticas carreadoras, bem como a presença de certos fármacos, níveis elevados de ácidos graxos, anticorpos heterófilos ou inibidores de ligação hormonal, que podem estar presentes em soros de pacientes que não apresentam disfunções tireoidianas, levando assim a resultados falso-positivos¹⁴.

Dessa forma, o desenvolvimento de técnicas de dosagem específicas, envolvendo sensores de tamanho reduzido, baixo custo, elevada sensibilidade e detecção em tempo real são desejados na análise clínica e biomédica, particularmente em diagnósticos próximos aos pacientes, onde a análise utiliza volume reduzido de amostras, não demandando pessoal especializado¹⁵.

1.2 Biossensores

Sensores químicos são dispositivos analíticos capazes de converter uma informação química, seja a concentração ou a presença de um analito em uma dada amostra, a um sinal analítico útil¹⁶. Quando o sensor químico envolve o uso ou o reconhecimento de moléculas biológicas em sua interface, tem-se um biossensor, cujo termo foi primeiramente proposto por Cammann¹⁷ em 1977, apesar de o primeiro biossensor ter sido desenvolvido em 1962 por

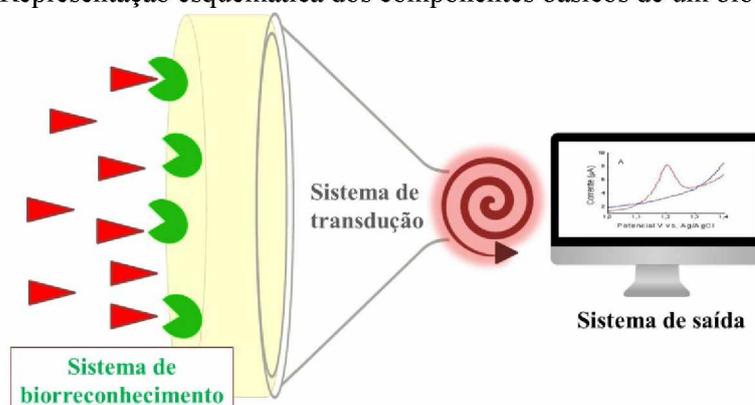
Clarck e Lyons¹⁸, quando propuseram o conceito de interpor camadas de membrana contendo enzimas entre solução e eletrodo, fornecendo a base para os biossensores.

Desde essa descoberta, diferentes tipos de biossensores têm sido desenvolvidos para aplicação em uma variedade de áreas, como nas indústrias alimentícias, utilizados para a detecção de agentes patogênicos, compostos pesticidas, corantes, contaminantes; indústrias de fermentação, para monitorar a presença de produtos, enzimas, biomassa, ou subprodutos do processo; área ambiental, para a detecção de substratos de enzimas, receptores e transportadores em plantas e também monitoramento de contaminantes ambientais; fins militares, quando em ataques biológicos para identificação de micro-organismos; área da medicina, para análises clínicas e diagnóstico de doenças e agentes infecciosos¹⁹.

Um dos motivos dessa ampla aplicação de biossensores está concentrado na interação bioquímica, que fornece um grau de especificidade e seletividade ao sensor, tornando-o útil para análises qualitativas ou quantitativas. Além disso, outros fatores como baixo custo, pequenas quantidades de amostra, tempo rápido de análise, baixos limites de detecção, capacidade de miniaturização e possibilidade de automação fazem dos biossensores uma ferramenta versátil para aplicação em monitoramento e diagnóstico de diversos analitos alvo.

Os biossensores são constituídos basicamente por: um sistema de biorreconhecimento, no qual uma biomolécula (sonda) está imobilizada sobre a interface que será colocada em contato com o analito de interesse (alvo) para geração de um sinal; um sistema de transdução, capaz de transformar o sinal produzido pela interação biológica em um sinal elétrico; e um sistema de saída, que fornece uma resposta analítica útil²⁰, representados na Figura 5.

Figura 5 – Representação esquemática dos componentes básicos de um biossensor.



FONTE: Autora, 2017.

1.2.1 Classificação de biossensores quanto ao sistema de transdução

A escolha do sistema de transdução, bem como os parâmetros a serem utilizados durante as análises, dependem do tipo de evento de biorreconhecimento. Com base na energia envolvida nesse sistema, podem ser utilizados diferentes tipos de transdutores, como: transdutores ópticos, nos quais o produto de reação modifica a intensidade da luz emitida ou ele próprio gera um sinal óptico detectável²¹; transdutores eletromagnéticos, nos quais é medida a alteração da frequência de vibração de um cristal oscilante pela presença de um analito alvo²²; transdutores calorimétricos, que se baseiam nas mudanças de temperatura ocasionadas pela geração ou diminuição de calor provenientes das reações de biorreconhecimento²³; transdutores eletroquímicos, nos quais são monitorados sinais elétricos de espécies eletroativas, mediante aplicação de um potencial/corrente, de forma que a presença de um analito altera a magnitude do sinal observável²⁴.

Os transdutores eletroquímicos são bastante utilizados em biossensores devido à simplicidade de construção, baixos tempos de resposta, quando comparado aos métodos comerciais utilizados²⁵, capazes de serem miniaturizados, não necessitando de equipamentos de alto custo, visando produção em massa e resultando em baixo custo de dispositivos comerciais, além da facilidade da técnica que não demanda pessoal especializado.

Nesses sistemas eletroquímicos, utilizam-se eletrodos contendo biomoléculas imobilizadas em suas superfícies, as quais apresentam um sinal elétrico característico ou são capazes de alterar o sinal observado de outra espécie eletroativa em solução. O contato desses eletrodos com o alvo gera uma diferença no sinal primeiramente observado, evidenciando a interação efetiva entre sonda e alvo, que é proporcional à concentração do analito de interesse. Esses sinais elétricos são provenientes de processos oxidativos ou redutivos das espécies eletroativas, por meio da transferência de elétrons na interface eletrodo-solução.

Geralmente, são empregadas células eletroquímicas de três eletrodos convencionais, sendo um eletrodo de trabalho, no qual ocorrem as reações de interesse analítico, um eletrodo de referência, usado para manter o potencial constante frente a uma diferença de potencial, devendo apresentar um potencial estável com o tempo e a temperatura e que não seja alterado por pequenas perturbações e, um contra-eletrodo ou eletrodo auxiliar, no qual ocorrem as reações secundárias.

Os biossensores eletroquímicos podem ser subdivididos em cinco categorias: potenciométricos, condutimétricos, amperométricos, voltamétricos e de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). O evento de reconhecimento biológico promove alterações significativas no sinal elétrico observado de acordo com cada técnica:

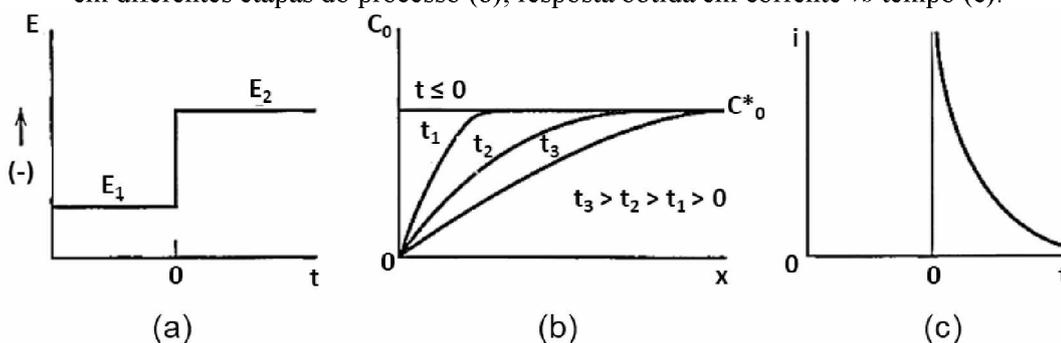
- Nos sensores potenciométricos, é gerado um potencial proporcional ao logaritmo da concentração da espécie ativa em relação ao eletrodo de referência²⁶;
- Nos sensores condutimétricos, há uma mudança na condutância medida entre um par de eletrodos²⁷;
- Nos sensores amperométricos e voltamétricos é medida a corrente produzida perante a aplicação de um potencial fixo para o primeiro e, a variação do potencial pelo tempo para o segundo²⁶;
- Nos sensores de EIE, é gerada uma resposta frente a uma pequena amplitude de voltagem de sinal sinusoidal como uma função de frequência²⁸.

1.2.2 Técnicas eletroquímicas

1.2.2.1 Cronoamperometria

Em uma interface eletrodo-solução, espécies eletroativas estão presentes somente no estado oxidado/reduzido quando não há reação no eletrodo de trabalho, ou seja, quando o potencial, E_1 , está em regiões que não ocorrem reações faradaicas. A imposição de um pulso de potencial, E_2 , em regiões onde ocorrem reações de oxidação/redução das espécies eletroativas gera um gradiente de concentração das espécies até a superfície do eletrodo que não podem coexistir nesse determinado potencial, Figura 6(a). Consequentemente ocorre a eliminação dessas espécies por redução/oxidação, gerando uma corrente faradaica, I_f , proporcional ao gradiente de concentração da espécie²⁹.

Figura 6 – Programação de pulso de potencial em uma cronamperometria (a), perfis de concentração em diferentes etapas do processo (b), resposta obtida em corrente vs tempo (c).



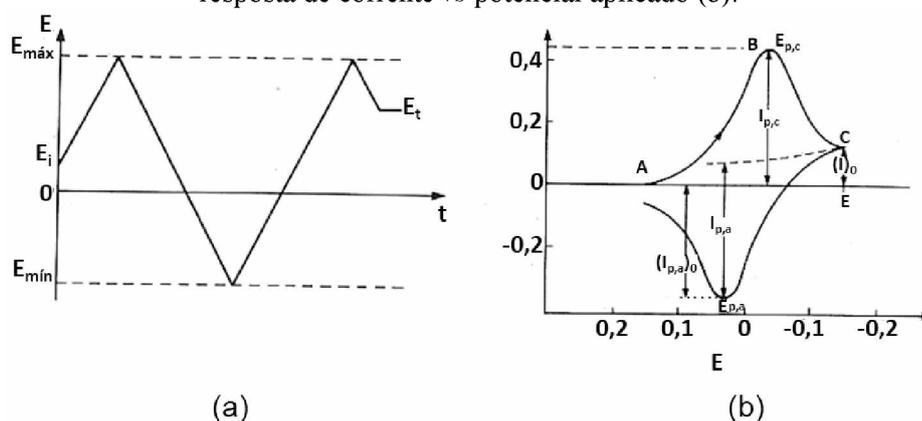
Fonte: adaptado²⁹.

O fluxo contínuo das espécies a serem oxidadas/reduzidas faz com que haja um esgotamento das espécies eletroativas, ocasionando diminuição da concentração das mesmas na superfície do eletrodo, causando uma diminuição da inclinação do perfil da concentração na superfície com o tempo, Figura 6(b). O estudo da resposta faradaica do processo de eletrodo em forma de corrente sobre aplicação de um potencial constante em um determinado intervalo de tempo é objeto da cronamperometria^{26,29}, Figura 6(c).

1.2.2.2 Voltametria Cíclica

Na Voltametria Cíclica (VC) há a varredura linear do potencial em função do tempo em uma direção, seja para valores mais positivos (anódicos) ou negativos (catódicos), até alcançar um potencial de máximo ($E_{m\acute{a}x}$) onde a direção da varredura é invertida para retornar ao potencial inicial (E_i) ou a outro valor de potencial de mínimo ($E_{m\grave{m}n}$) caracterizando um ciclo, Figura 7(a). A resposta dessa programação é um voltamograma cíclico que contém picos referentes aos processos de oxidação e redução da espécie eletroativa²⁶, Figura 7(b).

Figura 7 – Programação da variação do potencial aplicado em função do tempo em uma VC (a), resposta de corrente vs potencial aplicado (b).



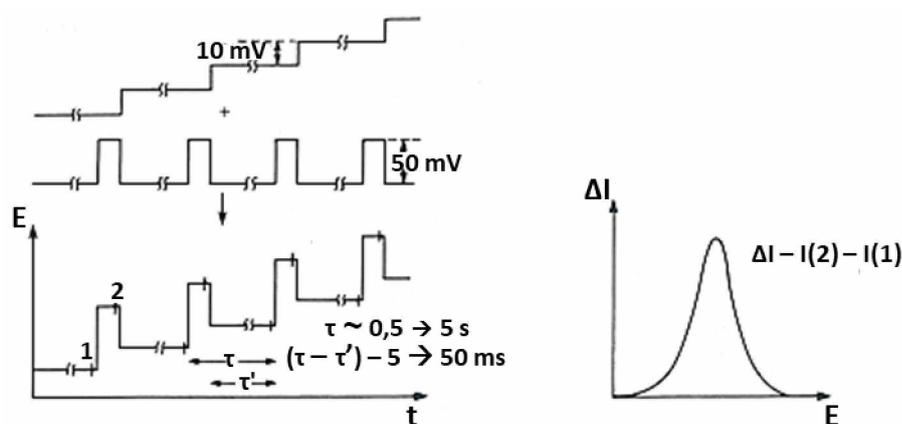
FONTE: adaptado²⁶.

A forma dos picos apresentados no voltamograma da Figura 7(b) deve ser entendida de modo que a aproximação das espécies eletroativas a superfície do eletrodo inicia o surgimento da corrente não-faradaica. Ao alcançar valores de potencial próximos a região do potencial de meia-onda ($E_{p1/2}$), pela varredura contínua do potencial, é iniciada a reação de oxidação/redução da espécie, gerando a corrente faradaica, observada pela intensificação no aclave da corrente até atingir um valor máximo, corrente de pico (I_{pa} para picos anódicos e I_{pc} para picos catódicos), que começa a decair devido ao esgotamento das espécies eletroativas na superfície do eletrodo. Essa técnica é muito utilizada para conhecimento de perfil eletroativo de eletrodos e do processo eletroquímico de espécies²⁶.

1.2.2.3 Voltametria de Pulso Diferencial

Uma melhoria instrumental considerável na discriminação entre as correntes faradaica e capacitiva foi conquistada com o desenvolvimento das técnicas de pulso, principalmente a de Voltametria de Pulso Diferencial (VPD). Nessa técnica é aplicado um potencial de base crescente em uma região onde não ocorrem reações faradaicas. Sobre esta rampa de potencial são aplicados pulsos de potencial de amplitude crescente, com aumento sempre igual. A corrente é amostrada em dois intervalos de tempo de cerca de 15 ms cada um: o primeiro intervalo antes da aplicação do pulso (s_1) e o segundo próximo do final do tempo de aplicação do pulso (s_2), Figura 8(a). O valor final da corrente é a diferença entre os dois valores medidos. A resposta é dada na forma de um pico^{26,29}, Figura 8(b).

Figura 8 – Programação de pulsos sobrepostos em uma rampa de potencial em uma VPD (a), e resposta de corrente vs potencial aplicado (b).



FONTE: adaptado³⁰.

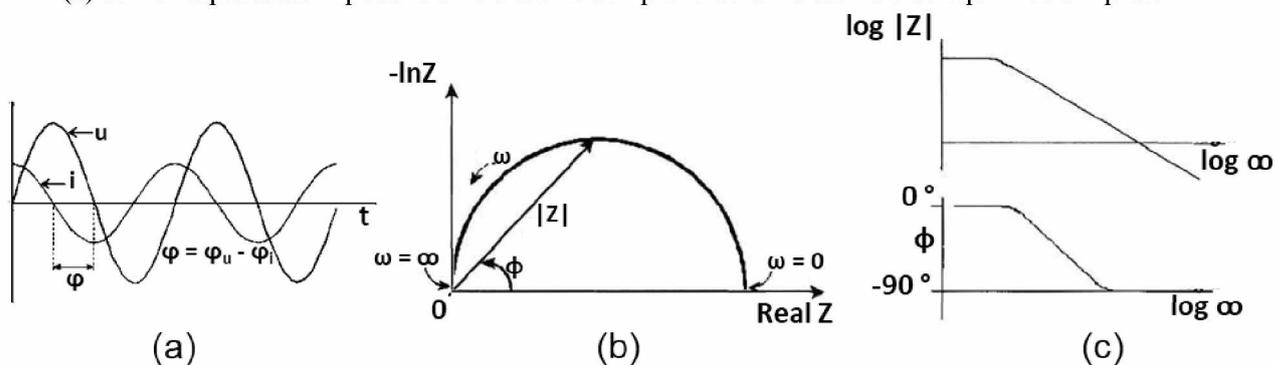
Essa técnica é mais sensível que a voltametria cíclica pela subtração da corrente capacitiva e atinge limites de detecção de 10^{-7} a 10^{-8} mol L⁻¹ ²⁶.

1.2.2.4 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A EIE é uma técnica utilizada para análise de processos eletroquímicos que ocorrem na interface eletrodo-solução. O princípio da técnica envolve a introdução de uma perturbação senoidal de tensão de baixa frequência ω no sistema eletroquímico, para estudar a resposta em termos de corrente do sistema no estado estacionário, caracterizada como uma corrente alternada (AC), Figura 9(a). Dessa forma, tem-se que a impedância é o fator de proporcionalidade entre potencial e corrente²⁶.

Como resposta obtém-se um gráfico no plano complexo, o diagrama de Nyquist, que interpola os valores imaginários de impedância (Z'') em função dos valores reais (Z'). Em geral, os gráficos de resposta contém um semicírculo, cujo diâmetro corresponde a resistência a transferência de carga, Figura 9(b). Também obtém-se como resposta o diagrama de Bode, onde é interpolado o ângulo de fase ϕ e $\log |Z|$ vs $\log \omega$, Figura 9(c). Estes gráficos permitem analisar o processo do eletrodo relacionado com contribuições difusionais (Z_W), capacitância da dupla camada elétrica (C_{dl}), resistência à transferência de cargas (R_{ct}), resistência da solução (R_S) entre outras; por medição da diferença de fase e amplitude do sinal aplicado²⁹.

Figura 9 – Programação de onda senoidal em EIE (a), diagrama de Nyquist (b) e diagrama de Bode (c) como resposta da impedância no sistema complexo de um sistema eletroquímico simples.



FONTE: adaptado³¹.

Outro tipo de análise dos sistemas impedimétricos consiste na comparação com um circuito elétrico equivalente contendo combinações de resistores, que representam o comportamento resistivo do eletrodo; capacitores, representando o comportamento capacitivo

nas interfaces; linhas de transmissão, que equivalem à impedância da difusão iônica ou impedância de Warburg (W), que consiste na resistência complexa referente ao processo de difusão linear semi-infinita; elementos de fase constante (CPE, do inglês *Constant phase element*), relacionado à dispersão da frequência; e elementos de difusão (T)^{26,29}. Esse tipo de comparação é uma das vantagens da técnica, que pode ser usada para representar os sistemas eletroquímicos³².

1.2.3 Eletrodos Modificados

Nos biossensores eletroquímicos, o objetivo da modificação da superfície de eletrodos está na obtenção de maior sensibilidade na detecção de analitos-alvo ou em uma melhor ambientação de biomoléculas, seja por proporcionar um ambiente mais adequado ou uma maior facilidade durante a imobilização. Há diversos métodos de modificação disponíveis para os diferentes tipos de eletrodos, entre os quais estão inclusos a modificação química, a modificação por adsorção e a modificação por eletroadsorção.

A modificação química envolve a imobilização de espécies eletroativas na superfície do eletrodo por reação química. Este método tende a formação de monocamadas, com exceção da ligação química de polímeros. A modificação por adsorção envolve o contato de espécies eletroativas com a superfície do eletrodo por determinado tempo para que ocorra interação, seja eletrostática, por forças de London ou ligações de hidrogênio, na interface. Esse método pode ser irreversível ou reversível, podendo haver perdas do material por lixiviamento. A modificação por eletroadsorção envolve a aplicação de um potencial ao eletrodo, onde a quantidade do material depositado pode estar em função do tempo, nos métodos cronoamperométricos, ou em função do número de ciclos, nos métodos voltamétricos. Este método é muito utilizado no desenvolvimento de polímeros em superfícies eletródicas³³.

Materiais em escala nanométrica têm sido comumente empregados para modificação de superfícies³⁴. O uso desses nanomateriais tem ganhado espaço no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos devido a uma melhoria nas suas propriedades, como por exemplo, a amplificação do sinal, que leva a um aumento na sensibilidade³⁵. Nanomateriais a base de carbono e nanopartículas metálicas são comumente utilizados em pesquisas e que, quando utilizados em conjunto, apresentam efeitos sinérgicos.

1.2.3.1 Grafeno

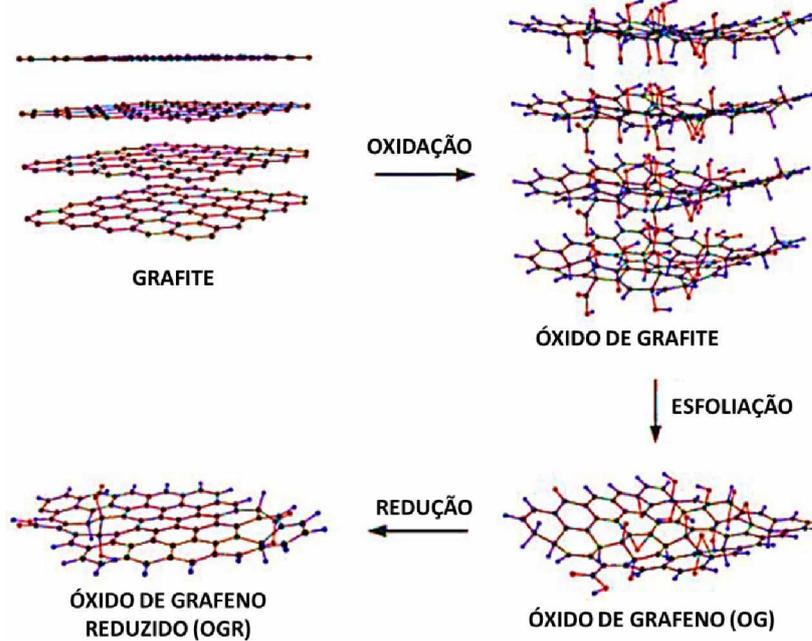
Grafeno pode ser descrito como um material bidimensional, constituído de átomos de carbono ligados covalentemente entre si, arranjados de maneira hexagonal, formando monocamadas. Essas monocamadas ou folhas de grafeno, quando empilhadas, fornecem a estrutura tridimensional do grafite³⁶.

Devido a sua forma estrutural, o grafeno apresenta propriedades físico-químicas únicas como alta área superficial, excelente condutividade térmica e elétrica, alta resistência mecânica, biocompatibilidade aceitável e fácil produção, quando comparado a outros nanomateriais de carbono³⁷. Além dessas propriedades, o grafeno apresenta um amplo potencial eletroquímico com baixa resistência à transferência de carga, quando comparado ao grafite e o carbono vítreo, uma vez que a transferência de elétrons é favorecida pela superfície planar e estrutura eletrônica do grafeno³⁵.

A folha planar do grafeno, embora seja instável na forma livre, foi primeiramente isolada por Novoselov e colaboradores em 2004 pelo método de exfoliação mecânica de grafite pirolítico altamente orientado³⁸ que mais tarde ficou conhecido como método fita adesiva (*scotch-tape*, do inglês). Apesar de ser isolado apenas em 2004, o grafeno e derivados do grafeno têm sido preparados há várias décadas por uma variedade de métodos como exfoliação térmica, eletroquímica ou mecânica; oxidação química, esfoliação e redução; abertura de nanotubos de carbono, deposição por vapor químico e síntese química, entre outros³⁹.

O método por oxidação química, esfoliação e redução, Figura 10, consiste na reação de oxidação do grafite com agentes oxidantes fortes para interposição de espécies químicas entre as camadas de grafeno constituintes do grafite. Essa reação permite uma expansão das camadas constituintes e a possibilidade de separação por esfoliação, formando um material rico em grupos funcionais oxigenados, denominado Óxido de Grafeno (OG). Esse procedimento foi primeiramente realizado por Brodie⁴⁰ (1859) utilizando clorato de potássio e ácido nítrico fumegante, seguido de diversas modificações, onde o método de Hummers e Offeman⁴¹, que levou a substituição dos agentes oxidantes por permanganato de potássio e nitrato de sódio, é um dos métodos mais utilizados para a síntese de OG a partir do grafite^{42,43}.

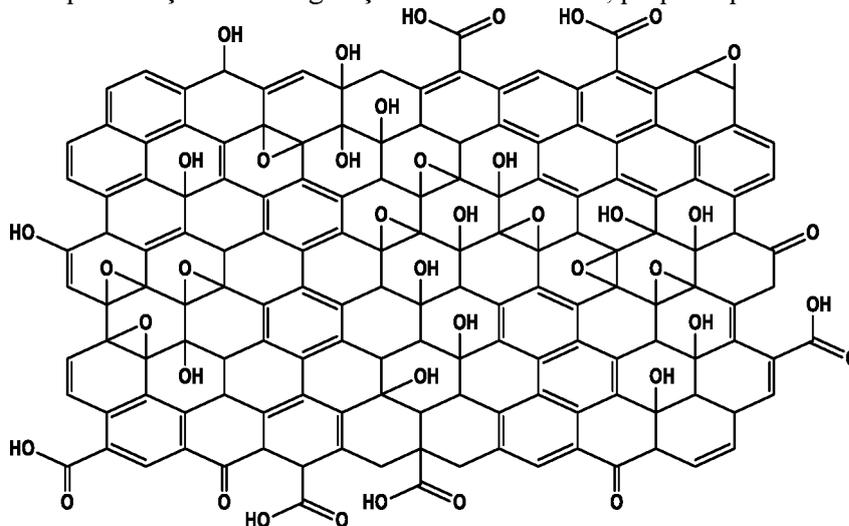
Figura 10 – Representação esquemática da preparação do grafeno pelo método de oxidação, esfoliação e redução química, a partir do grafite.



FONTE: adaptado⁴⁴.

Por se tratar de uma reação não-estequiométrica é difícil prever com exatidão a estrutura do OG e, diversos modelos tem sido propostos para tentar explicá-la. Um dos modelos mais aceitos é o de Lerf e Klinowski⁴⁵, que admite a presença de grupos epóxi e hidroxilas como os principais grupos distribuídos randomicamente em anéis de carbonos conjugados no plano basal e a presença de grupos carboxila e carbonila distribuídos nas bordas das camadas de grafeno⁴² como representado na Figura 11.

Figura 11 – Representação da configuração estrutural de OG, proposta por Lerf e Klinowski.

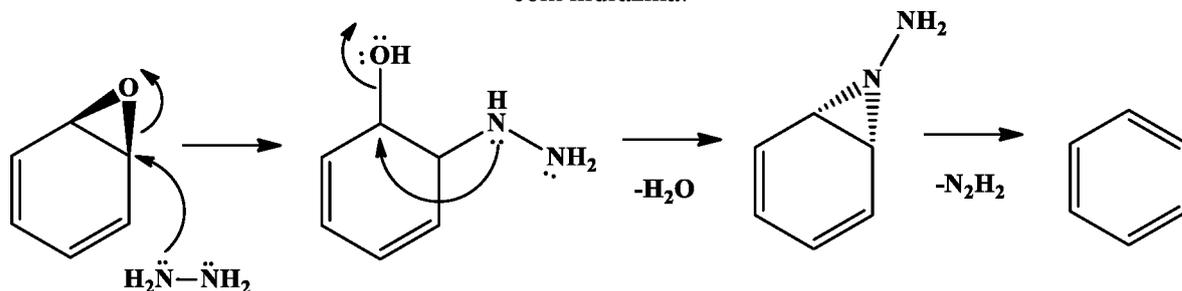


FONTE: Autora, 2017.

A redução química de OG tem sido proposta utilizando uma ampla variedade de redutores químicos, como hidrazina, álcoois⁴⁶, borohidreto de sódio, hidróxido de sódio/potássio, entre vários outros⁴². O objetivo principal da redução é a remoção de grande parte dos grupos funcionais oxigenados e uma aproximação com a estrutura original do grafeno, resultando em uma estrutura conhecida como Óxido de Grafeno Reduzido (OGR). A transformação química de OG em OGR é visualmente caracterizada principalmente pela mudança de cor da dispersão de marrom para preto e, uma diminuição da solubilidade do material decorrente da remoção de grande parte dos grupos polarizantes. Além disso, tem-se que a propriedade elétrica do material é melhorada pela restauração da nuvem π de elétrons⁴³.

A utilização de hidrazina como agente redutor foi primeiramente conduzida por Hofmann e König⁴⁷ em 1937, sendo obtido um material com baixa relação C/O, depois de tratado o material com hidrazina hidratada. O mecanismo de redução não é muito bem definido, mas acredita-se que há um ataque nucleofílico da hidrazina sobre os grupos epóxi, provocando abertura do anel, seguido de protonação para liberação de molécula de água, formando aminoaziridina, submetida à eliminação térmica de diimida, reestabelecendo a dupla ligação do anel^{42,43,48}, como pode ser visto na Figura 12. A hidrazina é um dos agentes redutores mais eficientes na redução de grupos oxigenados⁴⁹, principalmente a redução de grupos epóxi ligados no interior de domínios aromáticos⁵⁰ e deixando algumas carboxilas⁵¹, além da possibilidade da incorporação de funções nitrogenadas na estrutura⁵², que são pontos interessantes na construção de biossensores.

Figura 12 – Representação esquemática do mecanismo proposto para a redução dos grupos epóxi com hidrazina.



FONTE: Autora, 2017.

A redução do OG geralmente resulta em folhas que apresentam defeitos na rede sp^2 de carbono, devido à presença de grupos funcionais oxigenados remanescentes e anéis no plano basal com cinco ou três átomos de carbono. Contudo, as folhas apresentam semelhança com a estrutura primitiva do grafeno e essa rota sintética é bastante adequada para aplicações que requerem a síntese de derivados do grafeno em grande quantidade^{43,46}.

1.2.3.2 Nanopartículas de Ouro

O uso de nanopartículas de ouro (AuNP do inglês *gold (Au) nanoparticles*) em biossensores, as quais são constituídas de átomos metálicos aglomerados na faixa de 1 a 1000 nm que apresentam características intermediárias de metais em escala macro e compostos moleculares⁵³, é justificado pela biocompatibilidade desses materiais com grupos funcionais de biomoléculas, área superficial elevada e excelente condutividade elétrica, que pode ocasionar uma melhora na sensibilidade do sistema⁵⁴.

AuNP podem ser preparadas por redução química ou eletroquímica a partir de uma solução contendo ânions tetracloroaurato (III). Apesar da redução química ser o método mais utilizado para a síntese, muitos agentes redutores empregados apresentam toxicidade, alto custo e podem incorporar resíduos a nanoestrutura⁵⁵. A redução eletroquímica aparece como uma via mais prática e simples no sentido de evitar tais fatores, uma vez que as AuNP são eletrodepositadas diretamente sobre a superfície do eletrodo, perante aplicação de um potencial elétrico.

Além disso, a redução eletroquímica apresenta outras vantagens como o controle da distribuição das nanopartículas sobre a superfície do eletrodo, bem como a quantidade, tamanho e a densidade das mesmas no material depositado. Estas propriedades podem ser controladas a partir de variação de parâmetros como: concentração da solução, onde soluções mais concentradas apresentam maior quantidade de nanopartículas⁵⁶ e tamanhos maiores⁵⁷; tempo de eletrodeposição utilizando a técnica de cronoamperometria, onde a aplicação do potencial de redução em intervalos de tempo muito curtos ou muito elevados conferem uma distribuição não-homogênea das AuNP sobre a superfície⁵⁸.

1.2.3.3 Polímeros

Polímeros podem ser definidos como macromoléculas, que contêm mais de 100 átomos encadeados, que apresentam unidades químicas que se repetem ao longo da cadeia, chamadas de meros, unidas entre si por ligações covalentes. Os polímeros são caracterizados por seu tamanho, estrutura química, tipo de interações inter ou intramoleculares, além do número de meros da cadeia, chamado de grau de polimerização. Compostos capazes de reagir

para formar polímeros são chamados de monômeros, sendo a polimerização a reação pela qual os monômeros se combinam para formar polímeros⁵⁹.

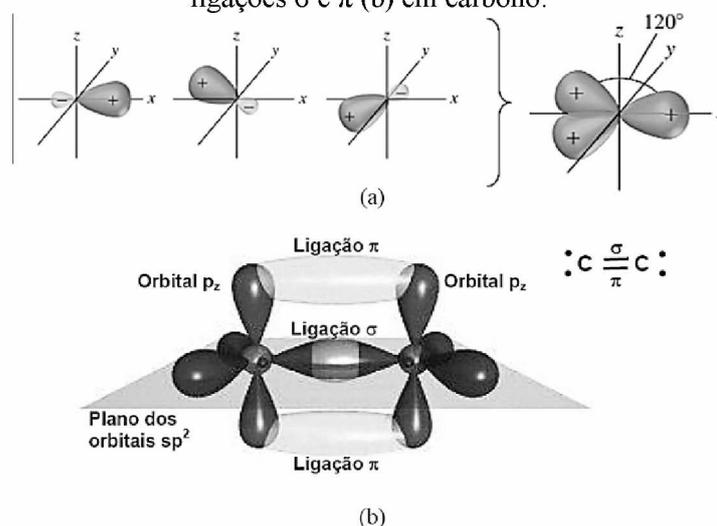
Os polímeros podem ser classificados em diversas classes com base em sua estrutura química, como a ocorrência, forma molecular, encadeamento das unidades monoméricas, arranjo dos átomos, modo de preparação e variedade de meros⁵⁹. Avaliando-se algumas propriedades físicas, há a classificação dos polímeros de acordo com a fusibilidade⁶⁰.

Quanto ao comportamento mecânico, os polímeros são classificados em: borrachas ou elastômeros; plásticos; e fibras. Com relação à capacidade de movimentação de elétrons, ou seja, condução de corrente elétrica, os polímeros são classificados em condutores e não condutores⁶⁰.

Os polímeros condutores são materiais com estruturas que permitem o deslocamento de elétrons, ou seja, apresentam uma sequência de ligações simples e duplas alternadas. Essa estrutura resulta em uma alta conjugação de rede de elétrons desemparelhados e deslocalizados, os elétrons π , ao longo da cadeia polimérica, que leva a distribuição contínua de estados energéticos, constituindo bandas de energia⁶¹.

A forma estrutural característica de polímeros orgânicos em sua maioria é uma estrutura molecular planar. Na estrutura conjugada, os orbitais de valência dos átomos de carbono apresentam três orbitais híbridos sp^2 , cujos principais lóbulos são co-planares em um ângulo de 120° , permitindo um elétron desemparelhado em cada átomo de carbono, Figura 13(a). Concomitantemente, o orbital $2p_z$ tem seu eixo perpendicular aos orbitais híbridos sp^2 .

Figura 13 – Representação esquemática da hibridização sp^2 (a) e de orbitais híbridos formando ligações σ e π (b) em carbono.



FONTE: Adaptado⁶².

A interação de dois átomos de C vizinhos leva a sobreposição de orbitais p_z , resultando na formação de uma ligação π e a ocorrência de elétrons desemparelhados⁶², Figura 13(b).

A ligação dupla resultará, então, na formação de quatro orbitais, os orbitais ligantes σ e π e os orbitais antiligantes σ^* e π^* . A diferença de energia entre os orbitais σ e σ^* é grande, enquanto a diferença de energia entre os orbitais π e π^* é pequena. Desse modo, a interação entre os orbitais ligantes π (HOMO, do inglês *Highest Occupied Molecular Orbital*) assemelha-se à banda de valência dos semicondutores inorgânicos e, a interação entre os orbitais antiligantes π^* (LUMO, do inglês *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) assemelha-se à banda de condução dos semicondutores inorgânicos⁶³.

Contudo, a teoria de bandas de energia não explica o fato da condutividade de polímeros não estar associada aos elétrons desemparelhados, e sim a portadores de cargas de *spin zero*. Nesse sentido, um novo modelo para explicação se baseia na existência de defeitos estruturais na cadeia polimérica, originados durante a polimerização, como a criação de níveis de energia entre a região dos orbitais ligantes e antiligantes, ou seja, no meio da região de *gap*. Esses níveis de energia intermediários que vão possibilitar a movimentação das cargas, sendo armazenadas em estados chamados *sólitons*, *polarons* e *bipolarons*^{62,63}.

Os polímeros condutores vêm ganhando cada vez mais utilização em diversas aplicações e, a principal classe de polímeros condutores inclui o poliacetileno, polipirrol, polianilina, politiofeno, policarbazol, polifluoreno, onde todos eles, com exceção do poliacetileno, apresentam estruturas aromáticas de alta conjugação de elétrons π ⁶⁴.

Vários fatores podem influenciar nas propriedades finais do polímero, como:

- A natureza do monômero, que indica o tipo de interação intermolecular e afeta propriedades como solubilidade, pontos de fusão e ebulição;
- O processo de polimerização, que pode definir aspectos como espessura, densidade;
- A estrutura do polímero, que permite a exposição de grupos funcionais;
- O grau de cristalinidade, que define a organização do arranjo estrutural, existindo polímeros amorfos ou cristalinos, que por sua vez afetam a transmitância da luz, fazendo com que o material final possa ser transparente, translúcido ou opaco;
- A adição de aditivos ou cargas.

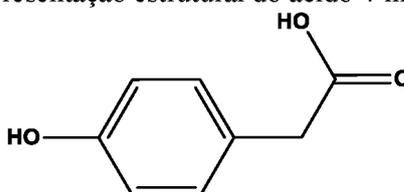
O processo de polimerização envolve um mecanismo de reação em cadeia, podendo ser dividido em três etapas: iniciação, propagação e terminação. A iniciação consiste na fase inicial para promoção de espécies particularmente reativas a partir do monômero, podendo ser radicais livres, íons ou complexos de coordenação. A propagação, considerada a fase determinante, é uma etapa muito rápida e promove o crescimento da cadeia e a regularidade estrutural. A terminação é a fase final de crescimento da cadeia, caracterizada por reações de poliadição. Esses mecanismos podem ser provocados por agentes físicos, como radiações eletromagnéticas e os elétrons ou agentes químicos, entre os quais se destacam os percompostos, azoderivados, ácidos e bases de Lewis e ainda sistemas catalíticos⁵⁹.

O mecanismo ocasionado por elétrons pode ser realizado por via eletroquímica e consiste na aplicação de corrente ou potencial na célula eletroquímica contendo o monômero e um eletrólito suporte, que conduz a formação de radicais livres, cátions, ânions ou complexos, de vida curta. Essa via apresenta vantagens como boa reprodutibilidade, metodologia simples⁶⁵, controle da espessura do filme, não sendo necessária a purificação do polímero formado⁶⁶, crescimento direto sobre a superfície do eletrodo, além de evitar a incorporação de outras espécies, como os agentes oxidantes utilizados pela via química⁶⁷.

1.2.3.4 Polímero do ácido 4-hidroxifenilacético

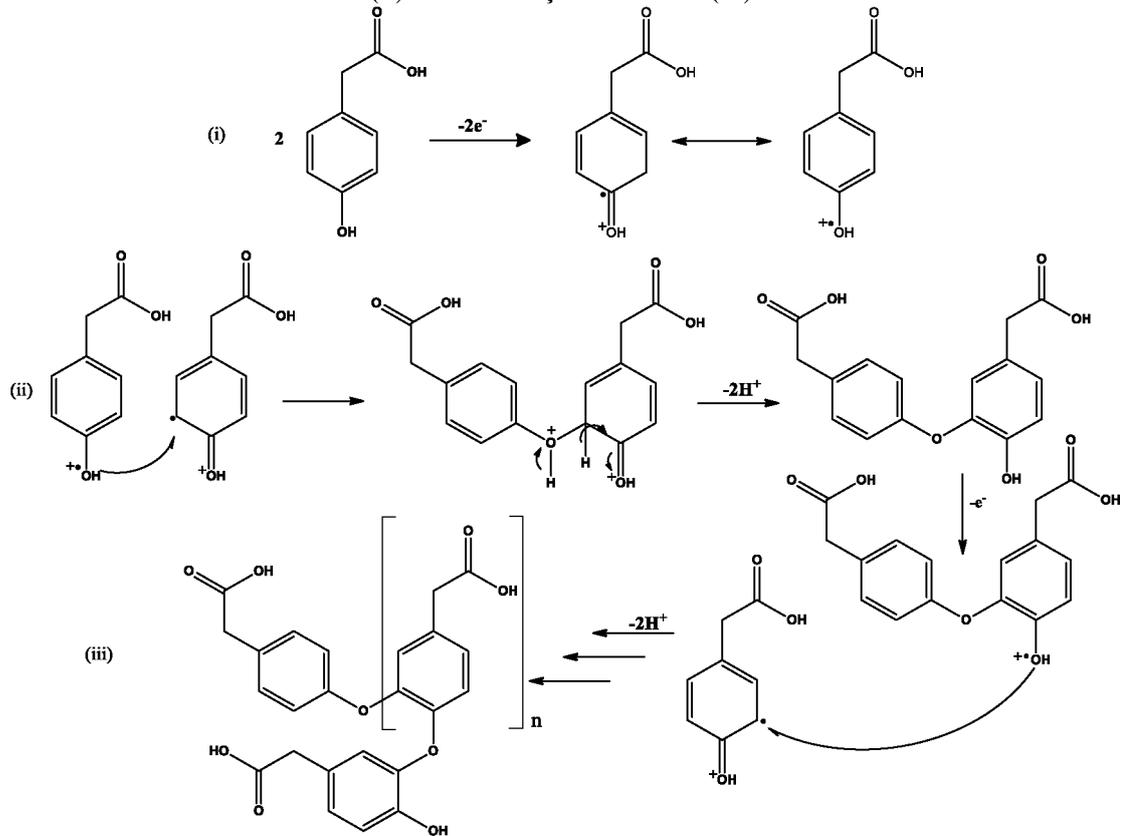
O ácido 4-hidroxifenilacético (4-HFA, Figura 14) é um composto eletroquimicamente ativo, constituído por um derivado fenólico que contém grupos hidroxila (–OH) e carboxila (–COOH) em sua estrutura e vem sendo estudado como monômero pelo Laboratório de Filmes Poliméricos e Laboratório de Biossensores (LAFIP/BIOSENS)⁶⁸⁻⁷⁰.

Figura 14 – Representação estrutural do ácido 4-hidroxifenilacético.



A presença dos grupos oxigenados contribui para uma melhor solubilidade em solventes polares. Além disso, o grupo –OH atua como sítio para a iniciação da reação de eletropolimerização, sendo oxidado a um cátion radical, conforme o mecanismo proposto por Rodrigues e colaboradores⁷¹, representado na Figura 15.

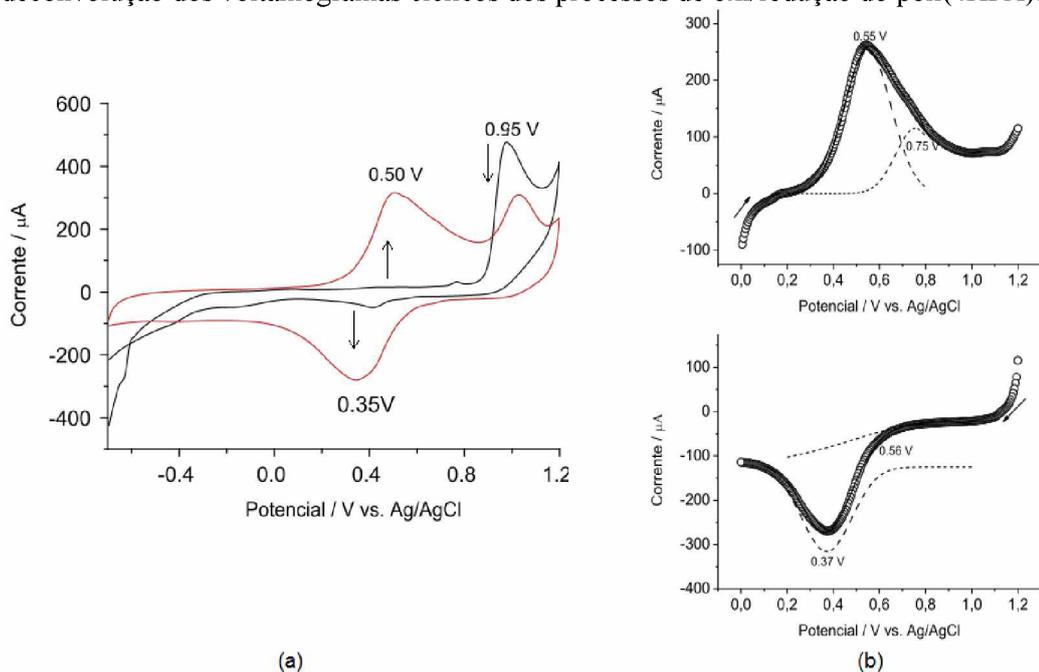
Figura 15 – Mecanismo de eletropolimerização para o ácido 4-hidroxifenilacético, representando a iniciação por eletro-oxidação(i), a propagação pela formação de dímeros e, posteriormente, trímeros (ii) e a terminação da cadeia (iii).



FONTE: adaptado⁷¹.

Estudos de eletropolimerização do filme polimérico do ácido 4-hidroxifenilacético [poli(4-HFA)] foram conduzidos por voltametria cíclica, Figura 16.

Figura 16 – Primeiro e último voltamograma cíclico da eletropolimerização de poli(4-HFA) (a) e deconvolução dos voltamogramas cíclicos dos processos de oxi/redução do poli(4HFA).



FONTE: Adaptado^{70,71}.

Esses estudos revelaram um pico de oxidação irreversível em +0,95 V, Figura 16(a), referente à oxidação do monômero do ácido 4-hidroxifenilacético na primeira varredura de potencial, que tende a diminuir com a contínua ciclagem de potencial, devido à diminuição da concentração das espécies monoméricas em solução^{68,69}.

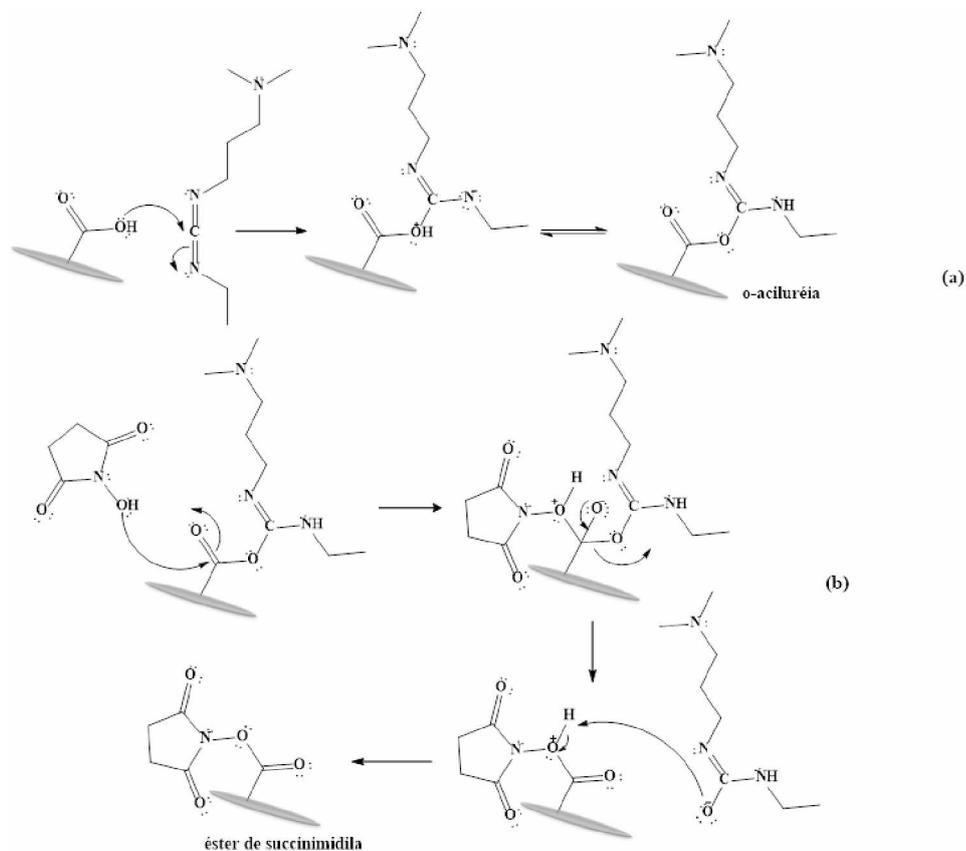
As varreduras seguintes revelam a presença de dois pares redox, sendo o primeiro par mais pronunciado, com potencial de pico anódico em +0,50 V e potencial de pico catódico em +0,35 V, e o segundo par pouco pronunciado constatado por deconvolução dos voltamogramas cíclicos, com potenciais em cerca de +0,75 V e +0,56V, referentes aos processos de oxidação e redução do poli(4-HFA), respectivamente⁷⁰, Figura 16(b). Os picos referentes ao par redox do poli(4-HFA) tendem a aumentar com a contínua ciclagem de varreduras, indicando o crescimento da cadeia polimérica.

Silva e colaboradores⁷² mostraram que a polimerização do poli(4-HFA) é fortemente dependente do pH, pois o mesmo influencia na (des)protonação da estrutura do ácido 4-HFA durante o processo. Foi constatado que, em valores de pH ácido, o monômero oxida em potenciais mais anódicos e, em pH básicos, o potencial de oxidação é deslocado para valores mais catódicos, evidenciando uma facilidade na formação do cátion radical. Porém, nesse pH mais básico, a diferença de potencial de pico anódico e catódico (ΔE_p) aumenta e a intensidade de corrente diminui, o que indica uma piora na transferência de elétrons, sugerindo passivação da superfície.

Gomes⁶⁹ realizou estudos a respeito da relação entre a quantidade de número de ciclos aplicados na eletropolimerização com a carga de oxidação e corrente de pico. Nesse trabalho, foi mostrado que, tanto carga quanto os valores de corrente tem um aumento aproximado de 80% nos 20 primeiros ciclos, caindo para 40% até o 60º ciclo, diminuindo ainda mais com a continuidade das varreduras. Isto está de acordo com o princípio de que quanto mais varreduras, mais material é formado sobre a superfície, aumentando a resistência elétrica interface, dificultando a oxidação dos monômeros em solução.

Retomando ao mecanismo proposto na Figura 15, fica evidente que o filme polimérico formado apresenta grupos carboxila expostos em sua estrutura. Esses grupos podem agir como sítios de promoção de ligação de biomoléculas que, quando combinados com agentes de ligações cruzadas, fornecem um método de imobilização química⁷³.

Figura 18 – Esquema representativo do mecanismo de ativação de superfícies carboxiladas por adição de EDC-NHS.



FONTE: Autora, 2017.

Um ataque nucleofílico por NHS, Figura 18(b) produz o produto éster de succinimidila com a liberação de ureia, correspondente ao reagente carbodiimida inicial, produzindo um intermediário mais estável, destinado a reagir preferencialmente com uma amina primária, para formar uma ligação amida⁷⁸.

Para obter uma modificação mais completa, deve-se atentar para a escolha das concentrações de EDC e NHS. A mistura equimolar desses reagentes, em uma faixa de concentração baixa (em torno de 5 mmol L^{-1}), é uma opção apropriada para atingir o objetivo desejado. Em outras palavras, a mistura equimolar leva a ativação da superfície com o éster de succinimidila como produto final, evitando o aparecimento de subprodutos de reação indesejáveis⁷⁶.

A imobilização orientada é bastante almejada quando se trabalha com uma classe de biossensores que emprega a imobilização de anticorpos no sistema de biorreconhecimento, denominada de imunossensores, devido à forma estrutural das biomoléculas utilizadas nessa classe⁷³.

1.3 Imunossensores Eletroquímicos

A natureza da biomolécula a ser imobilizada no sistema de biorreconhecimento de um biossensor é um fator essencial, uma vez que ela determinará a seletividade e a especificidade do mesmo frente ao analito-alvo, além de ser um elemento característico de distinção que pode levar a uma nova classificação dos dispositivos. Dessa forma, os biossensores podem ser classificados quanto à natureza da biomolécula em²⁸:

- Sensores enzimáticos, quando uma enzima é imobilizada;
- Genossensores, quando DNA, RNA ou fragmentos são imobilizados;
- Biossensores celulares ou microbiológicos, que empregam a imobilização de células;
- Biossensores miméticos, caracterizados por um sensor sintético que mimetiza a função de um biossensor natural; e
- Imunossensores, quando se baseiam na reação imunológica antígeno-anticorpo.

O surgimento dos imunossensores data da década de 1970 quando foi proposta a ideia de fixar anticorpos diretamente na superfície de sensores^{79,80}. O sistema idealizado deveria ter algumas especificações, como a habilidade de detectar e quantificar o antígeno, principalmente em amostras reais, dentro da concentração requerida e com um tempo de resposta razoável. Também deveriam ter a capacidade de repetir a medida no mesmo dispositivo, além de não necessitarem da adição de reagentes externos para transdução do sinal⁸¹.

Atualmente, os dois tipos de transdutores mais utilizados em imunossensores são o óptico e o eletroquímico. Os transdutores ópticos, quando acoplados aos imunoensaios, tem apresentado sensibilidade limitada. Em contraste, imunossensores eletroquímicos superam este problema e são rápidos, simples e econômicos⁸², além de terem a vantagem de poderem ser miniaturizados, tornando-se portáteis⁸³. Os imunossensores eletroquímicos, em conjunção com a nanotecnologia, apresentam também a possibilidade de detectar analitos em volumes muito pequenos⁸⁴.

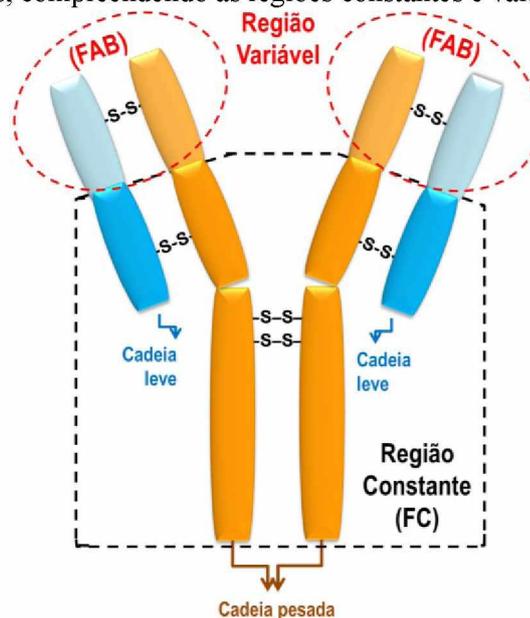
Em imunossensores eletroquímicos amperométricos, a interação antígeno-anticorpo é convertida em um sinal eletroquímico, como resposta de corrente elétrica, cujo sinal apresenta diferença significativa em magnitude com o sinal do imunossensor na ausência do alvo⁸³.

Devido à reação imunológica de antígeno-anticorpo sobre a superfície de imunossensores, esses têm como maior vantagem a alta especificidade de ligação, podendo levar a uma melhora na sensibilidade do sensor. A utilização de anticorpos como sondas se destacam, devido à alta afinidade com seus respectivos antígenos frente a uma amostra complexa, além de serem estáveis e versáteis⁸².

A associação de anticorpos com antígenos se dá de forma não covalente, denominada imunocomplexo e é semelhante à interação de enzimas com seus substratos ou de hormônios com seus receptores, com a diferença que o anticorpo não provoca nenhuma alteração irreversível ao antígeno, podendo o imunocomplexo se dissociar em seus dois componentes. Essa dissociação pode ser atingida por altas concentrações de sal, pH extremo, detergentes e, em alguns casos, por competição em altas concentrações do próprio epítipo puro⁸⁵.

Anticorpos ou Imunoglobulinas (Ig) são componentes do sistema imune, constituídos por glicoproteínas, produzidos pelos linfócitos B que respondem a presença de moléculas estranhas ao organismo, os antígenos. A grande maioria dessas glicoproteínas possuem quatro cadeias polipeptídicas arranjadas em uma estrutura em forma de Y, que contém duas unidades idênticas chamadas cadeias pesadas (H, do inglês *heavy*) e, duas unidades idênticas de menor tamanho, chamadas cadeias leves (L), onde cada cadeia leve se encontra ligada a uma cadeia pesada, e as cadeias pesadas se interconectam covalentemente por pontes dissulfeto⁸⁶, representado esquematicamente na Figura 19.

Figura 19 – Representação esquemática da estrutura básica de um anticorpo com as cadeias pesadas e leves, compreendendo as regiões constantes e variáveis.



FONTE: Autora, 2017.

As cadeias polipeptídicas são constituídas por estruturas primárias que permitem a classificação dos anticorpos em cinco classes: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Cada cadeia polipeptídica apresenta uma região constante, chamada de Fragmento cristalizável (Fc) e uma região variável, sendo esta última a responsável pela especificidade do anticorpo, pois ela forma os sítios de ligações do antígeno, chamado de fragmento de ligação do antígeno (Fab, do inglês *Fragment Antigen-Binding*)⁶.

Cada Fab apresenta um único sítio de ligação do antígeno, chamado de epítipo, composto pela região variável da cadeia L e a parte amino terminal da cadeia H, de modo que o Fc é constituído pela região constante da cadeia L e da parte carboxiterminal de ambas cadeias H⁸⁷.

A especificidade do anticorpo com relação ao epítipo está como função de sua sequência de aminoácidos. Cada cadeia L e cada cadeia H da região Fab apresenta três sub-regiões distintas de sequências altamente variáveis, conhecidas como regiões hipervariáveis. Ao total, há a presença de seis regiões hipervariáveis que são as regiões determinantes de complementariedade ao antígeno. A diversidade nessa região é que diferencia a alta afinidade dos anticorpos com seu antígeno específico. É estimado que podem ser produzidos 10^8 diferentes especificidades, partindo da estrutura molecular básica e, dessa forma, um anticorpo individual normalmente reconhecerá apenas um antígeno⁸².

Pesquisas direcionadas para a detecção de T_3 , utilizando imunossensores eletroquímicos, datam de 1999 quando Aboul-Enein e colaboradores⁸⁸ relataram a construção de um imunossensor amperométrico por imobilização do anticorpo Anti- T_3 em pasta de grafite, obtendo sucesso na detecção de T_3 na ausência de interferentes. Posteriormente, esses pesquisadores relataram um segundo método, imobilizando a enzima L-aminoácido oxidase ao invés de Anti- T_3 , com intenção de detectarem ambos HT, mas não obtiveram sucesso, pois um influencia no sinal do outro⁸⁹. Essa resposta foi melhorada quando o imunossensor foi acoplado a um sistema de análise de injeção sequencial⁹⁰.

Moldoveano e colaboradores⁹¹ descreveram um imunossensor potenciométrico utilizando micro sensores fabricados com eletrodos de pasta de grafite contendo nano pó de carbono modificado com maltodextrina ou α -ciclodextrina como matriz. Eles mostraram que a detecção de T_3 , na presença de T_4 , depende da relação da concentração de ambos, e que os resultados sofrem interferência pela presença de triptofano e serotonina.

Silva⁹² desenvolveu um imunossensor para a detecção de T₃ por imobilização por adsorção física do Anti-T₃ em eletrodos de grafite modificados com o composto de politiramina e óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente, obtendo sucesso na detecção do alvo T₃, atingindo um limite de detecção de 0,001 ng mL⁻¹.

O desenvolvimento de um imunossensor para T₃ que seja altamente específico para a forma livre, capaz de detectar a concentração presente na corrente sanguínea, que apresente reprodutibilidade nas análises e estabilidade por determinado tempo, além de serem altamente seletivos para diferenciação de T₄ é ainda um desafio proposto. A utilização de uma plataforma polimérica ativada com agentes de ligação cruzada para imobilização química do anticorpo, simultânea ao uso de nanomateriais para permitirem uma amplificação do sinal de resposta é uma alternativa para tentar alcançar tais objetivos.

Os anticorpos ou biomoléculas em geral, imobilizados sobre matrizes poliméricas, nanomateriais ou diretamente sobre a superfícies de eletrodos, bem como esses materiais isoladamente, podem ser estudados e caracterizados por uma diversidade de técnicas, que incluem os métodos eletroquímicos, espectroscópicos, microscópicos e térmicos, abordados nesse trabalho.

1.4 Caracterização dos eletrodos modificados e nanomateriais

Técnicas espectroscópicas e térmicas fornecem informações a respeito da estrutura e algumas propriedades dos materiais, enquanto as técnicas microscópicas permitem uma visualização morfológica da superfície do eletrodo após a modificação, onde aspectos como morfologia, rugosidade e espessura de camada podem ser obtidos.

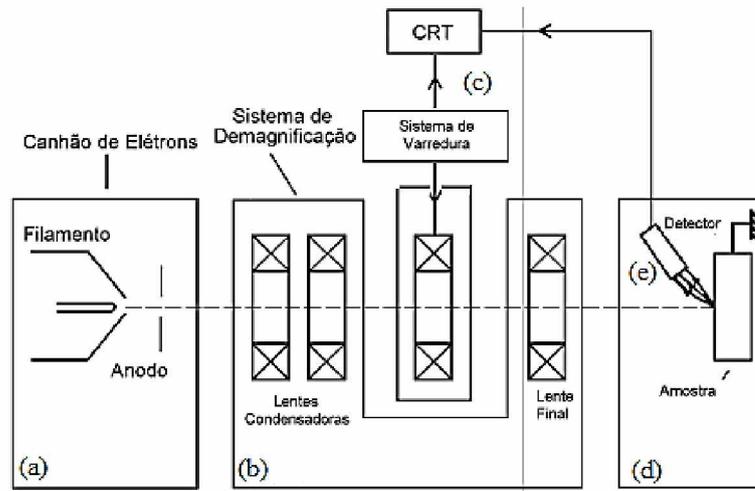
1.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica que envolve a utilização de um feixe de elétrons que promovem a ampliação de imagens com alta resolução e aparência tridimensional.

Esta técnica é baseada na utilização de um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do

detector, cuja resposta modula o brilho de um tubo de raios catódicos, e que é varrido em sincronismo com o feixe eletrônico. O feixe de elétrons mais utilizado é originado de um filamento de tungstênio (W) aquecido, guiado por um sistema de bobinas, possibilitando a geração do sinal de imagem, por produção de elétrons e fótons que são coletados, detectados e convertidos em um sinal de vídeo⁹³. A Figura 20 representa os componentes básicos de um aparelho de microscópio eletrônico de varredura.

Figura 20 – Representação esquemática dos componentes de um MEV.



FONTE: adaptado⁹⁴.

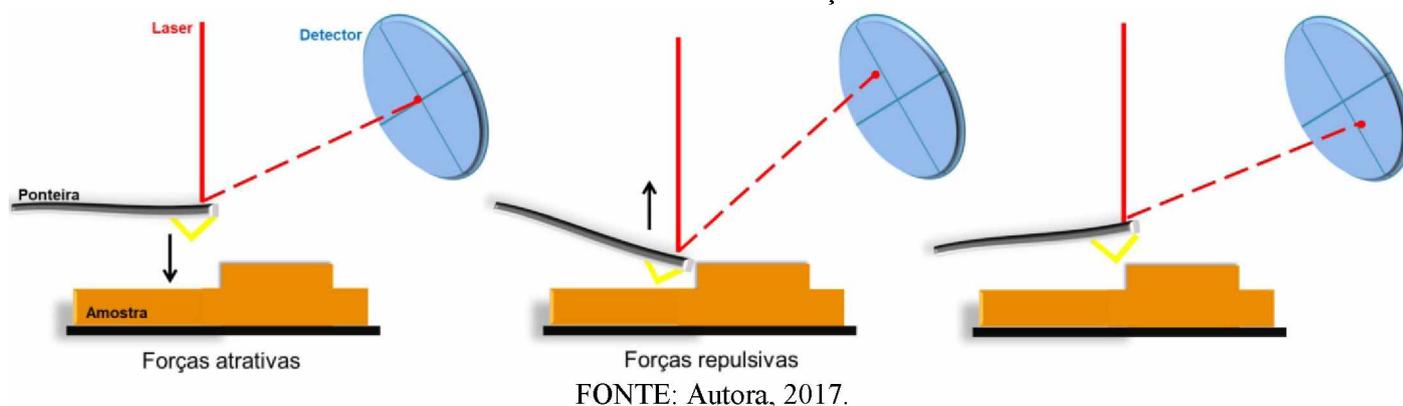
O microscópio eletrônico de varredura é constituído basicamente de uma coluna óptico-eletrônica, Figura 20(a), que é responsável pela geração do feixe de elétrons gerados pelo canhão eletrônico; de um sistema de demagnificação, Figura 20(b), ao qual um sistema de lentes demagnifica a imagem para um tamanho final de 1 nm a 1 μ m ao atingir a amostra; da unidade de varredura, Figura 20(c) que consiste de bobinas defletoras que comandam o ponto de impacto dos elétrons sobre a amostra; da câmara de amostra, Figura 20(d), onde são inseridas as amostras; de um sistema de vácuo, responsável por atingir o vácuo apropriado para as análises; do sistema de detectores, Figura 20(e), que coletam os sinais emitidos e são acoplados ao sistema de visualização da imagem⁹⁴.

1.4.2 Microscopia de Força Atômica

O princípio básico da microscopia de força atômica consiste na medição de forças ou interações entre uma ponteira e a superfície da amostra, a partir de um microscópio de força atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscope*). Esta técnica permite uma caracterização

em escala atômica, obtida por vários métodos simultâneos, tornando-a mais completa. No AFM, uma ponta é acoplada a uma mola do tipo plana, cuja combinação é chamada ponteira (do inglês *cantilever*), que é colocada em contato com a amostra. À medida que a ponteira se aproxima da amostra, há uma atração pela superfície devido a forças atrativas, que vão aumentando até que a distância seja tão próxima que promove a repulsão dos orbitais eletrônicos dos átomos e enfraquece a força atrativa, onde a ponteira se dobra afastando-se da amostra, Figura 21, podendo, então, ser operados nos modos contato e não-contato. Como resposta a força de interação entre a ponta e a superfície, a mola é defletida⁹⁵.

Figura 21 – Representação esquemática da movimentação de uma ponteira do AFM sobre a amostra de acordo com a distância e as forças interativas.



No modo contato, a separação é da ordem de Å e, assim, a força de repulsão iônica permite que a topografia da superfície seja mapeada em alta resolução. No modo não-contato a separação entre a ponteira e a superfície da amostra é da ordem de 10-100 nm, e as informações sobre a superfície são obtidas por forças como van der Waals, eletrostáticas, magnéticas, capilares, entre outras⁹⁶. A resposta da análise é obtida pela criação da imagem da superfície da amostra sem destruição da mesma e apresenta como vantagem o estudo de materiais isolantes⁹⁷.

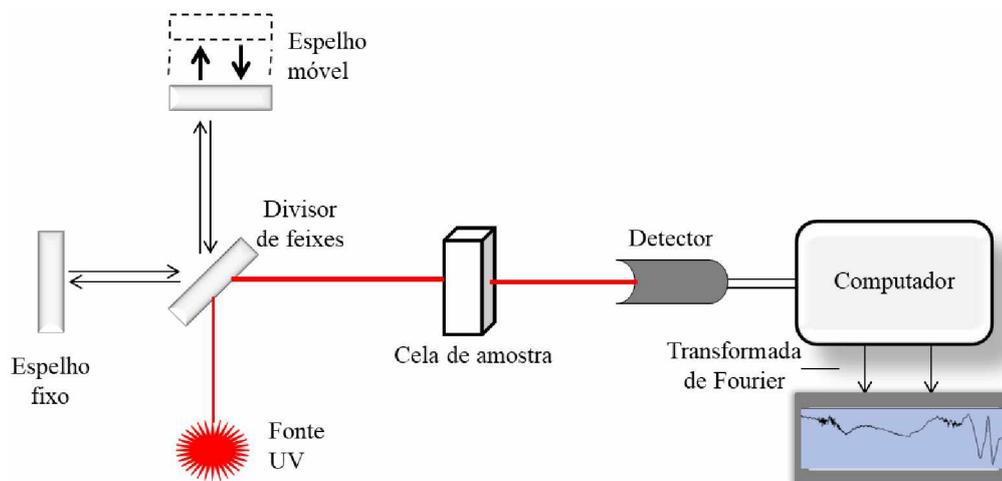
1.4.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho

A técnica de espectroscopia vibracional na região do Infravermelho (IV) fornece informações estruturais de uma molécula, principalmente de seus grupos funcionais, possibilitando a identificação de compostos, pois cada composto apresenta um espectro característico. O princípio básico de funcionamento está baseado na absorção de energia ou

radiação na região do infravermelho por moléculas que apresentam um momento de dipolo, que passam de um estado de menor energia para o estado excitado⁹⁸.

Um espectrômetro de infravermelho é um equipamento que permite a realização da análise, sendo instrumentos dispersivos e de transformada de Fourier os instrumentos mais usados. Nos de transformada de Fourier, o feixe de radiação IV é dividido por um espelho (divisor de feixes) em dois feixes perpendiculares: um é desviado a um ângulo de 90° e enviado a um espelho fixo que o reflete de volta para o divisor; e o outro segue na direção original e vai a um espelho móvel que também o deflete para o divisor, porém que o faz variar de trajetória. Esses dois feixes se encontram no divisor e causam interferências construtivas e destrutivas que dão origem ao interferograma. Esse feixe combinado passa pela amostra, que absorve todos os comprimentos de onda característicos e é captado por um detector, capaz de comparar o interferograma obtido com um interferograma de referência⁹⁹, como está representado na Figura 22.

Figura 22 – Diagrama esquemático de espectrofotômetro de transformado de Fourier.



FONTE: Autora, 2017.

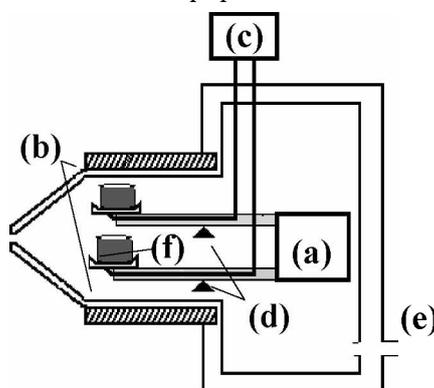
O interferograma final passa pela operação matemática de transformada de Fourier, que converte o mesmo em um espectro idêntico ao obtido por instrumentos dispersivos. A vantagem desse instrumento está na velocidade de geração de interferogramas, gerando um espectro com melhor razão sinal/ruído⁹⁹.

1.4.4 Análise Termogravimétrica

A técnica de análise termogravimétrica (TGA, do inglês *Thermal Gravimetric Analysis*) permite a medição da mudança da massa de uma substância em função da temperatura, sendo esta última submetida a uma programação controlada. Um termograma é obtido como resposta, onde o percentual em massa em função da temperatura é disposto em forma de gráfico¹⁰⁰.

O equipamento utilizado na análise TGA é constituído, basicamente, por uma microbalança, que permite medidas contínuas da massa da amostra, Figura 23(a); um forno, que opera em uma faixa específica de temperatura, Figura 23(b); programador de temperatura, que controla a velocidade de variação de temperatura do forno, Figura 23(c); termopares, constituídos de dois condutores elétricos, sendo uma no ponto onde a temperatura é medida, e a outra a uma temperatura conhecida, Figura 23(d); e um sistema de fluxo de gás, que permite a leitura da medida em atmosferas específicas¹⁰⁰, Figura 23(e).

Figura 23 – Diagrama esquemático de um equipamento de análise termogravimétrica.



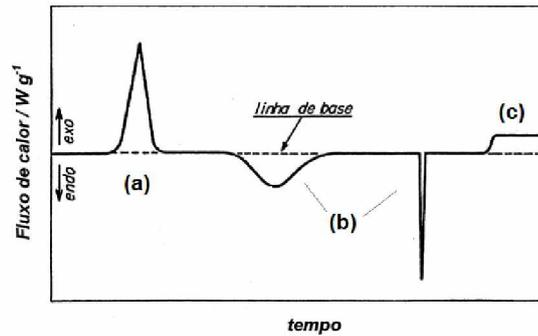
FONTE: adaptado¹⁰¹.

O método de análise térmica diferencial (DTA, do inglês *Differential Thermal Analysis*) permite a comparação da temperatura da amostra com uma amostra de referência inerte, que são submetidos à mesma programação de aquecimento, pela adição de um termopar na substância inerte, Figura 23(f). Com o decorrer do tempo, a temperatura da amostra e da referência se mantêm iguais até a ocorrência de qualquer alteração física ou química na amostra.

Alterações provenientes de reações químicas podem liberar calor, caso de reações exotérmicas, ficando, dessa forma, com uma temperatura maior que a temperatura de

referência por um curto período de tempo, apresentando um pico acima da linha de base, Figura 24(a), e; reações endotérmicas, apresentam um pico abaixo da linha de base, devido a temperatura da amostra ser temporariamente menor que a temperatura de referência, Figura 24(b). Alterações físicas, tais como a fusão, solidificação e cristalização são registradas na forma de deslocamento da linha de base¹⁰², Figura 24(c).

Figura 24 – Representação de uma curva genérica em um experimento de TGA/DTA.



FONTE: adaptado¹⁰².

2. OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um imunossensor eletroquímico para o diagnóstico do hormônio tireoideano triiodotironina – T₃ a partir de eletrodos de grafite modificados com o filme polimérico derivado do ácido 4-hidroxifenilacético sobre o nanocompósito óxido de grafeno reduzido-nanopartículas de ouro.

2.1 Objetivos específicos

- ✓ Sintetizar e caracterizar o óxido de grafeno reduzido a partir do método de oxidação/esfoliação/redução química do pó de grafite;
- ✓ Incorporar o óxido de grafeno reduzido sobre a superfície de eletrodos de grafite;
- ✓ Sintetizar nanopartículas de ouro pelo método eletroquímico sobre a superfície do eletrodo de grafite contendo o óxido de grafeno reduzido;
- ✓ Preparar o filme polimérico do ácido 4-hidroxifenilacético por via eletroquímica sobre eletrodos de grafite contendo o nanocompósito de óxido de grafeno reduzido-nanopartículas de ouro e sobre eletrodos de grafite sem modificação;
- ✓ Caracterizar eletroquimicamente os eletrodos de grafite modificados com o nanocompósito óxido de grafeno reduzido-nanopartículas de ouro e filme polimérico do ácido 4-hidroxifenilacético pela técnica de voltametria cíclica;
- ✓ Imobilizar o anticorpo Anti-Triiodotironina como sonda na superfície do eletrodo de grafite modificado;
- ✓ Detectar o hormônio triiodotironina como alvo;
- ✓ Avaliar a resposta eletroquímica do eletrodo modificado contendo a sonda e sua interação com alvo pelas técnicas de voltametria de pulso diferencial e espectroscopia de impedância eletroquímica;
- ✓ Caracterizar morfologicamente a superfície do eletrodo de grafite modificado com os nanomateriais e contendo as biomoléculas sonda e alvo;
- ✓ Definir faixa de concentração ideal para construção da curva analítica;
- ✓ Avaliar a estabilidade do imunossensor.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Soluções preparadas para desenvolvimento do trabalho

- Dispersão aquosa de óxido de grafeno 1 mg mL⁻¹;
- Dispersão aquosa de óxido de grafeno reduzido 1 mg mL⁻¹;
- Solução de ácido clorídrico (HCl, 37%, Sigma Aldrich) 0,1 mol L⁻¹;
- Solução estoque de ácido perclórico (HClO₄, 70%, Quimibras) 0,5 mol L⁻¹;
- Solução de cloreto de potássio (KCl, 99,89%, Neon) 3 mol L⁻¹;
- Solução de ferro/ferricianeto de potássio (K₄Fe(CN)₆.3H₂O, 99,5%, Fluka Analytical e K₃Fe(CN)₆, 99,0%, Acros Organics) 5 mmol L⁻¹ em meio de solução de KCl 0,1 mol L⁻¹;
- Solução estoque de ácido tetracloroáurico (HAuCl₄.3H₂O, 99,99%, Sigma Aldrich) 0,184 mol L⁻¹;
- Solução de HAuCl₄ 0,01 mmol L⁻¹ em meio de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄, 95,98%, Sigma Aldrich) 0,5 mol L⁻¹;
- Solução monomérica de ácido 4-hidroxfenilacético (99,0%, Acros Organics) 2,5 mmol L⁻¹ em meio de solução de HClO₄ 0,5 mol L⁻¹;
- Solução estoque de tampão fosfato (monohidrogenofosfato, Na₂HPO₄, 98%, Neon, e dihidrogenofosfato, NaH₂PO₄, 98%, Neon) 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4;
- Solução estoque de NHS 100 mmol L⁻¹;
- Solução estoque de EDC (98%, Sigma Aldrich) 100 mmol L⁻¹;
- Solução de anticorpo anti-T₃ 100 µg mL⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4, preparada a partir da diluição do anti-T₃ concentrado obtido pela Sigma Aldrich (P.A.), após quantificação do mesmo pelo espectrofotômetro Biodrop;
- Solução de anticorpo anti-T₃ 1 µg mL⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4;
- Solução de etanolamina (C₂H₇N) 0,1 mol L⁻¹;
- Solução estoque de glicina (C₂H₅NO₂) 50 mmol L⁻¹;
- Solução de hormônio T₃ 200 µg mL⁻¹ preparada a partir da adição de etanol (99,8%, Alphatec) e tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4, na proporção de 1:1 ao T₃ obtido pela Sigma Aldrich (P.A.) como pó;
- Solução de hormônio T₃ 2 µg mL⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4.

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada em sistema *Master System*, (Gehaka), com condutância de 0,05 μ S. A água utilizada para preparo da solução tampão foi previamente autoclavada utilizando equipamento específico modelo Vitali 21 L.

As massas dos reagentes foram medidas em uma balança analítica modelo Shimadzu AUW220D. Os volumes dos reagentes foram medidos em micropipetas volumétricas de diferentes volumetrias. As soluções foram preparadas em balões volumétricos apropriados ou, quando em volume muito pequeno, foram preparadas diretamente em *eppendorf* de volume apropriado.

Todas as soluções foram preparadas no momento da utilização, exceto as soluções descritas como estoque, que foram mantidas sob resfriamento (-12° C para as soluções de biomoléculas e 4° C para as demais soluções). Foi borbulhado gás nitrogênio ultrapuro por 40 minutos nas soluções que foram colocadas em célula eletroquímica antes da utilização para remoção do gás oxigênio dissolvido e o trabalho foi conduzido à temperatura ambiente.

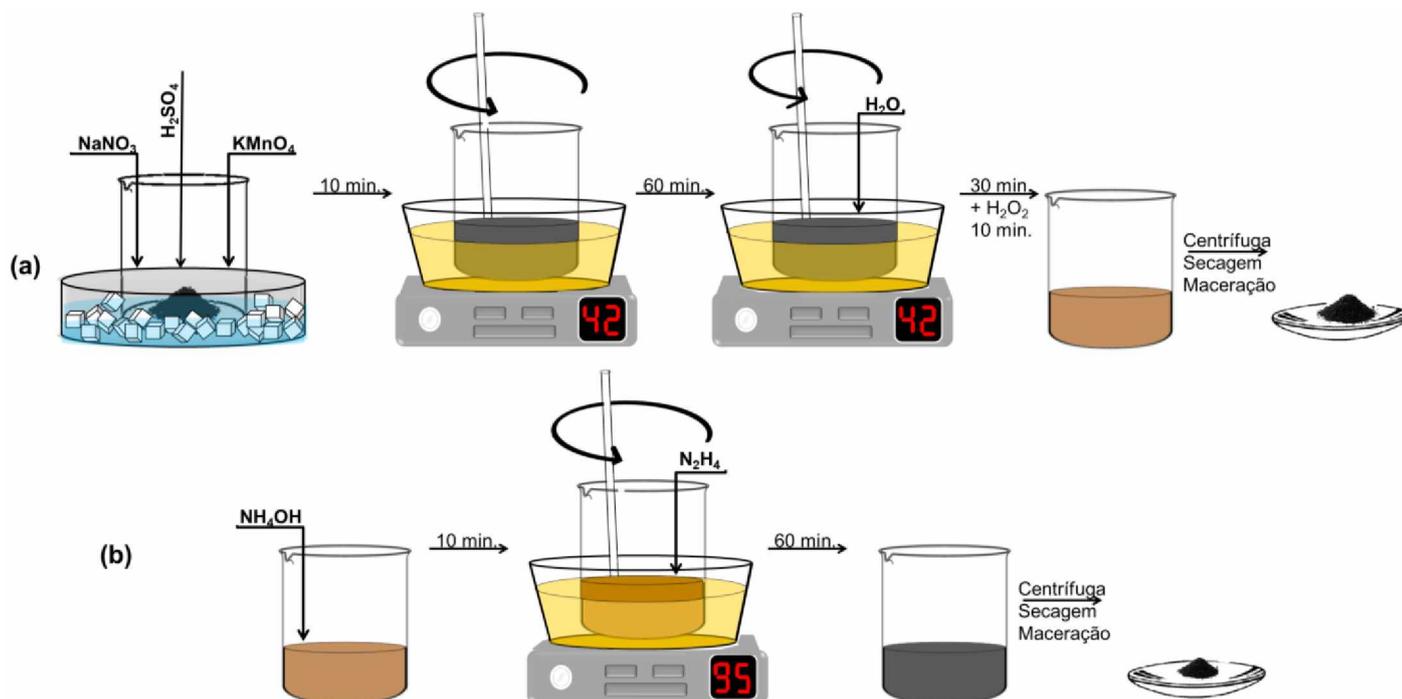
3.2 Equipamentos e métodos

3.2.1 Síntese de óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido

O óxido de grafeno (OG) foi preparado a partir de oxidação química do pó de grafite (99% Sigma Aldrich) seguindo uma modificação do método de Hummers¹⁰³. Resumidamente, a reação foi conduzida pela adição de 6 g de KMnO_4 (P.A.) e 2 g de NaNO_3 (84,99%, Labsynth) em um béquer contendo 50 mL de H_2SO_4 (95,98%, Sigma Aldrich) e 2 g do pó de grafite, em um banho de gelo por 10 minutos, resultando em uma mistura de coloração preta, a qual foi aquecida em banho de óleo a 42° C. A mistura foi agitada mecanicamente por uma hora, seguida de adição de duas porções de 95 mL de água destilada, e contínua agitação por mais 30 minutos, onde uma mudança da coloração da mistura de preto para marrom foi observada. Finalmente 20 mL de H_2O_2 (29%, Synth) foram adicionados à mistura reacional e agitados por mais 10 min.

Ao término, a mistura foi resfriada a temperatura de trabalho (22° C) e levada para centrifugação no equipamento Centrifuge 5804R a 9000 rpm por 15 minutos. O precipitado obtido foi seco em estufa a 55 °C por sete dias. Depois de seco, o precipitado de OG foi macerado em almofariz de vidro até a obtenção de um pó e o mesmo foi armazenado sob proteção da luz solar, como representado na Figura 25(a).

Figura 25 – Esquema representativo das etapas de síntese química de OG (a) e OGR (b).



FONTE: Autora, 2017.

A preparação de óxido de grafeno reduzido (OGR) foi realizada a partir da redução química de 1 L de uma dispersão aquosa de OG 1 mg mL^{-1} preparada a partir de 2 h de ultrasonicação do material sintetizado com água destilada, que resultou em uma dispersão de coloração marrom. Primeiramente, o pH da dispersão de OG foi corrigido para 10 por adição de 1,4 mL de NH_4OH (30%, Synth), aguardando-se 10 minutos e, então, 5 mL de hidrazina (N_2H_4 , 64%, Dinâmica) foram adicionados como agente redutor. Essa mistura foi agitada mecanicamente em um banho de óleo a 95 °C por 1 hora, onde foi observada a restauração da coloração preta no meio reacional e, depois, resfriada até a temperatura do ambiente (22° C). Assim como o OG, a mistura foi levada para centrifugação, secagem em forno, maceração do pó e estocagem sob proteção da luz solar, como representado pela Figura 25(b). Em sequência uma dispersão de OGR foi preparada por 8h de ultrasonicação com água destilada, com concentração de 1 mg mL^{-1} e estocada em geladeira (4° C).

3.2.2 Caracterização do óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido

Análises de TGA/DTA foram realizadas para uma caracterização do comportamento térmico de óxido de grafite e óxido de grafite reduzido sintetizados. Para tanto, foi utilizado um analisador térmico Shimadzu, modelo DTG 60H, Figura 26, do Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (IQ-UFU). Os termogramas foram obtidos a partir de 6 mg de cada composto, na faixa de temperatura de 20 a 1000 °C, numa taxa de 10° C min⁻¹, sendo a taxa de fluxo programada para 50 mL min⁻¹ em atmosfera de nitrogênio.

Figura 26 – Analisador térmico Shimadzu modelo DTG 60 H.



A leitura das medidas de infravermelho foi realizada em um espectrofotômetro Perkin Elmer spectrum 1000, Figura 27(b), resolução de 4 cm⁻¹ de FT-IR do Laboratório de Multiusuário do IQ-UFU. Foram obtidos espectros na região de 4000 a 500 cm⁻¹. Pastilhas de KBr contendo óxido de grafite e óxido de grafite reduzido, separadamente, foram preparadas por prensagem, Figura 27(a).

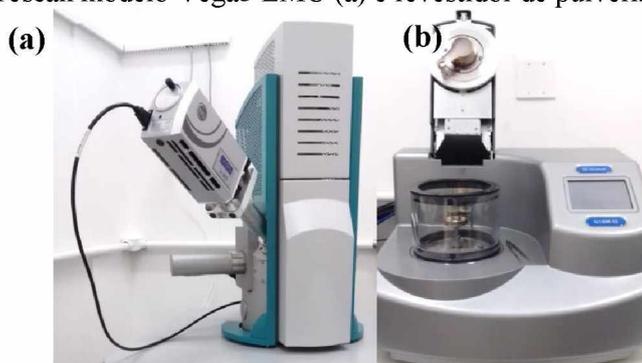
Figura 27 – Prensa Shimadzu modelo DTG 60 H (a) e espectrofotômetro Perkin Elmer spectrum 1000 (b).



Uma análise das morfologias dos nanomateriais foi efetuada utilizando o microscópio eletrônico de varredura Tescan modelo Vega3 LMU de emissão de campo, Figura 28(a), do Laboratório de Multiusuários do IQ-UFU, onde ampliações de 30 000 vezes foram

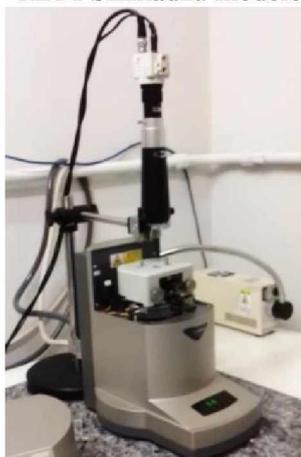
registradas. As amostras foram metalizadas com ouro por um revestidor de pulverização Quorum 150 R, Figura 28(b) durante 90 segundos, perfazendo um recobrimento de 5 nm com uma corrente de 20 mA.

Figura 28 – MEV Tescan modelo Vega3 LMU (a) e revestidor de pulverização Quorum 150 R (b).



Para realizar as análise de microscopia eletrônica de varredura, a dispersão de óxido de grafeno (1 mg mL^{-1}) foi tratada com ultrassom e, utilizando uma micropipeta, $2 \text{ }\mu\text{L}$ do sobrenadante foram transferidos para a superfície de mica recém clivada e espalhado pela mesma com um jato de nitrogênio ultrapuro. A análise foi realizada no microscópio de força atômica Shimadzu modelo SPM 9600, Figura 29, do Laboratório de Física da UFU. As imagens foram obtidas no modo contato-estático gravadas simultaneamente em temperatura ambiente. Para tanto, um *cantilever* comercial de nitreto de silício de $2,9 \text{ }\mu\text{m}$, foi utilizado na leitura e os valores de altura média (R_z), rugosidade média (R_a) e rugosidade média quadrática (R_q) foram calculados usando o *software* SMP Offline - HeightTrace.

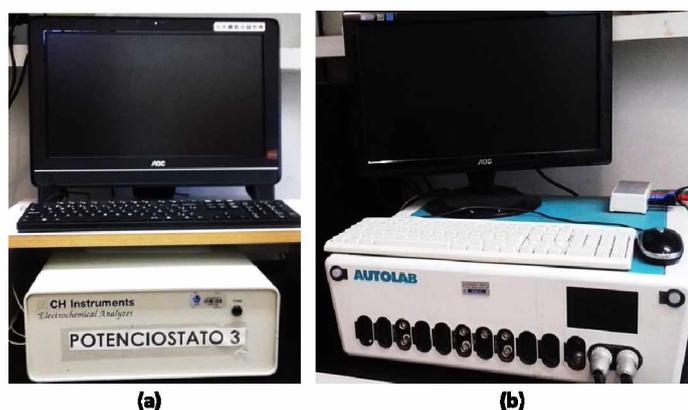
Figura 29 - AFM Shimadzu modelo SPM 9600.



3.2.3 Preparação dos eletrodos utilizados e da célula eletroquímica

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato *CH Instruments* modelo 760C, Figura 30(a) e em um potenciostato/galvanostato da Autolab modelo PGSTAT302N e módulo FRA, Eco Chemie, Utecht, Figura 30(b), do LAFIP/BIOSENS. Os potenciostatos são acoplados a computadores contendo os *softwares* CHI, GPES e NOVA, respectivamente, para o controle dos parâmetros durante a realização dos experimentos e aquisição dos dados. As respostas eletroquímicas foram obtidas por meio das técnicas de voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial, cronoamperometria e de impedância.

Figura 30 - Potenciostato *CH Instruments* modelo 760C (a) e potenciostato/galvanostato Autolab modelo PGSTAT302N (b).

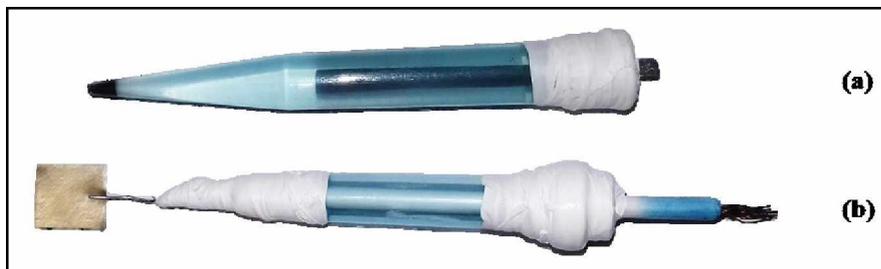


O sistema eletroquímico foi composto de uma célula eletroquímica de três eletrodos com capacidade de 25 mL. O contra-eletródo foi constituído de uma placa de platina, 2 cm² de área geométrica, que foi limpo periodicamente a partir do aquecimento com chama ao rubro. O contato elétrico do mesmo foi feito por um fio de cobre e os mesmos foram colocados no interior de uma ponteira de capacidade de 1 mL (ponteira azul) com a finalidade de revestimento e facilitação do manuseio do mesmo, Figura 31(a).

O eletrodo de referência foi um eletrodo de Ag/AgCl, onde uma placa de prata, 4,5 cm x 2 mm, foi polida com palha de aço e submetida a uma cronoamperometria em solução de HCl 0,1 mol L⁻¹, potencial +0,7 V por 180 s, onde um eletrodo de platina e um eletrodo comercial de Ag/AgCl serviram como eletrodo auxiliar e eletrodo de referência, respectivamente. Dessa forma, o sal insolúvel de AgCl foi eletrodepositado sobre a prata, deixando cerca de 5 mm da extremidade da mesma limpa. A placa foi, então, imersa em

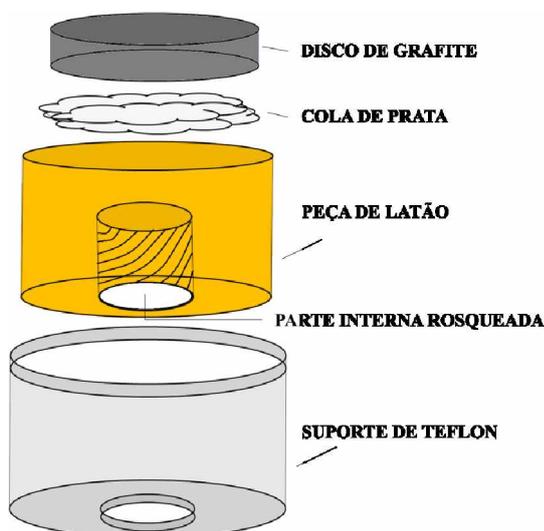
solução de $\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$ contida em uma ponteira azul, revestida em sua ponta com uma membrana semipermeável de bateria, Figura 31(b).

Figura 31 – Eletrodo auxiliar de platina (a) e eletrodo de referência de Ag/AgCl (b).



O eletrodo de trabalho foi um eletrodo de grafite (EG) artesanal fabricado a partir de discos de grafite de 6 mm de diâmetro e espessura entre 1 – 3 mm, previamente cortados de uma barra de grafite (Alfa Aesar, 99,9999%). Uma peça de latão de formato cilíndrico contendo uma rosca em uma das extremidades foi acoplada em um suporte de teflon e, na extremidade lisa do latão foram colados os discos de grafite com cola de prata. Após o tempo de cura da cola de prata, 24 horas, os espaços entre o disco de grafite, o latão e o teflon foram preenchidos com cola adesiva epóxi e esperado mais 24 horas para secagem da mesma, como representado na Figura 32.

Figura 32– Representação esquemática de cada etapa de preparação dos eletrodos de grafite.



FONTE: Autora, 2017.

Os eletrodos de grafite (EG) foram polidos manualmente em lixas d'água 400 e 2000, seguido de polimento em feltro com suspensão de alumina $0,3 \mu\text{m}$. Os EG foram lavados com água destilada em banho de ultrassom por 1 minuto, trocando-se a água e fazendo mais duas lavagens de mesmo tempo. Finalmente, os EG foram secos sob fluxo de nitrogênio e

rosqueados em uma base condutora de latão envolvida com teflon, como mostrado na Figura 33.

Figura 33 – Eletrodos de grafites prontos para uso juntamente com base condutora de latão.



A vantagem da fabricação desses eletrodos está na possibilidade de serem desmontados após o uso, ou seja, os discos de grafite juntamente com a cola adesiva epóxi em volta podem ser removidos, tornando o latão disponível para a colagem de novos discos de grafites, sendo assim, reutilizáveis. Outra vantagem está no baixo custo de fabricação dos mesmos quando comparados à aquisição de eletrodos comerciais. Assim, esse sistema de três eletrodos descritos foi utilizado em todas as análises realizadas nesse trabalho.

3.2.4 Seleção dos eletrodos de grafite

Os eletrodos de grafite foram condicionados eletroquimicamente por meio de varreduras de potencial em solução do eletrólito suporte HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, na qual são realizados ciclos de voltametria até estabilização da corrente não-faradaica, na faixa de potencial de $0,0 \text{ V}$ a $+1,0 \text{ V}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Os eletrodos foram lavados em água destilada e secos em fluxo de nitrogênio. Foi estabelecido que os valores de corrente entre diferentes eletrodos devem ser próximos a $25 \mu\text{A}$ para serem considerados aptos para o trabalho eletroquímico. Esses parâmetros constituem a base para seleção dos EG nos estudos dos nanomateriais e quando há variações nos mesmos, os EG são descartados.

3.2.5 Incorporação do óxido de grafeno reduzido sobre a superfície de grafite

A dispersão de óxido de grafeno reduzido (OGR) 1 mg mL^{-1} previamente preparada foi ultrasonicada por 20 minutos e deixada em repouso por 10 minutos antes da utilização. Inicialmente foram testados diferentes volumes de OGR e, para tanto, 10, 20, 30 ou $40 \mu\text{L}$

foram retirados do sobrenadante com o uso de uma micropipeta, evitando a pipetagem de partículas sedimentadas. Este volume pipetado de OGR foi gotejado sobre a superfície do EG e levado para secagem em forno a 50° C para evaporação da água. Os EG modificados com OGR foram resfriados a temperatura de trabalho e constituem o EG/OGR.

3.2.6 Eletrodeposição das nanopartículas de ouro sobre a superfície de EG/OGR

Os EG/OGR foram imersos na célula eletroquímica contendo solução 0,01 mmol L⁻¹ HAuCl₄ em meio de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹ e a técnica utilizada para a redução das AuNP foi a cronoamperometria, em potencial fixo de -0,25 V, variando-se os tempos de eletrodeposição em 20, 30, 40, 50 e 100 s. Ao término, os EG/OGR modificados com as nanopartículas de ouro (AuNP) foram lavados com água destilada, sendo chamados de EG/OGR-AuNP.

3.2.7 Avaliação da faixa de potencial e número de ciclos da eletropolimerização do ácido 4-hidroxifenilacético sobre EG/OGR-AuNP

O EG/OGR-AuNP foi transferido para uma célula eletroquímica contendo a solução monomérica do ácido 4-hidroxifenilacético 2,5 mmol L⁻¹ em meio de HClO₄ 0,5 mol L⁻¹. Utilizando uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹, foram realizados estudos da faixa de potencial e número de ciclos para eletropolimerização, baseando-se nos estudos previamente realizados pelo grupo LAFIP/BIOSENS. Primeiramente, fixando a faixa de potencial de -0,6 a +1,2 V, foi avaliado o número de varreduras durante a eletropolimerização do filme poli(4-HFA) sobre o EG contendo o nanocompósito, aplicando-se 10, 20, 30 e 40 ciclos.

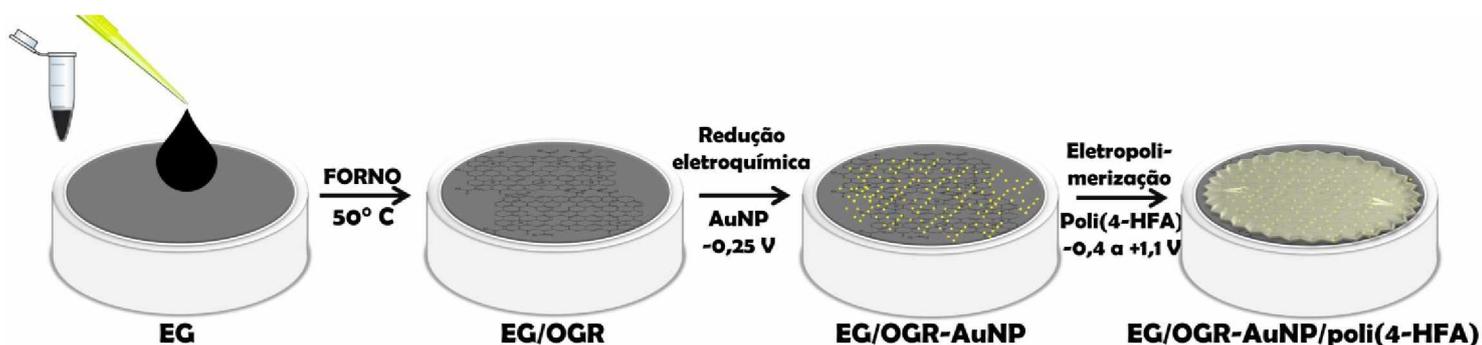
Posteriormente, foi averiguado se a faixa de potencial influenciaria no perfil eletroquímico do filme sobre o nanocompósito. Assim, foram testadas 6 faixas de potencial diferentes, fixando o número de 20 ciclos de varreduras e potencial. As faixas escolhidas podem ser divididas em dois grupos: no primeiro, o E_{máx} foi fixado em +1,2 V e alterado o E_{mín} em -0,6, -0,4 e -0,2 V; no segundo, o E_{máx} foi fixado em +1,1 V e alterado o E_{mín} em -0,6, -0,4 e -0,2 V. Após definição desses parâmetros, foi realizada a eletropolimerização do poli(4-

HFA) sobre EG na ausência do nanocompósito, utilizando as mesmas condições determinadas para EG/OGR-AuNP.

Ao término da eletropolimerização, o EG/OGR-AuNP já modificado com poli(4-HFA) passa a ser denominado de EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA), sendo lavado em água destilada e submetido a 2 ciclos de voltametria somente em solução do eletrólito suporte, na mesma faixa de potencial utilizada durante a eletropolimerização, para remoção de monômeros remanescentes.

Quando os EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) não foram utilizados no mesmo dia para realização das próximas etapas, os mesmos foram mantidos em um recipiente com atmosfera de nitrogênio na geladeira (4° C). Um esquema representativo das etapas de modificação dos EG com os nanomateriais pode ser visto na Figura 34.

Figura 34 – Esquema representativo da modificação do EG com o nanocompósito e filme polimérico.



FONTE: Autora, 2017.

3.2.8 Caracterização eletroquímica e estudo de transferência de carga dos eletrodos de grafite modificados

Após cada etapa de modificação, os eletrodos de grafite foram submetidos a varreduras em HClO_4 0,5 mol L^{-1} fazendo-se ciclagens de voltametria até a estabilização da corrente, na faixa de potencial inicialmente realizada no EG antes da modificação. Essa varredura permitiu efetuar a avaliação do perfil eletroquímico dos EG modificados, que passaram a ser usados como critérios para a escolha dos eletrodos a serem utilizados nas próximas etapas, na qual eletrodos que apresentaram picos de redução/oxidação fora dos E_p , ou até mesmo um perfil distorcido foram descartados.

Também foi realizada voltametria cíclica em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆ 5 mmol L⁻¹ após cada etapa de modificação da superfície. Os parâmetros como faixa de potencial, velocidade de varredura e número de ciclos são os mesmos utilizados nos estudos com o eletrodo de grafite sem modificação. O último ciclo foi utilizado para o estudo, onde foi possível calcular a carga envolvida, pela equação

$$Q = I \cdot t \quad (\text{eq. 1})$$

onde Q é a carga (C), I é a corrente (A), sendo o valor de I_p aplicado e, t é o tempo (s), obtido ao dividir o valor de E_p pela velocidade de varredura.

3.2.9 Imobilização de biomoléculas na superfície do EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) para construção do imunossensor

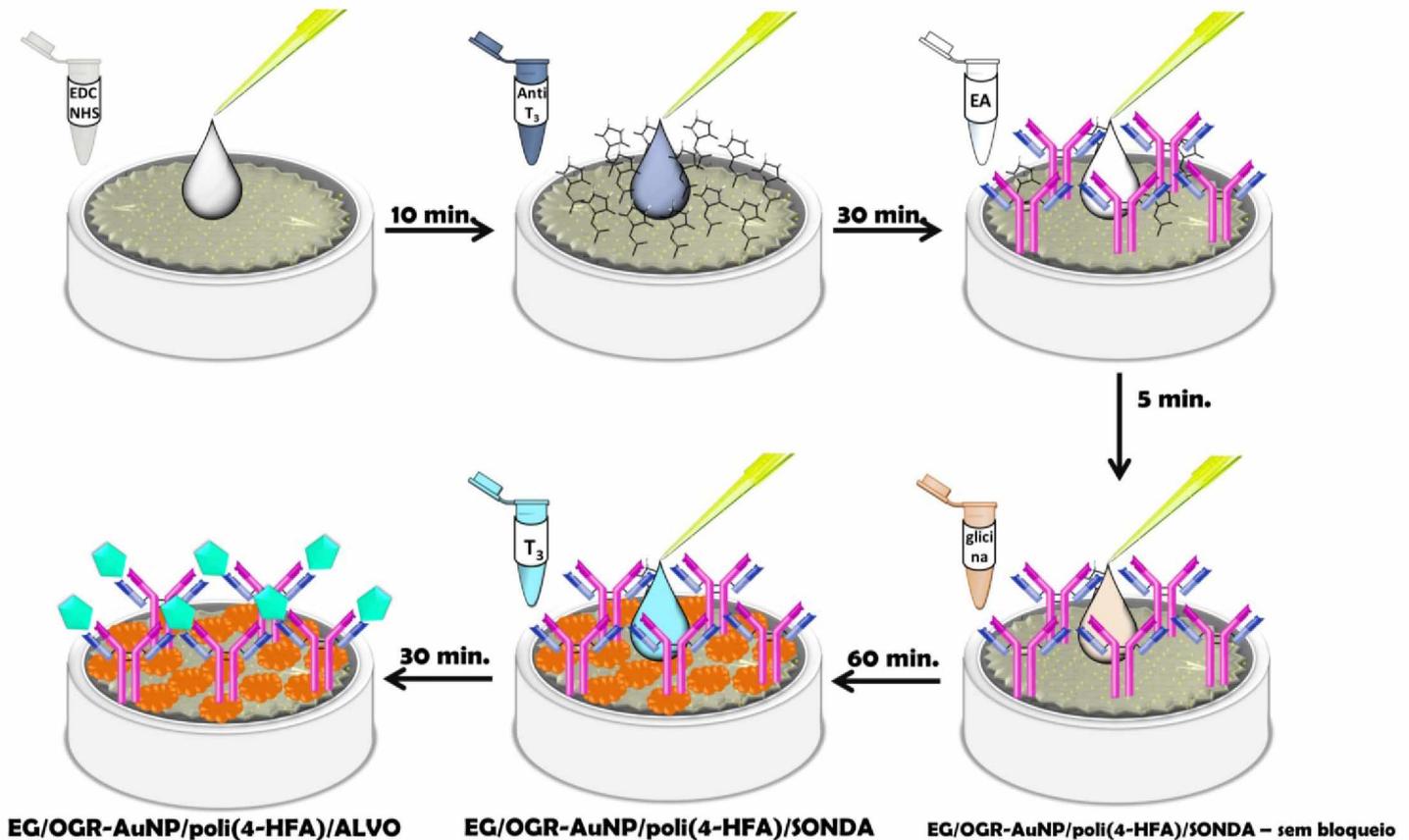
Inicialmente, a superfície de EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) foi ativada com solução equimolar de EDC-NHS, sendo gotejados 10 µL da mesma sobre a superfície dos eletrodos, ficando em contato com a superfície por 10 min. e, posteriormente, os eletrodos foram lavados com água destilada por 15 s, para remoção do excesso de reagente. Em seguida, 10 µL da solução do anticorpo anti-T₃ foram gotejados sobre a superfície ativada dos eletrodos e foram deixados em contato por 30 minutos, seguido de lavagem com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4, por 15 s, para remoção dos anticorpos não ligados. A etapa seguinte consistiu no gotejamento de 10 µL da solução de etanolamina (EA) 0,1 mol L⁻¹. Essa solução ficou em contato com a superfície por 5 minutos e, depois os eletrodos foram lavados em água destilada por 15 segundos.

Posteriormente, foram gotejados 10 µL de uma solução bloqueadora de glicina (50 mmol L⁻¹) sobre os eletrodos contendo a biomolécula do Anti-T₃, ficando em contato por 1 hora, seguido de lavagem com água destilada por 15 s. Esses eletrodos, prontos para detecção do alvo, foram denominados EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/SONDA.

Por fim, 10 µL da solução do alvo T₃ foram gotejados sobre a superfície dos eletrodos modificados contendo a sonda e deixado em contato por 30 minutos, para permitir a interação sonda-alvo e, posteriormente, o mesmo foi lavado em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4, por 15 s, para remoção das biomoléculas de T₃ que não interagiram. Após esse contato a

plataforma passou a ser denominada de EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/ALVO. Um esquema representativo das etapas de preparação do imunossensor é representado na Figura 35.

Figura 35 – Esquema representativo das diversas etapas de preparação do imunossensor para diagnóstico do hormônio tireoidiano T_3 .



FONTE: Autora, 2017.

3.2.10 Avaliação das concentrações e tempo de interação sonda-alvo

Fez-se necessário um estudo simultâneo a respeito da concentração da sonda e concentração do alvo, a fim de verificar quais dessas concentrações apresentariam a maior diferença entre os sinais de resposta eletroquímica obtidos entre sonda e alvo, ou seja, o maior *gap*. Desse modo, três concentrações diferentes de sondas foram utilizadas, sendo 0,1, 1,0 e 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. No sentido de garantir um excesso de alvo para interação com a sonda, foi utilizada para o alvo o dobro das concentrações da sonda, sendo 0,2, 2,0 e 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Para cada concentração de sonda, foram utilizados dois eletrodos diferentes. Um eletrodo era construído até a etapa da molécula de bloqueio, ou seja, constituía o EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/SONDA, enquanto o outro eletrodo também era construído até esta etapa e colocado em contato com o alvo na concentração específica referente a concentração utilizada para sonda. Assim, foram efetuados estudos utilizando eletrodos entre os pares Sonda $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e Alvo $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$; Sonda $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e Alvo $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$; Sonda $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e Alvo $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Este estudo foi realizado em um tempo inferior a 5 dias.

Visto que a etapa de interação sonda-alvo é uma das etapas determinantes para o sucesso do diagnóstico do hormônio T_3 , foi realizado estudo a respeito do tempo de interação entre sonda-alvo, variando os tempos de interação em 20, 30 e 40 minutos. Os demais tempos utilizados para as outras etapas de interação, ou seja, os tempos de ativação, imobilização da sonda, lavagem com etanolamina e interação com bloqueio, foram escolhidos com base no trabalho de Silva¹⁰⁴.

O estudo do sinal eletroquímico dos eletrodos descritos acima foi realizado por medidas de detecção em $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mmol L^{-1} em meio de solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial, com amplitude de 50 mV , na faixa de potencial de $0,0$ a $+0,5 \text{ V}$ e velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} .

3.2.11 Caracterização eletroquímica do imunossensor

A fim de evidenciar e justificar algumas etapas da construção do imunossensor, foram realizados estudos eletroquímicos para monitoramento do valor de I_{Pa} referente ao EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/SONDA ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) no processo oxidativo do Fe^{2+} a Fe^{3+} em solução de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mmol L^{-1} contida na solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial, com amplitude de 50 mV , na faixa de potencial de $0,0$ a $+0,5 \text{ V}$ e velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} .

O primeiro estudo foi para avaliação da presença da sonda biológica sobre a plataforma construída, comparado com EG sem modificação e somente em EG/OGR-AuNP. Assim, foram utilizados os sinais de resposta dos eletrodos sem a sonda como referências para comparação dos sinais após interação com a sonda, chamado então de EG/SONDA,

EG/OGR-AuNP/SONDA e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/SONDA. O procedimento de imobilização da sonda foi o mesmo descrito no item 3.2.9, exceto para os sistemas sem filme polimérico, onde não houve a etapa de ativação com EDC-NHS.

Outros dois estudos com relação ao procedimento de imobilização foram realizados, sendo um com relação à utilização de EDC-NHS 100 mmol L^{-1} e, posterior lavagem com etanolamina $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; e o outro com relação à utilização de glicina 50 mmol L^{-1} como agente bloqueador. Para o primeiro, foram utilizados os sinais eletroquímicos obtidos por detecção de EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/SONDA ativados e não ativados com EDC-NHS e também as respostas de EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) sem contato com a sonda para comparação do sinal eletroquímico. Já para o estudo do bloqueio, fez-se uma comparação dos sinais obtidos com EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/SONDA bloqueados e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/SONDA não bloqueados com glicina. O procedimento de imobilização da sonda foi o mesmo descrito no item 3.2.9 considerando as restrições impostas para cada caso, como as etapas de ativação para o primeiro, e as etapas de bloqueio para o último.

Para complementação do estudo e também um melhor entendimento dos processos e interações que ocorrem na superfície dos eletrodos, foram realizadas medidas de detecção utilizando a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) nos seguintes eletrodos: EG, EG/OGR-AuNP, EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA), EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/SONDA e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/ALVO. Essas medidas foram realizadas em solução de KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), contendo par redox $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5 mmol L^{-1}), variando-se a faixa de frequências de 10.000 a 0,01 Hz, com amplitude de 10 mV.

3.2.12 Caracterização morfológica das etapas de construção da plataforma

Cada etapa de modificação do EG com o nanocompósito OGR-AuNP e filme poli(4-HFA) foi caracterizada morfológicamente por análises de MEV e AFM. Já as etapas de biofuncionalização, ou seja, imobilização de biomoléculas sonda e alvo e adição de molécula bloqueadora foi analisada por AFM. Os equipamentos e os parâmetros utilizados para realização dessa análise foram os mesmos descritos no item 3.2.2.

3.2.13 Definição da faixa de concentração e construção de curva analítica

Tendo definido todos os parâmetros de construção do imunossensor, foram realizados dois estudos: o estabelecimento da faixa de concentração e a construção da curva analítica. Uma vez que a concentração de $T_{3(\text{Livre})}$ presente no sangue é de 2,50 a 3,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$, os estudos de construção da plataforma foram realizados utilizando concentração de T_3 de 2,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo necessário efetuar diluições de T_3 até o sinal analítico atingir o sinal de comparação que, neste caso, é o sinal de resposta da sonda Anti- T_3 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Nesse sentido foram feitas diluições do T_3 2,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH 7,4, como solvente. As concentrações de T_3 utilizadas para o estabelecimento da faixa de concentração foram: 2,00 10^{-7} g mL^{-1} , 2,00 10^{-8} g mL^{-1} , 2,00 10^{-9} g mL^{-1} , 2,00 10^{-10} g mL^{-1} , 2,00 10^{-11} g mL^{-1} , 2,00 10^{-12} g mL^{-1} e 2,00 10^{-13} g mL^{-1} .

Tendo obtido a faixa de concentração, foi construída uma curva analítica variando-se a concentração do alvo T_3 na faixa de concentração presente no sangue, onde as concentrações de T_3 utilizadas foram: 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 3,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Todas as detecções descritas acima foram realizadas com os mesmos parâmetros utilizados anteriormente, via monitoramento do valor de I_p do processo de oxidação do Fe^{2+} proveniente de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5 mmol L^{-1}) em meio de solução de KCl (0,1 mol L^{-1}) utilizando a técnica de VPD com amplitude de 50 mV, na faixa de potencial de 0,0 a +0,5 V e velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} .

3.2.14 Estudo de estabilidade do imunossensor

Com o intuito de verificar a ocorrência de variação no sinal de resposta do imunossensor proposto ao fazer a estocagem para posterior utilização, foi realizado um estudo de estabilidade. Para tanto, várias plataformas EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) foram construídas, segundo mesmos parâmetros já definidos durante o trabalho. Seguindo as etapas de biofuncionalização descritas no item 3.2.8, os EG/OGR-AuPN/poli(4-HFA) foram submetidos a imobilização de biomoléculas até a etapa de imobilização da molécula de bloqueio e, em seguida armazenados.

Os EG/OGR-AuPN/poli(4-HFA)/SONDA foram estocados sob refrigeração abaixo de 0 °C, em atmosfera de nitrogênio. Os testes de estabilidade foram feitos a cada 5 dias, durante um período de 40 dias.

Nos dias definidos para análise, os EG/OGR-AuPN/poli(4-HFA)/SONDA eram retirados da refrigeração e deixados aquecer a temperatura de trabalho (22 °C). Em seguida o alvo T_3 $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ era gotejado sobre o eletrodo e deixado em contato por 30 minutos, seguido de lavagem em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Foram monitoradas as respostas de I_p do processo de oxidação do Fe^{2+} proveniente de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5 mmol L^{-1}) em meio de solução de KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) utilizando a técnica de VPD, com amplitude de 50 mV, na faixa de potencial de 0,0 a +0,5 V e velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} .

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterização dos nanomateriais sintetizados

Imagens dos materiais obtidos por síntese química pelo método de oxidação/esfoliação/redução e suas respectivas dispersões aquosas podem ser visualizadas na Figura 36.

Figura 36 – Foto ilustrativa do óxido de grafite obtido por oxidação química do pó de grafite e dispersão aquosa de OG (a) e óxido de grafite reduzido obtido pela redução química de OG e dispersão aquosa de OGR (b).



As fotos ilustrativas do material sólido evidenciam as diferenças de compactação na fase sólida, bem como diferenças na solubilidade em solventes polares (água). Pode ser observado que a preparação de dispersão de OG 1 mg mL^{-1} foi obtida por ultrasonicação durante 2 horas, enquanto que a dispersão de OGR 1 mg mL^{-1} foi obtida por ultrasonicação durante 8 horas do material. Estas propriedades estão relacionadas com estruturas desses materiais, onde o OG apresenta uma maior quantidade de funções oxigenadas de caráter polar que facilitam a interação intermolecular com as moléculas de água polares, por interações dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio. O OGR, por apresentar uma menor quantidade de grupos oxigenados, não possui muita afinidade pela água.

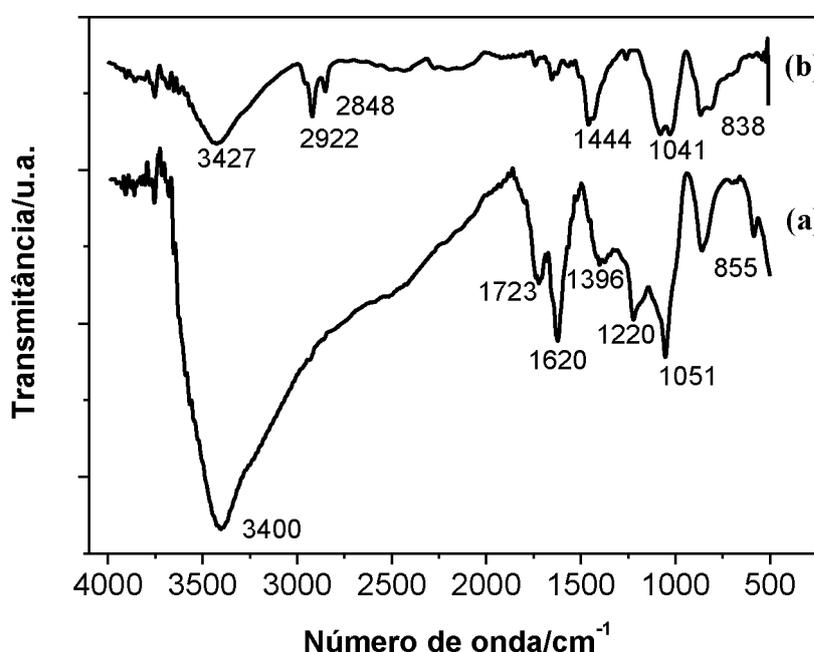
Neste trabalho, o OGR foi incorporado sobre a superfície dos EG por adsorção física. Em muitas etapas da construção do imunossensor foram efetuadas lavagens da superfície dos eletrodos em soluções aquosas. Essa propriedade de baixa solubilidade do OGR em água pode

evitar que o mesmo seja lixiviado durante as etapas de lavagem, evitando a perda do nanomaterial.

4.1.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros de absorção na região do IV obtidos para os materiais de óxido de grafite e óxido de grafite reduzido estão mostrados na Figura 37.

Figura 37 – Espectro de infravermelho para óxido de grafite (a) e óxido de grafite reduzido (b).



No espectro do óxido de grafite, Figura 37(a), é possível observar a presença de uma banda larga bem acentuada em 3400 cm^{-1} característica de grupos hidroxilas ($-\text{OH}$) de álcoois e também de hidroxilas de ácidos carboxílicos, devido à banda ser muito larga. O pico em 1723 cm^{-1} refere a estiramentos dos grupos $\text{C}=\text{O}$, e em 1620 cm^{-1} referente a estiramentos de grupos não oxidados com conjugação ($\text{C}=\text{C}$). Os três picos entre 1000 e 1400 cm^{-1} são atribuídos a estiramentos da ligação $\text{C}-\text{O}$ de grupos éteres próximos a conjugações, além do pico em 855 cm^{-1} também estar relacionado a sistemas conjugados^{105,106}.

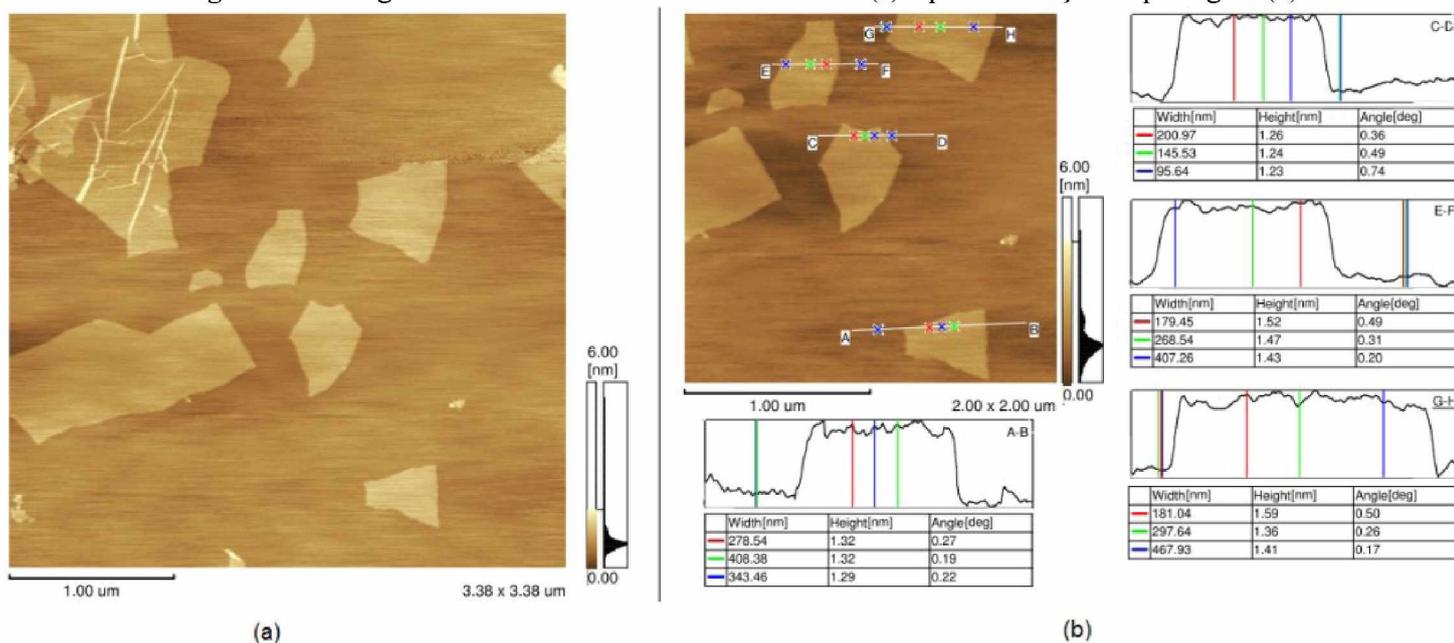
Pelo espectro obtido do óxido de grafite reduzido, Figura 37(b), percebe-se que há uma diminuição significativa na intensidade de quase todos os picos presentes no espectro do óxido de grafite. Como é evidente, o pico a cerca de 3400 cm^{-1} não é tão largo como

observado anteriormente, que pode ser entendido como uma diminuição considerável dos grupos -OH ¹⁰⁷. Também é evidente no espectro de óxido de grafite reduzido a ausência dos picos referentes ao estiramento de ligações C–O de éteres, assim como a presença de picos em torno de 2900 cm^{-1} , relacionados com estiramentos de ligações C–H. Esses resultados estão dentro do esperado, sendo possível a confirmação da introdução de grupos oxigenados na estrutura após o processo oxidativo, especificamente grupos funcionais de hidroxilas, grupos carbonila, como carboxilas, éteres e cetonas. Já a redução da intensidade leva a confirmação da redução desses grupos funcionais, mas preservando algumas espécies ainda oxigenadas que é um ponto positivo na construção de biossensores, devido à possibilidade de interação dos mesmos com grupos funcionais de outras moléculas e solubilização em solvente aquoso.

4.1.2 Microscopia de força atômica

A Figura 38 mostra imagens da superfície das folhas de OG obtidas por medidas de AFM, onde pode ser observado que as mesmas se separam pelo processo esfoliativo de ultrassonicação, permitindo a visualização de dobramentos das folhas entre si, além da possível quebra de folhas maiores em menores fragmentos, Figura 38(a). O contraste uniforme das imagens das folhas de OG implica em dizer que todas elas possuem espessura semelhante¹⁰⁸.

Figura 38 – Imagens de AFM de OG em duas dimensões (a) e perfil de seção de passagem (b).

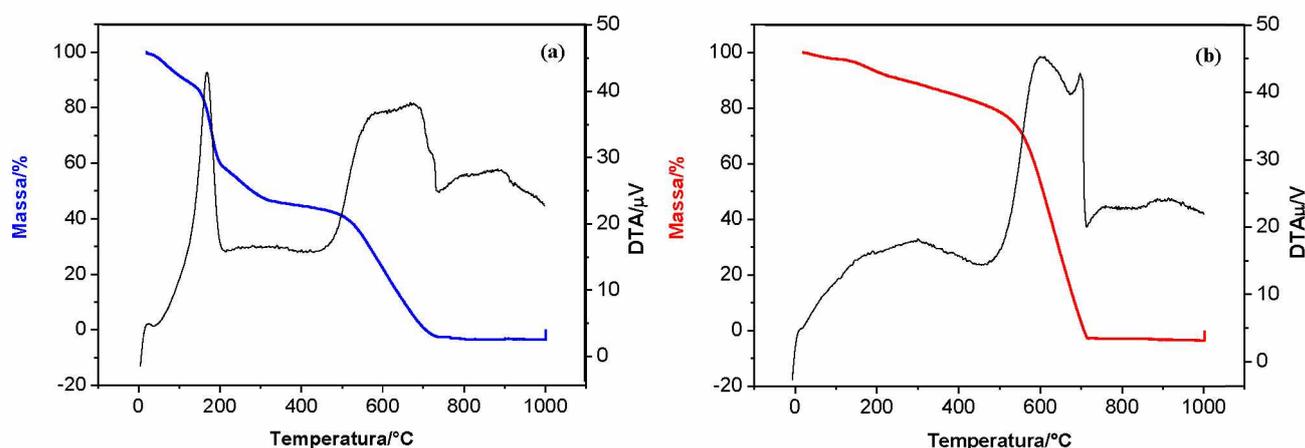


A obtenção de informações sobre a espessura, largura e o grau de deflexão entre dois pontos fixados nas imagens é permitida a partir do perfil de seção de passagem do *software* SMP Offline - HeightTrace do AFM, Figura 38(b). A obtenção desses valores permitiu o cálculo do valor médio das alturas das folhas de OG, sendo elas de $1,37 \pm 0,11$ nm. Este valor está condizente com a literatura, a qual afirma ser a espessura das folhas de OG em torno de 1 à 1,3 nm^{109,110}, sendo mais espessas devido a presença dos grupos oxigenados ligados covalentemente à superfície, assim como ao deslocamento dos átomos de carbono hibridizados sp^3 abaixo e acima do plano original das folhas de grafeno, bem como o grau de hidratação, por ser o OG um material bem higroscópico⁴⁸.

4.1.3 Análises termogravimétricas

O termograma de óxido de grafite obtido por análise de TGA/DTA, Figura 39(a), apresenta duas etapas de degradação, uma iniciando próximo a 150 °C e outra em 520 °C. A perda de massa inferior a 15% ocorrida antes dos 100 °C está relacionada à perda de água do material, com evaporação de água, devido o mesmo ser bastante higroscópico¹¹¹. Em 150 °C observa-se a intensificação da decomposição do óxido de grafite, com a vaporização dos grupos funcionais de superfície, como indica o pico de um evento exotérmico na curva de DTA, produzindo CO e CO₂⁴⁸. O material se mantém relativamente estável até a temperatura de 500 °C, onde novamente observa-se uma queda na porcentagem de massa, acompanhada de um segundo pico exotérmico na curva de DTA, até atingir a degradação total do material, em 735 °C.

Figura 39 – Curva TGA/DTA do óxido de grafite (a) e óxido de grafite reduzido (b) em atmosfera de nitrogênio, com razão de aquecimento de $10^\circ \text{C min}^{-1}$.



O termograma obtido para o óxido de grafite reduzido, Figura 39(b), sofre uma ligeira perda de 20% de massa até a temperatura de 500 °C, acompanhada por um pico não muito bem definido na curva de DTA, relacionado à degradação das espécies oxigenadas não reduzidas no processo de síntese, cuja intensidade do declive pode estar diretamente relacionada com a diferença na quantidade desses grupos funcionais. Nessa mesma temperatura é observado o início da degradação total do material, evidente pelo pico exotérmico da curva de DTA.

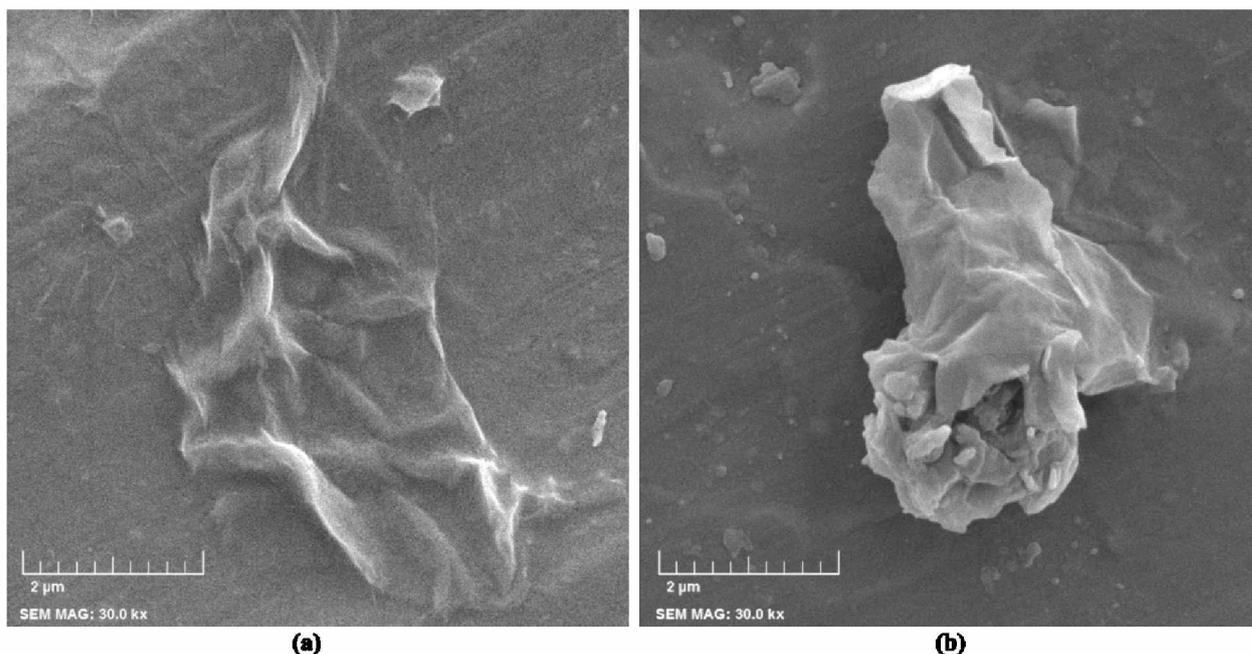
Ao observar o valor de temperatura que inicia a degradação do óxido de grafite reduzido e também o valor de temperatura que inicia a segunda etapa de degradação do óxido de grafite, nota-se que ambos estão em torno de 550 °C, sugerindo ser a estrutura do óxido de grafite bem semelhante a do óxido de grafite reduzido após a primeira etapa de degradação. Este fato revela uma possível redução térmica do óxido de grafite nessas condições. Esses resultados indicam a maior estabilidade térmica do óxido de grafite reduzido frente ao óxido de grafite, devido a este último apresentar os grupos funcionais oxigenados que enfraquecem as forças de Van der Waals entre as camadas dos planos basais hexagonais de carbono no interior das multicamadas empilhadas, causando a aceleração do processo de perda de massa em função da temperatura¹¹².

Ambos os gráficos da Figura 39 apresentaram perda de massa que ultrapassa o 0%. Este fato pode ser explicado como alguma instabilidade na balança do analisador térmico, devido algum tipo de vibração, ou até mesmo algum tipo de material incrustado no cadinho utilizado para fazer a análise, uma vez que os mesmos são reutilizáveis.

4.1.4 Microscopia eletrônica de varredura

Imagens de MEV do OG, Figura 40(a), revelam uma morfologia semelhante a folhas amassadas e enrugadas, corroborando com o resultado obtido por AFM para esse material, causado pela separação maior entre as folhas. Já as imagens de OGR, Figura 40 (b), apresentam morfologia de folhas mais agrupadas, que pode ser devido a uma melhor interação entre as folhas pela diminuição dos grupos oxigenados volumosos.

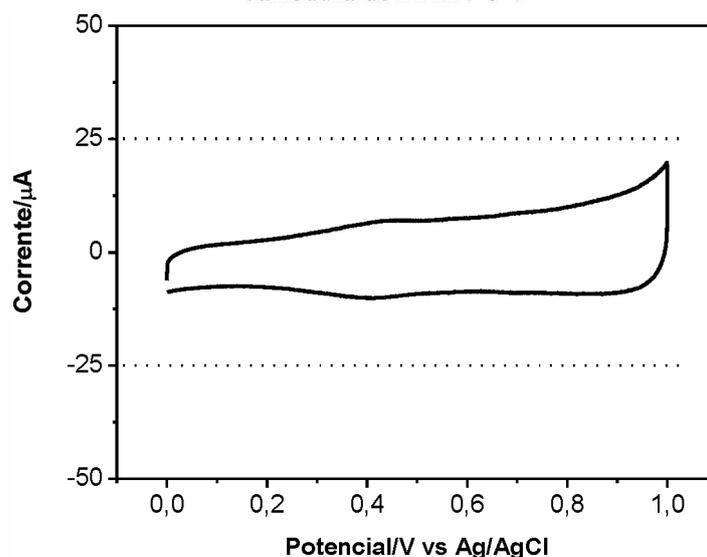
Figura 40 – Imagens de MEV para OG (a) e OGR (b) com ampliações de 30.000 vezes.



4.2 Seleção dos eletrodos de grafite

A Figura 41 mostra o comportamento eletroquímico típico dos eletrodos de grafite submetidos à voltametria cíclica em solução do eletrólito suporte HClO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$).

Figura 41 – Voltamogramas cíclicos dos EG em solução de HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .



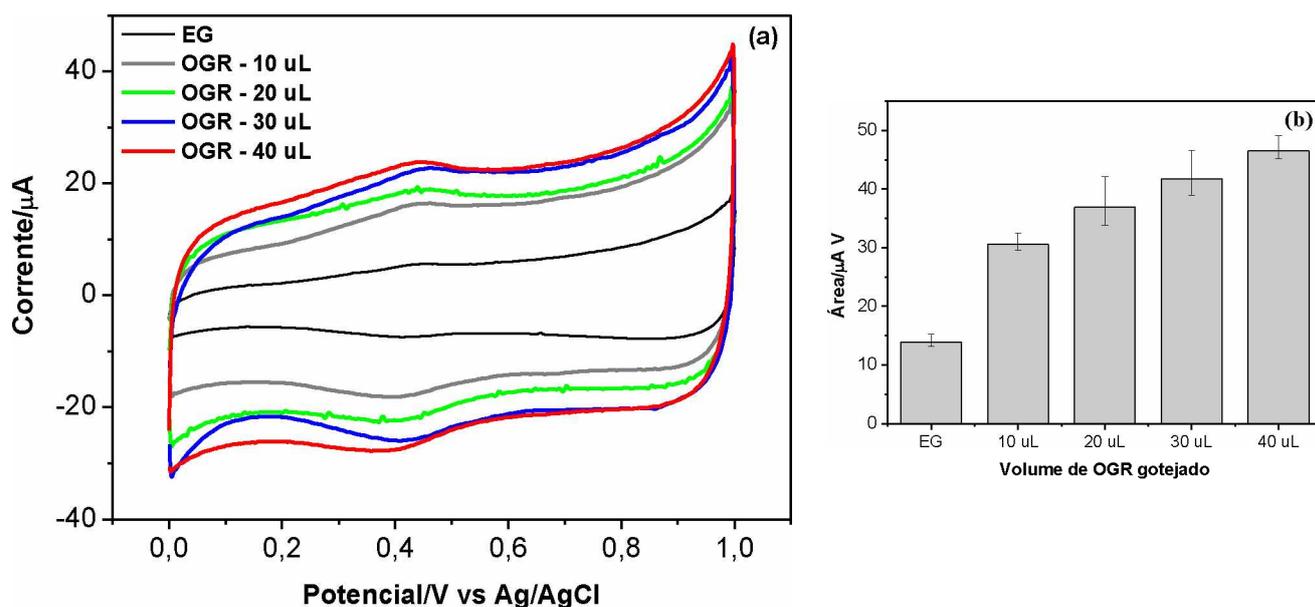
Este procedimento tem como finalidade a remoção de impurezas que possam estar adsorvidas nas superfícies dos eletrodos e que sejam eletroativas na faixa de potencial

trabalhada, bem como a avaliação do perfil eletroquímico dos mesmos. É observado pela Figura 41 que os valores de corrente são inferiores a $25 \mu\text{A}$. Dessa forma, todos os EG que apresentavam esse perfil eletroquímico foram escolhidos para utilização no trabalho, sendo este o critério de escolha nos estudos dos nanomateriais.

4.3 Incorporação de OGR sobre a superfície de EG

Os últimos ciclos obtidos por VC em HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ após o gotejamento de 10, 20, 30 e $40 \mu\text{L}$ de OGR 1 mg mL^{-1} sobre a superfície de EG são mostrados na Figura 42.

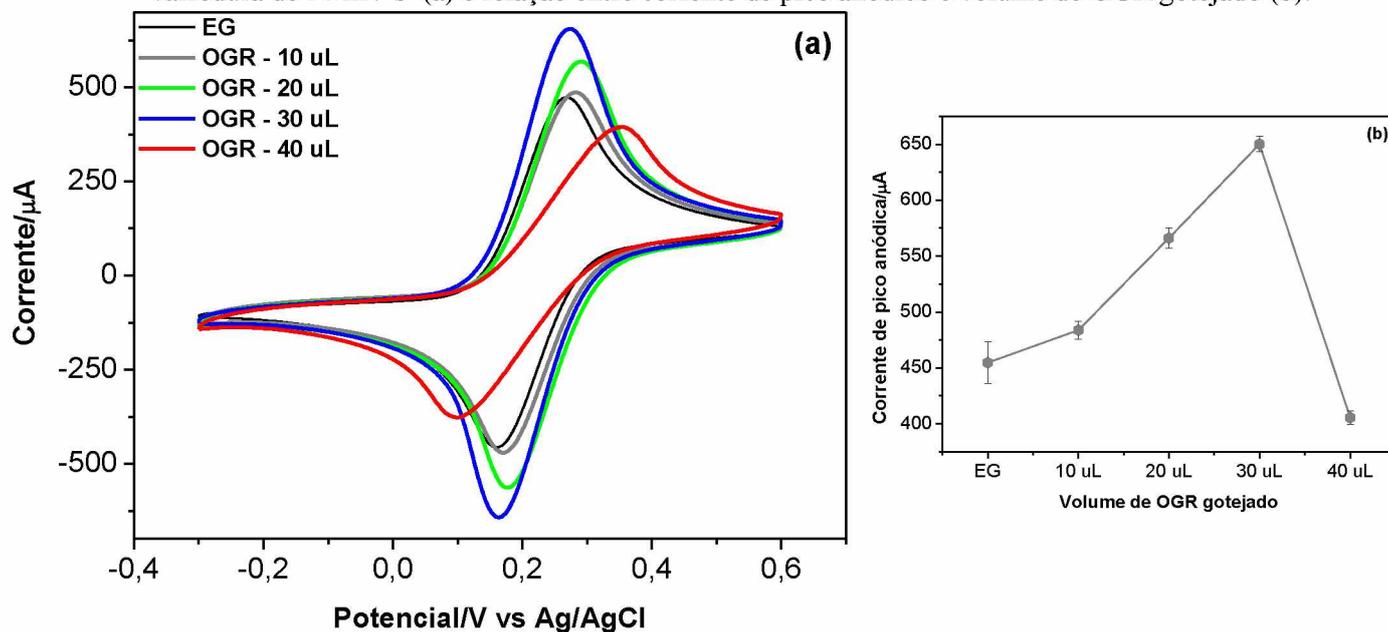
Figura 42 – Voltamograma cíclicos dos EG contendo diferentes volumes de OGR 1 mg mL^{-1} em solução de HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} (a) e relação entre resposta e volume de OGR gotejado (b).



Pode ser observado que não houve alteração do perfil voltamétrico dos EG modificado com OGR, ocorrendo apenas um aumento de resposta de corrente capacitiva quanto maior o volume utilizado. Este efeito está relacionado com as propriedades características do material como elevada área superficial e alta condutividade elétrica.

A Figura 43 mostra os voltamogramas obtidos por VC em $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, que se caracteriza como uma sonda aniônica. Pode ser observado que, utilizando $10 \mu\text{L}$ de OGR, não há mudança significativa do perfil eletroquímico quando comparado ao EG.

Figura 43 – Voltamogramas cíclicos dos EG contendo diferentes volumes de OGR 1 mg mL^{-1} em solução de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} (a) e relação entre corrente de pico anódico e volume de OGR gotejado (b).



Os volumes de 20 e 30 μL promovem um aumento das I_p , significando maior facilidade na transferência eletrônica do par redox, acompanhado de um ligeiro distanciamento dos E_p . Já o volume de 40 μL de OGR causou um aumento na resistência à transferência de carga, evidenciada pelo alargamento do pico e, conseqüentemente, pelo aumento de ΔE_p , assim como uma diminuição nas intensidades de I_p .

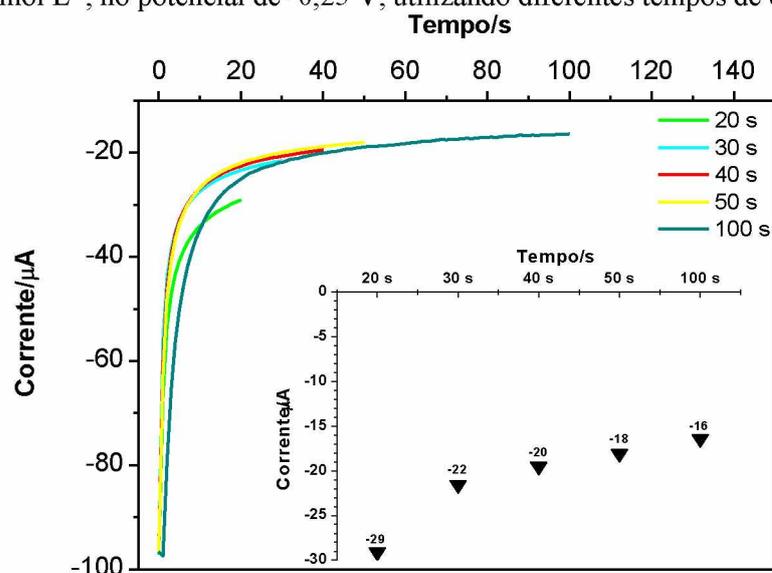
O OGR ainda contém uma quantidade significativa de grupos oxigenados que não foram reduzidos, cujos grupos apresentam uma alta densidade eletrônica, devido à presença do elemento oxigênio altamente eletronegativo, causando uma repulsão eletrônica com a sonda aniônica do par redox analisado. Esse efeito foi observado somente para o volume de 40 μL , pois a quantidade de material depositado é maior e, apesar dele propiciar um aumento maior na resposta de corrente em HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, o volume de 30 μL de OGR 1 mg mL^{-1} mostrou o melhor resultado frente ao estudo de transferência eletrônica, sendo fixado este valor para utilização no trabalho.

4.4 Eletrodeposição de AuNP sobre a superfície de EG/OGR

As respostas de corrente obtidas ao aplicar um potencial de $-0,25 \text{ V}$ nos tempos de 20, 30, 40, 50, e 100 s em solução de HAuCl_4 $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ são

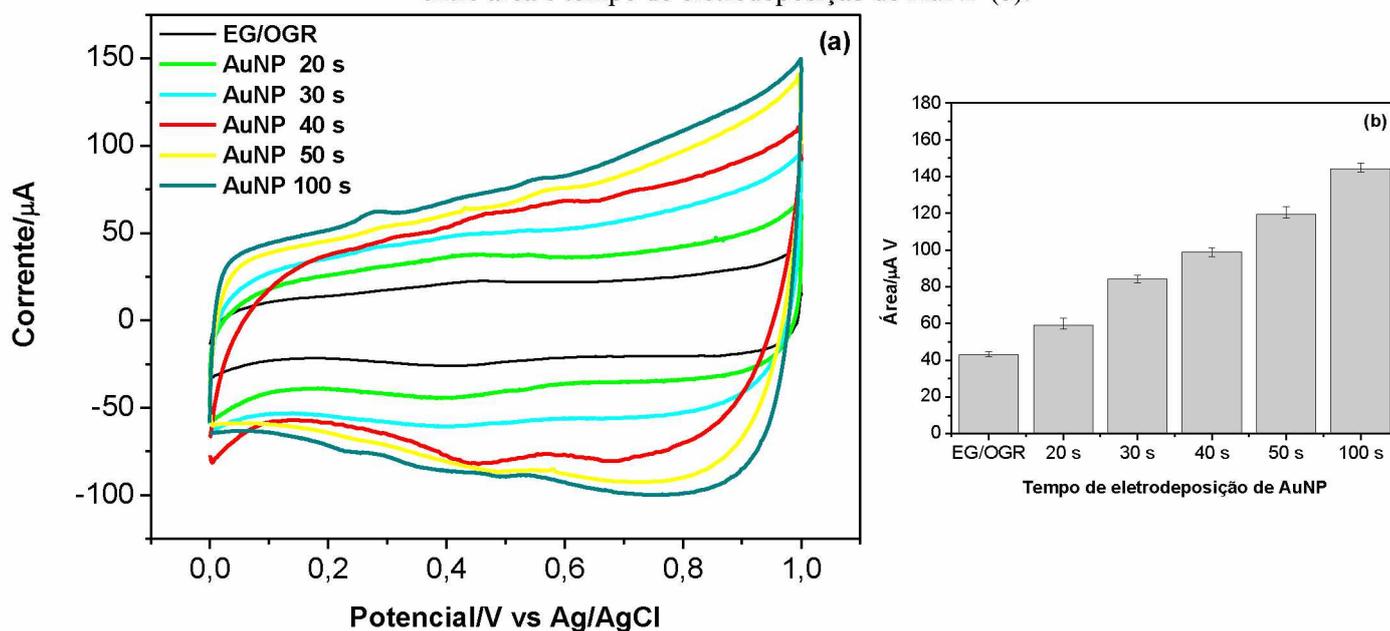
mostradas na Figura 44, indicando que nos tempos superiores a 20 s os valores de corrente apresentam aproximadamente a mesma intensidade de corrente, ou seja, tendem cada vez mais a valores mais constantes, a medida que se aumenta o tempo de eletrodeposição, sugerindo que a redução eletroquímica das AuNP sobre a superfície dos eletrodos contendo OGR acontece de forma rápida e, conforme aumenta-se o tempo, as partículas tendem a ter seus diâmetros aumentados.

Figura 44 – Respostas cronoamperométricas de EG/OGR em solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo HAuCl_4 $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$, no potencial de $-0,25 \text{ V}$, utilizando diferentes tempos de eletrodeposição.



Os voltamogramas cíclicos dos EG/OGR-AuNP em HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ estão mostrados na Figura 45 para os diferentes tempos de eletrodeposição.

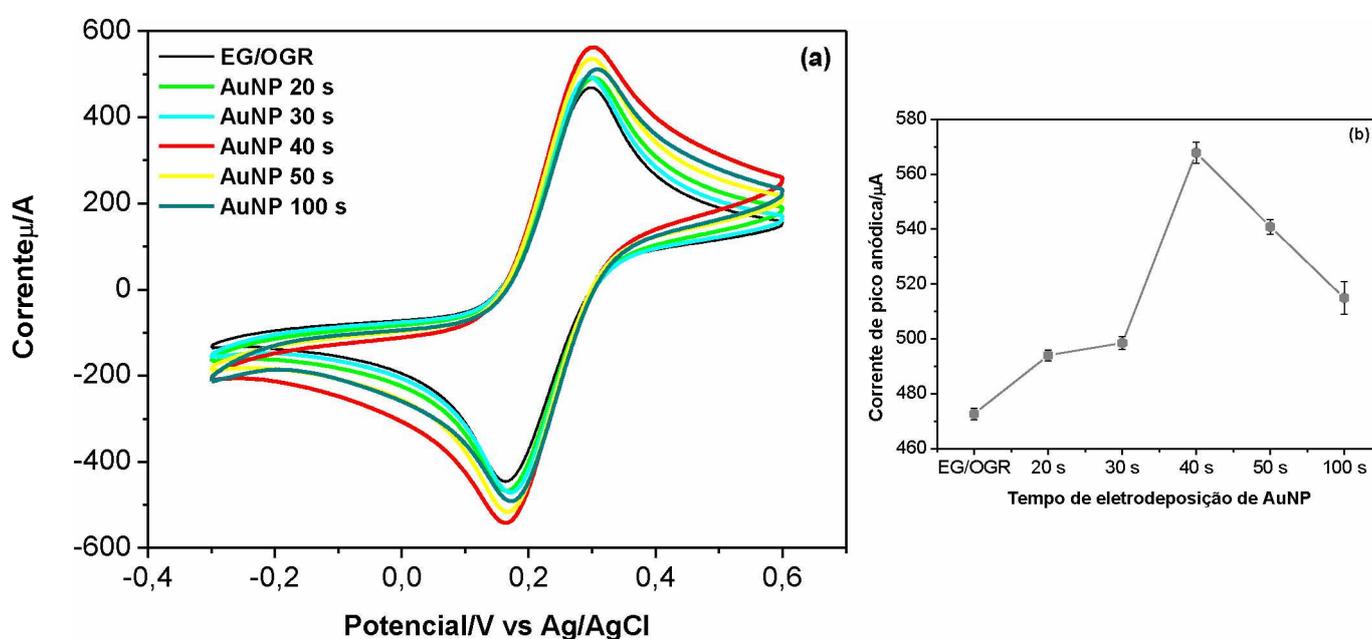
Figura 45 – Voltamogramas cíclicos dos EG/OGR modificados com AuNP em diferentes tempos de eletrodeposição, em solução de HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} (a) e relação entre área e tempo de eletrodeposição de AuNP (b).



Assim como observado em EG/OGR, as respostas de corrente tendem a aumentar com o tempo de eletrodeposição, não causando alterações no perfil eletroquímico de EG/OGR. Este fato está de acordo com as propriedades características das AuNP, como elevada área superficial e alta condutividade elétrica¹¹³.

Os voltamogramas obtidos para os EG/OGR modificados com as AuNP por VC em $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, estão mostrados na Figura 46.

Figura 46 – Voltamogramas cíclicos dos EG/OGR modificados com AuNP em diferentes tempos de eletrodeposição, em solução de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} (a) e relação entre corrente de pico anódica e tempo de eletrodeposição de AuNP (b).



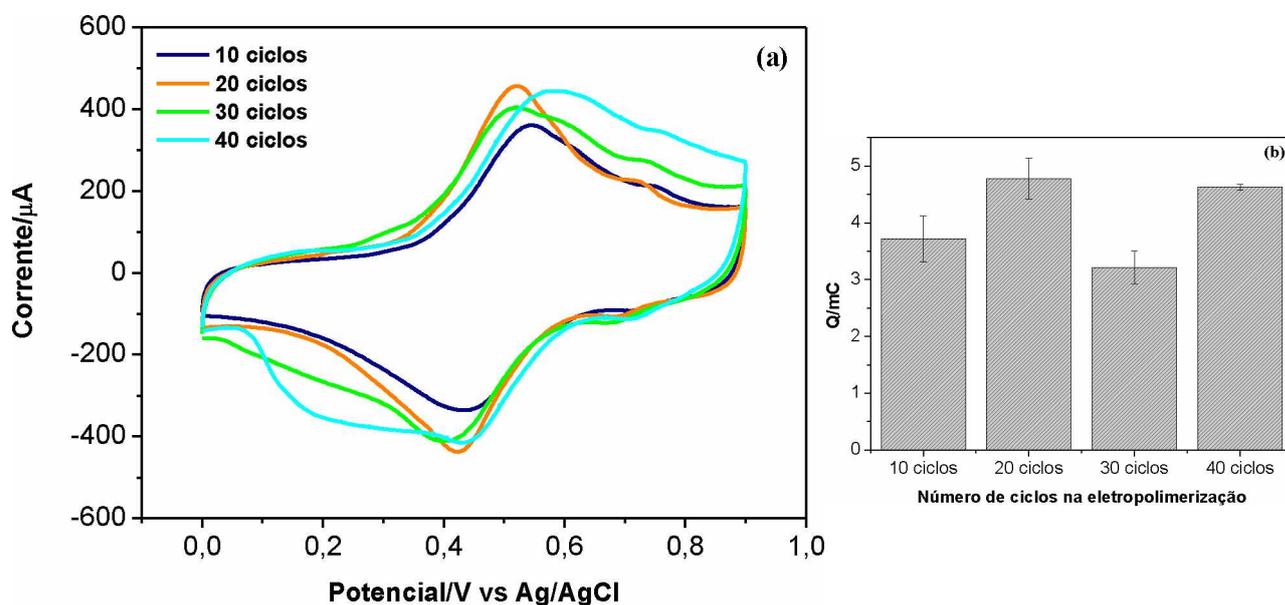
Percebe-se que há um aumento na intensidade da I_p quando comparada com EG/OGR, que é observado para todos os tempos de eletrodeposição. Já ao comparar somente os EG/OGR-AuNP em diferentes tempos, percebe-se que ocorre um aumento até o tempo de 40 s, seguido de decréscimo nos valores de corrente nos tempos superiores. Conforme já descrito na literatura⁵⁸, tem-se que, com intervalos de tempos de eletrodeposição mais altos, o crescimento do diâmetro das AuNP é favorecido ao invés do crescimento de nucleação, assim, nos tempos superiores ao de 40 s, as nanopartículas tendem a ter seus diâmetros aumentados. Como esse tipo de análise envolve a transferência eletrônica de espécies em solução, um aumento no diâmetro das partículas dificulta a chegada dessas espécies no EG e, por isso, é observada a diminuição da corrente, apesar das mesmas serem constituídas de um material

elétrico altamente condutor. Dessa maneira, o tempo de 40 s de eletrodeposição foi definido para ser usado no trabalho.

4.5 Faixa de potencial e número de ciclos da eletropolimerização do filme do ácido 4-hidroxifenilacético sobre EG/OGR-AuNP

Ao variar a quantidade em 10, 20, 30 e 40 ciclos, durante a eletropolimerização de poli(4-HFA) e, posteriormente, submeter a VC em HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foram obtidos os voltamogramas mostrados na Figura 47(a) e, a partir deles, foram calculados os valores de carga referentes aos valores de I_{Pa} , dispostos na Figura 47(b), conforme mostrado no item 2.2.8.

Figura 47 – Voltamogramas obtidos em HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , dos EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) em diferentes números de ciclos durante a eletropolimerização (a) e quantidade de carga relacionada com o número de ciclos (b).



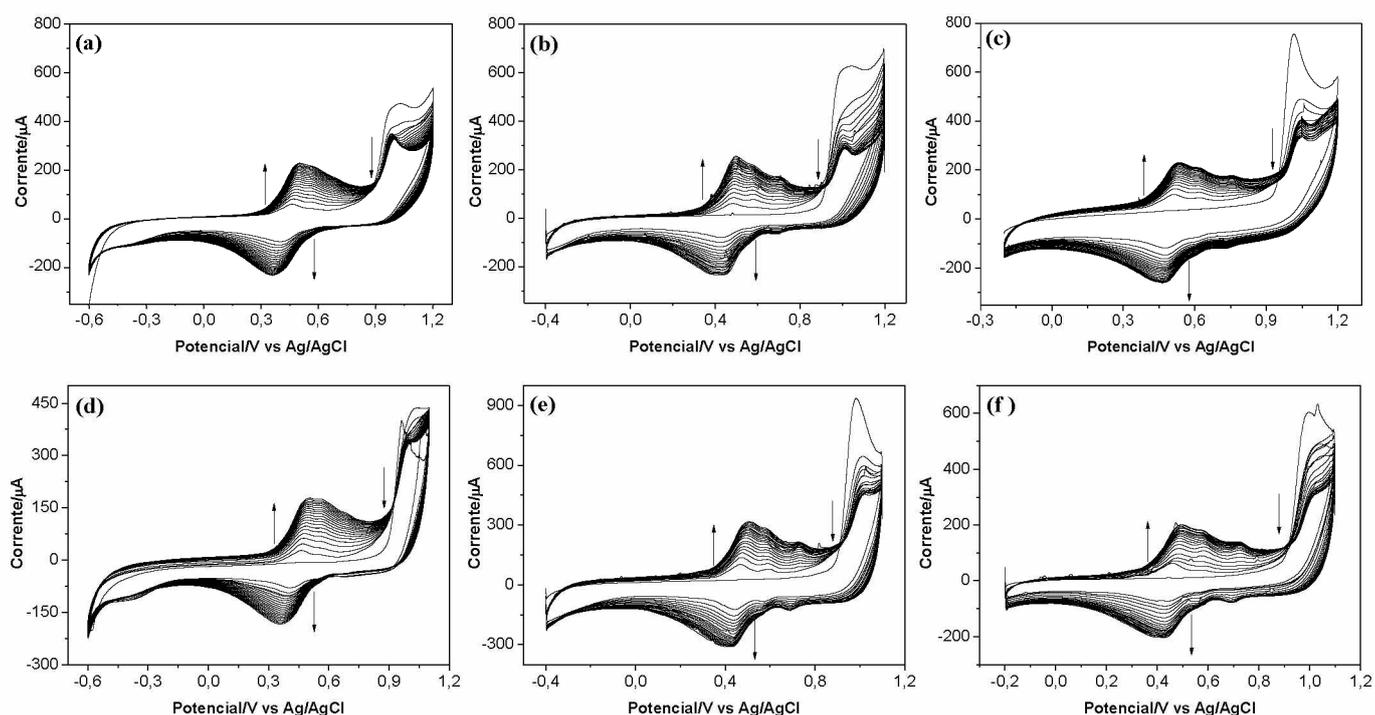
A melhor resposta de corrente do EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) foi obtida quando foram utilizados 20 ciclos para eletropolimerização do filme, evidenciada pelo maior valor de carga do pico anódico, que é diretamente proporcional a área superficial. Ao observar os voltamogramas obtidos quando foi utilizado um número de ciclos superior a 20, percebe-se que eles distorcem o perfil eletroquímico do filme. Quanto maior o número de ciclos, maior a quantidade de material eletropolimerizado e, conseqüentemente, de espécies oxidadas na superfície do eletrodo, como monômeros, dímeros, trímeros e etc. Estas espécies em grande

quantidade possivelmente são as responsáveis pela distorção dos picos característicos do filme poli(4-HFA).

A eletropolimerização com 20 ciclos foi escolhida para utilização no trabalho por levar a formação do filme com melhor interação, evitando o acúmulo de espécies eletroativas na superfície, além de apresentar o menor alargamento dos picos, indicando que essa quantidade de material formado não gera uma resistência alta no eletrodo.

Os resultados mostrados na Figura 48, referentes aos processos de eletropolimerização do filme poli(4-HFA) sobre EG/OGR-AuNP, permitem observar que não há variação ou distorção do perfil eletroquímico quando os filmes são eletropolimerizados em diferentes faixas de potencial.

Figura 48 – Voltametrias cíclicas consecutivas dos EG/OGR-AuNP modificados com poli(4-HFA) $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$, em HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, após 20 ciclos a 50 mV s^{-1} nas janelas de potenciais de -0,6 a +1,2 V (a); -0,4 a +1,2 V (b); -0,2 a +1,2 V (c); -0,6 a +1,1 V (d); -0,4 a +1,1 V (e); -0,2 a +1,1 V (f).

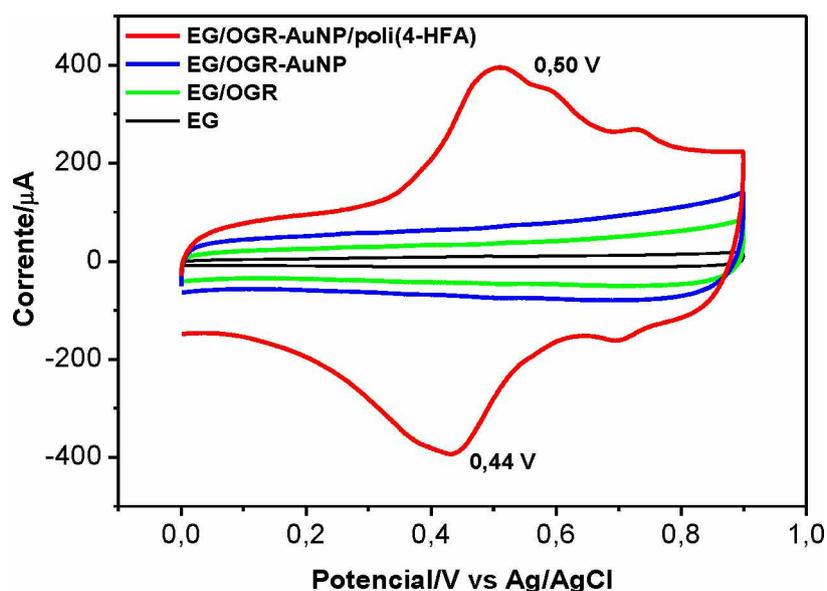


É possível observar que os E_{pa} e E_{pc} permanecem na mesma região de potencial, não havendo alargamento ou estreitamento do pico, ou até mesmo aumento de ΔE_p com relação a diferentes faixas de potencial. Agora, analisando-se os $E_{m\acute{a}x}$, percebe-se que a oxidação do monômero termina próximo ao E_a de +1,08 V e, ao continuar a varredura do potencial, pode ser observado que a corrente volta a aumentar, indicando descarga de corrente.

Analisando-se os E_{\min} , a curva da varredura catódica, referente ao processo redutivo do polímero, termina próximo ao E_c de 0,0 V e, como observado anteriormente, ao continuar a varredura do potencial para valores mais catódicos, pode ser observado que a corrente volta a aumentar próximo ao potencial de -0,2 V, indicando também uma descarga de corrente. Com base nesses resultados, foi escolhido trabalhar numa faixa de potencial de -0,4 a +1,1 V, de modo a prevenir esses processos na superfície do eletrodo que possam interferir nas qualidades dos filmes poliméricos formados.

Os voltamogramas cíclicos em HClO_4 0,5 mol L^{-1} dos EG, EG/OGR, EG/OGR-AuNP e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) são mostrados na Figura 49, evidenciando cada etapa de modificação da plataforma, conforme os parâmetros já discutidos anteriormente.

Figura 49 – Últimos ciclos obtidos por VC em HClO_4 0,5 mol L^{-1} , velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} nos EG, EG/ OGR, EG/OGR-AuNP, e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA).



A curva referente ao EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) (Figura 49), serviu como padrão eletroquímico, utilizando o par redox mais pronunciado para avaliação. As próximas etapas usaram essa análise para a escolha dos eletrodos, sendo que aqueles que apresentaram distorção do perfil ou a presença de outros picos foram descartados.

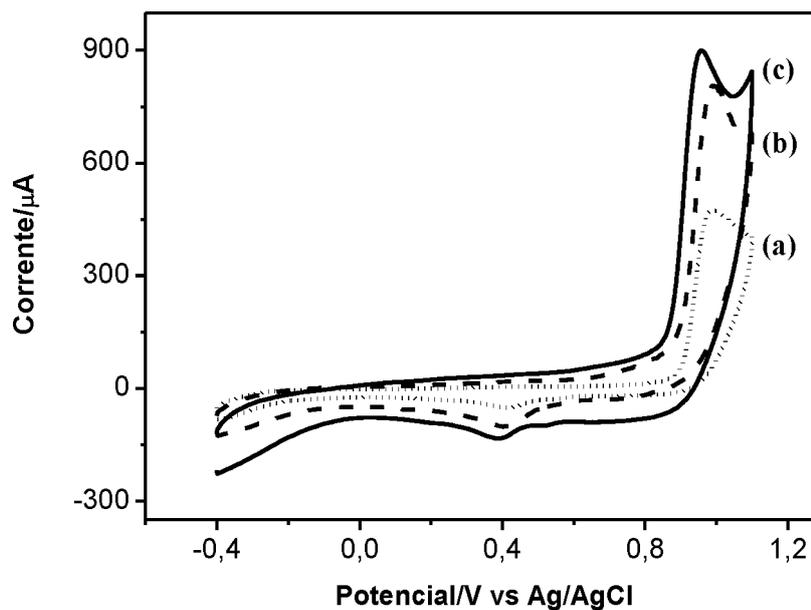
4.6 Plataforma EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)

Definido o número de ciclos e a faixa de potencial a serem realizadas durante a eletropolimerização do filme poli(4-HFA), foi realizado um estudo de comparação da

polimerização do mesmo sobre EG, EG/OGR e EG/OGR-AuNP visando conhecer se o nanocompósito OGR-AuNP estaria realmente afetando o processo de eletropolimerização.

Os primeiros ciclos dos processos de eletropolimerização de poli(4-HFA) nas superfícies de EG, EG/OGR e EG/OGR-AuNP estão mostrados na Figura 50.

Figura 50 – Primeiros ciclos obtidos por VC na eletropolimerização de poli(4-HFA) $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ nas superfícies de EG (a), EG/OGR (b) e EG/OGR-AuNP (c).

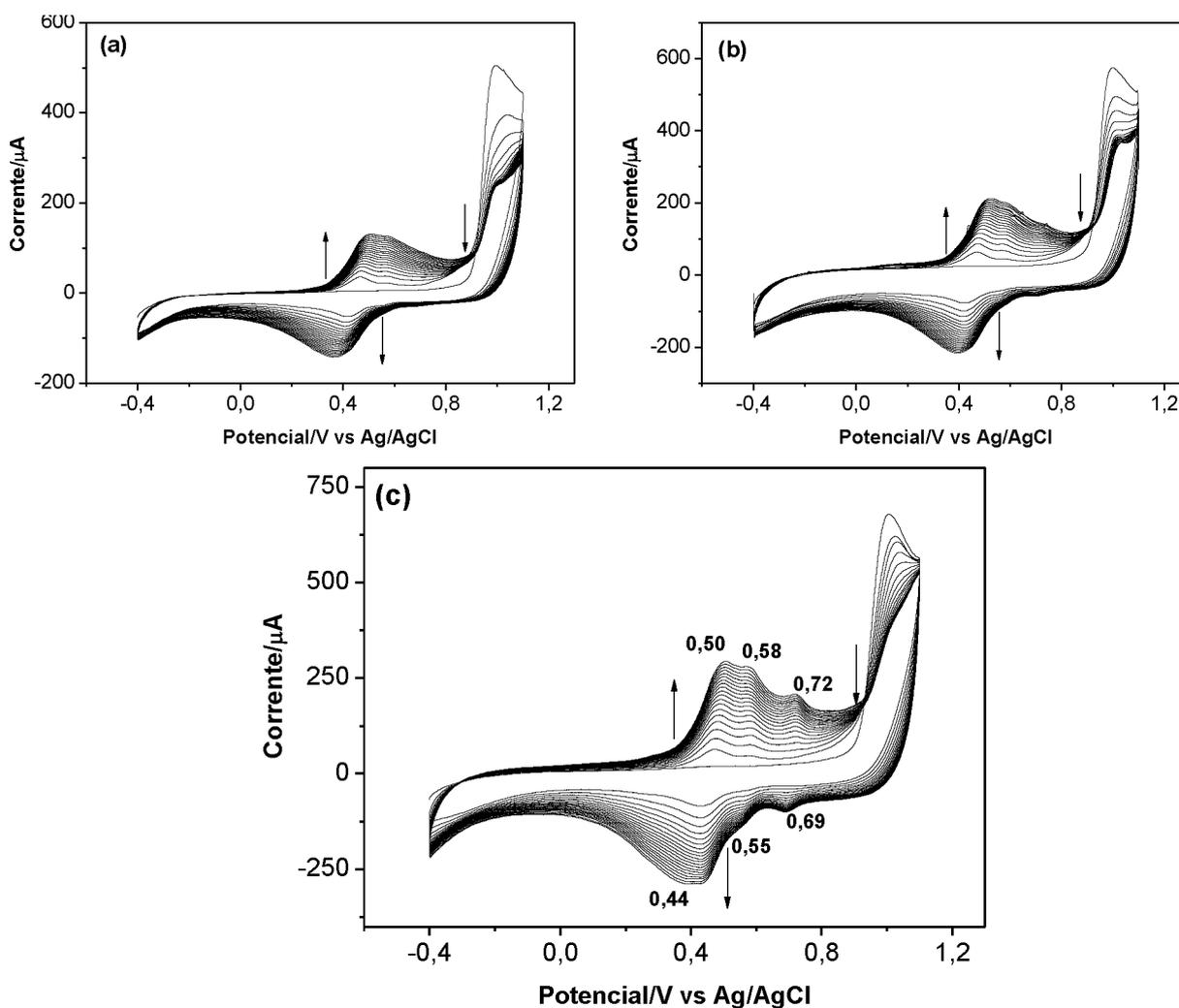


Pode-se observar que a corrente referente à oxidação do monômero começa a surgir em $+0,85 \text{ V}$ para EG, Figura 50(a), e próximo à $+0,65 \text{ V}$ para EG/OGR, Figura 50(b), e EG/OGR-AuNP, Figura 50(c). Sabe-se que este início da corrente está relacionado com o início do processo de oxidação das espécies eletroativas na superfície do eletrodo, indicando, assim, que a presença do nanomaterial OGR sobre a superfície de EG, comum para os dois últimos eletrodos, pode facilitar a chegada dessas espécies na interface eletrodo-solução, possivelmente devido a sua característica de elevada área superficial, permitindo que mais espécies cheguem ao eletrodo.

Comparando-se os valores de E_p pode ser observado que não há diferença significativa entre EG e EG/OGR, Figura 50 (a e b), porém, em EG/OGR-AuNP, Figura 50(c) percebe um deslocamento mais significativo para valores mais catódicos de E_{pa} e, conseqüentemente, de $E_{1/2}$. Como $E_{1/2}$ é o ponto em que acentua o processo de oxidação dos monômeros, fica evidente que a presença das AuNP possivelmente estão promovendo uma melhora na transferência eletrônica e, conseqüentemente, uma maior facilidade na formação do cátion radical, que dá início ao processo de eletropolimerização.

A Figura 51 apresenta todos os ciclos de potenciais durante o processo de eletropolimerização para o eletrodo de grafite e os eletrodos modificados com OGR e OGR-AuNP.

Figura 51 – Eletropolimerização de poli(4-HFA) por VC em ácido 4-HFA $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, na faixa de potencial de $-0,4$ a $+1,1 \text{ V}$, 20 ciclos, velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} nas superfícies de EG (a), EG/OGR (b) e EG/OGR-AuNP (c).

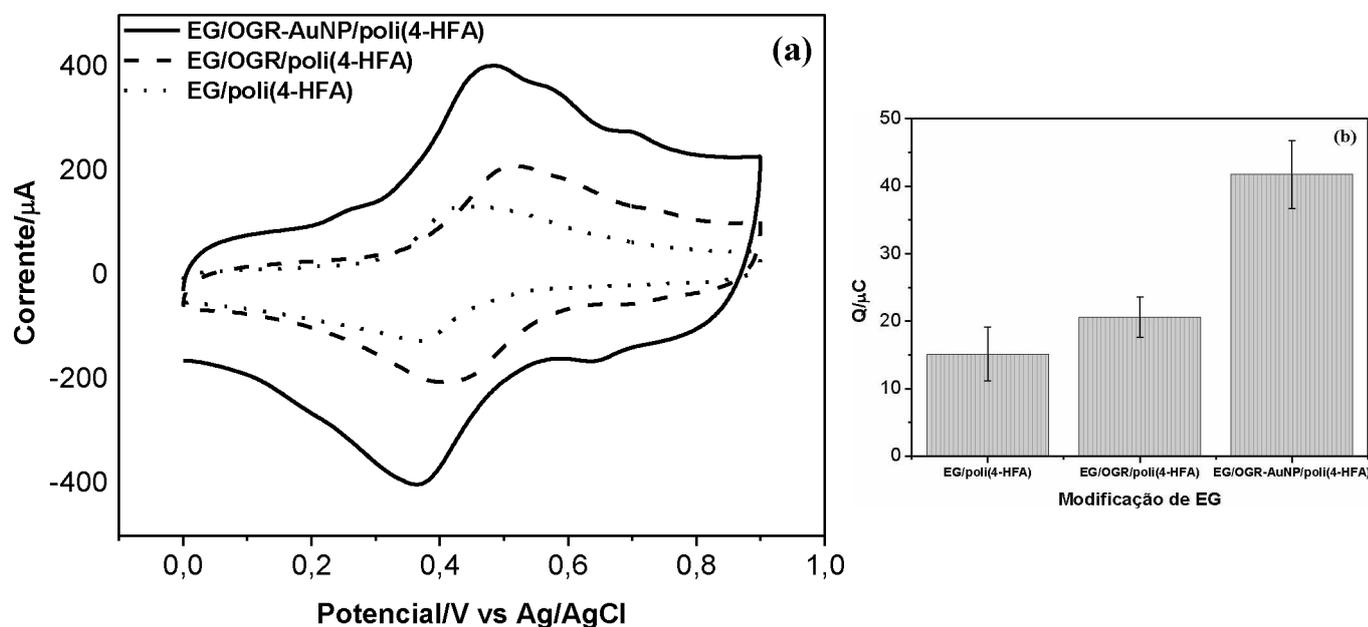


Analisando a Figura 51, observa-se que ambos EG, EG/OGR e EG/OGR-AuNP apresentam o mesmo comportamento eletroquímico frente à eletropolimerização do poli(4-HFA), mostrando os pares redox característicos do mesmo. Porém, nota-se que o par redox pouco pronunciado e obtido por deconvolução no trabalho de Rodrigues⁷⁰, agora é facilmente visualizado na presença do nanocompósito OGR-AuNP, além do que o mesmo permite a visualização de um terceiro par redox, que foi observado durante todo o trabalho de eletropolimerização do filme em questão. Como pode ser claramente visto na Figura 51(c), os

potenciais catódicos e anódicos referentes aos três pares redox do filme poli(4-HFA) sobre o EG/OGR-AuNP são +0,50 e +0,44 V, +0,58 e +0,55 V, +0,72 e +0,69, respectivamente.

Este fato está em concordância com a ideia de facilitação de formação das espécies radicais durante o processo, indicando que o nanocompósito OGR-AuNP favorece o processo de eletropolimerização do filme poli(4-HFA), além de propiciar um aumento da área superficial a cada etapa de modificação, como mostra os aumentos nas intensidades de corrente da Figura 52(a), significando a formação de uma maior quantidade de filme polimérico.

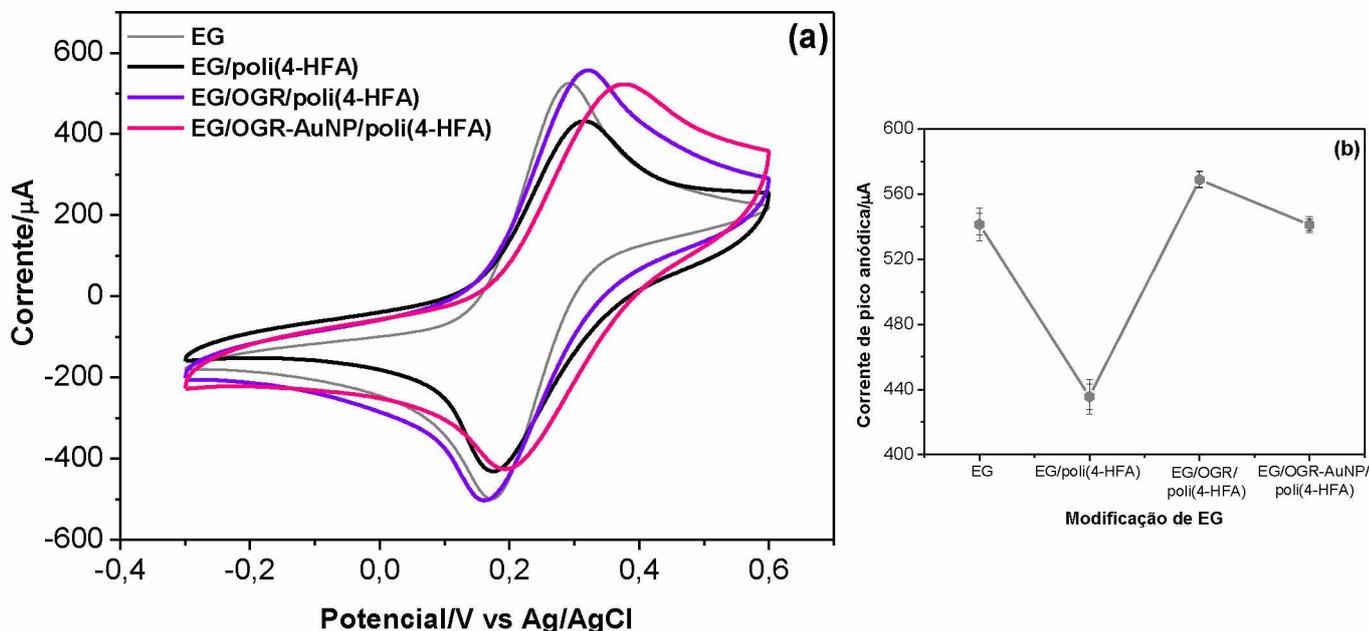
Figura 52 – Últimos ciclos obtidos por VC em HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} nos EG/poli(4-HFA), EG/OGR/poli(4-HFA) e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) (a) e quantidade de carga relacionado com o número de ciclos para EG/poli(4-HFA) e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) (b).



Uma segunda análise foi feita com base nos valores de carga da varredura anódica, como pode ser visto no gráfico da Figura 52(b), obtendo-se valores de 15, 20 e 42 μC para o EG/poli(4-HFA), EG/OGR/poli(4-HFA) e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA), respectivamente, corroborando com as discussões realizadas a respeito da quantidade de filme formado, que leva a um aumento de 3,77 vezes na área superficial gráfica, calculada por integração do *software Origin*.

Os voltamogramas obtidos por VC em $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, para os EG/poli(4-HFA), EG/OGR/poli(4-HFA) e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) são mostrados na Figura 53(a), enquanto a Figura 53(b) evidencia os valores de I_{pa} obtidos com referência a linha de base, em relação a modificação do eletrodo.

Figura 53 – Último ciclo de voltametria dos EG, EG/OGR e EG/OGR-AuNP contendo o filme poli(4-HFA), em solução de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 50 mV s^{-1} (a) e relação entre corrente de pico anódica e modificação de EG (b).



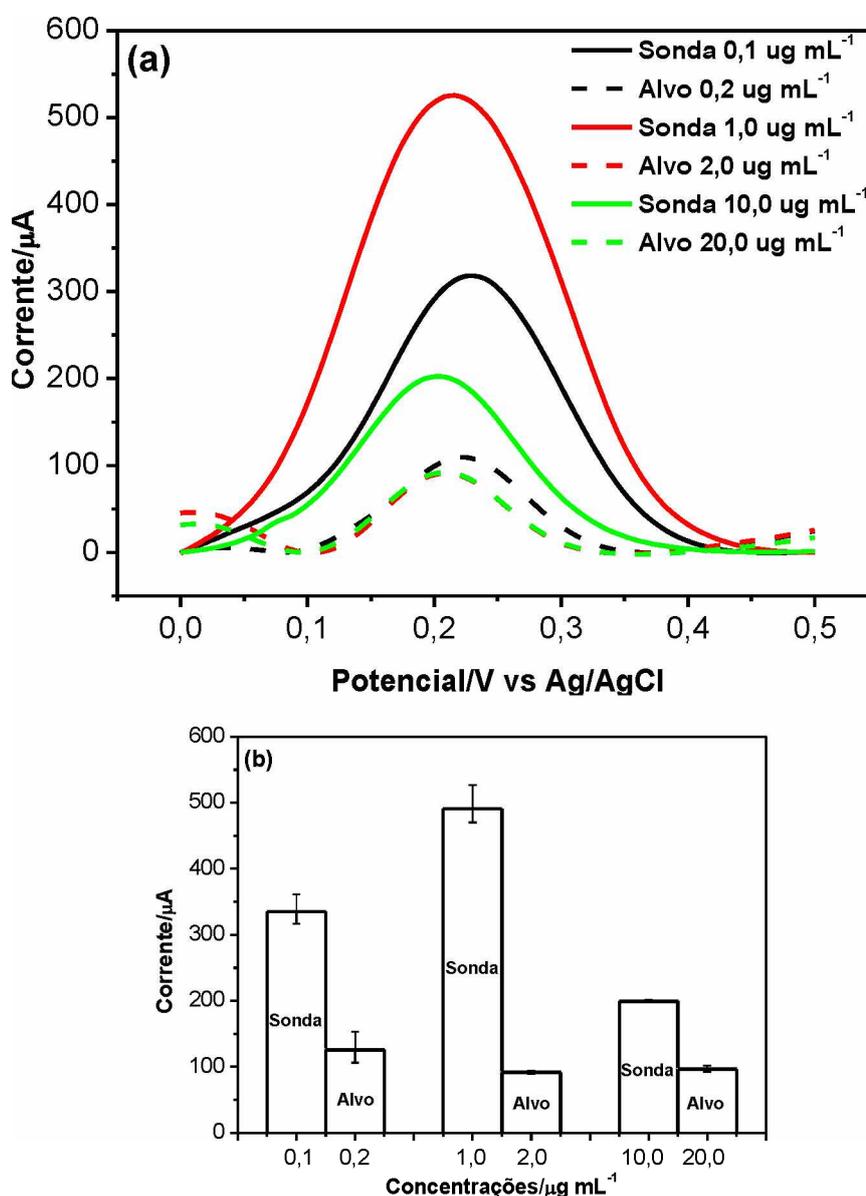
Os resultados possibilitam a avaliação das propriedades de transferência eletrônica do filme já formado, na interface eletrodo-solução a cada etapa de modificação do eletrodo. Pela comparação dos voltamogramas percebe-se que há um aumento na distância entre os E_{Pa} e E_{Pc} , ou seja, um aumento em ΔE_p para EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) (curva em rosa, Figura 53), levando a uma diminuição das I_p . Estes resultados sugerem uma maior resistência à transferência eletrônica, relacionado à presença de um material mais passivante na interface eletrodo-solução, devido a maior quantidade de filme formado. Além desse fato, o filme poli(4-HFA) apresenta em sua estrutura grupos carboxila expostos que, em contato com o par redox de caráter aniônico, provoca repulsão eletrostática entre os dois grupos, dificultando a chegada das espécies negativas a superfície do eletrodo e a ocorrência das reações de oxidação/redução, indicando o caráter aniônico do filme. Este fenômeno é mais pronunciado na plataforma, devido ao aumento da área superficial, favorecendo assim, o aumento de carboxila na superfície.

Este pequeno aumento na resistência eletrônica causado pela presença do nanocompósito, não compromete a resposta do imunossensor, uma vez que a resistência é aumentada pela maior quantidade de grupos carboxilas expostos. Visando a etapa de biofuncionalização, o aumento da quantidade de grupos carboxilas aumenta a possibilidade de imobilização de biomoléculas, sendo um aspecto favorável para construção do imunossensor.

4.7 Concentrações e tempo de interação sonda-alvo

A concentração da sonda Anti-T₃ foi variada juntamente com a concentração do alvo T₃ para a escolha da melhor diferença ou *gap* entre os sinais de corrente obtidos na detecção realizada por monitoramento do pico de oxidação de Fe²⁺ proveniente do K₄Fe(CN)₆ 5 mmol L⁻¹ em meio de solução de KCl 0,1 mol L⁻¹, utilizando a técnica de VPD, como mostrado na Figura 54.

Figura 54 – Detecção dos EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) contendo a sonda Anti-T₃ e alvo T₃ em diferentes concentrações, obtido por VPD em solução de K₄Fe(CN)₆ 5,0 mmol L⁻¹ em meio de KCl 0,1 mol L⁻¹, com velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹ (a) e relação entre sinais de corrente e concentrações de sonda e alvo (b).



Pelas respostas obtidas na Figura 54, fica evidente que, independente da concentração utilizada, a interação sonda-alvo promove uma diminuição da intensidade de corrente quando comparada aos sinais de sonda, o que indica que a interação dificulta o processo de oxidação do Fe^{2+} .

Observando as curvas obtidas para sonda $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e alvo $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (curvas em preto, Figura 54), pode ser observado que a interação da sonda com o alvo promove uma diminuição da intensidade de corrente de 61%, Tabela 2. Sabe-se que biomoléculas são ricas em grupos funcionais e muitos deles estão expostos em suas estruturas. Esse resultado obtido leva a hipótese de que as cargas referentes aos grupos funcionais expostos na estrutura do anticorpo Anti- T_3 promovem a chegada das espécies eletroativas a superfície do eletrodo, enquanto que a interação sonda-alvo inibe a exposição dessas cargas que facilitavam a chegada das espécies e, conseqüentemente, dificultam a oxidação do Fe^{2+} .

Baseado nas curvas referentes às concentrações de sonda $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e alvo $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (curvas em vermelho, Figura 54), é possível notar um considerável aumento na intensidade de corrente de oxidação do Fe^{2+} da curva de sonda $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ quando comparada a curva de sonda $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, assim como uma ligeira diminuição na intensidade de corrente da curva do alvo $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, quando comparada as curvas obtidas de alvo $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$. Estes resultados evidenciam o maior *gap* observado na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores de correntes de pico e potenciais de pico anódicos e *gap* entre sinais de corrente sonda-alvo para EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) com diferentes concentrações de sonda e alvo.

EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)	I_{Pa} (μA)	E_{Pa} (V)	<i>gap</i> entre respostas de corrente sonda-alvo (μA)	Diminuição relativa das respostas de corrente sonda-alvo (%)
Sonda $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$	337	0,22	—————	—————
Alvo $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$	108	0,22	207	61
Sonda $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	551	0,21	—————	—————
Alvo $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	91	0,21	401	72
Sonda $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	204	0,20	—————	—————
Alvo $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	91	0,21	104	51

Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que, ao aumentar a concentração da sonda, mais anticorpos são ligados a superfície de EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) e, em contato com a solução eletrolítica, mais espécies eletroativas são atraídas e, conseqüentemente, oxidadas, resultando no aumento de sinal de corrente observado. Por outro lado, quando essa

superfície mais concentrada de sonda é colocada em contato com o alvo, ocorre um aumento nas interações sonda-alvo, explicando a diminuição do sinal de corrente comparado com o sinal de Alvo $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$.

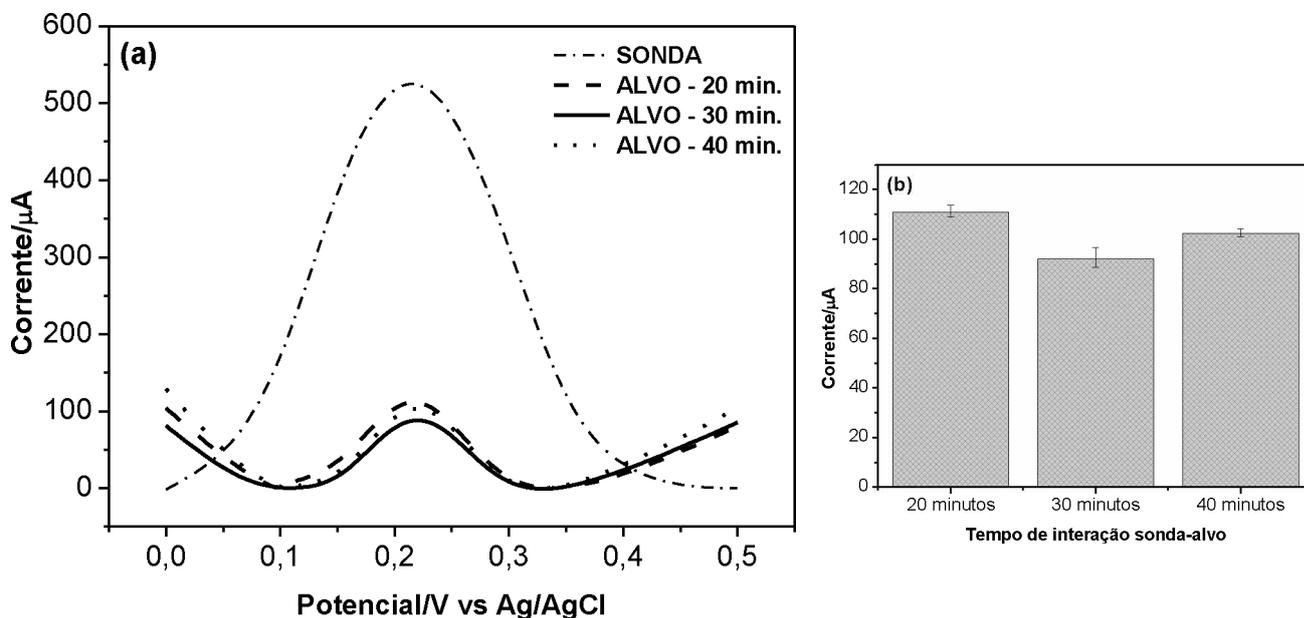
Ao comparar as curvas obtidas quando foram utilizadas as concentrações de sonda $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e alvo $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (curvas em verde, Figura 54) com as de sonda $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e alvo $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, pode ser observado que há uma intensa diminuição na intensidade de corrente da sonda, enquanto que o sinal de alvo permanece praticamente inalterado. O aumento da concentração em 10 vezes leva a um aumento na quantidade de anticorpos ligados a superfície EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA), que facilitam a chegada das espécies eletroativas, visto pelo valor de E_p ser mais catódico quando comparado aos demais, Tabela 2. Apesar desse fato, estando em grande quantidade na superfície do eletrodo, geram passivação ou até mesmo bloqueio da superfície, dificultando o contato direto com o analito Fe^{2+} para que ocorra o processo oxidativo e, assim, causando a diminuição da intensidade de corrente e, conseqüentemente o *gap* e diminuição relativa observados são diminuídos.

O sinal de corrente do alvo $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ estar sobreposto ao do alvo $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, podendo ser entendido como um processo de saturação da interação sonda-alvo, ou seja, concentrações de sonda maiores que $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ não promovem mais interações sonda-alvo nas condições estudadas e a dificuldade de chegada das espécies eletroativas é a mesma observada para o alvo $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Um estudo com base no tempo de interação sonda-alvo foi realizado nos EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) e são mostrados na Figura 55.

Os resultados mostrados na Figura 55(a) revelam que ocorre interação sonda-alvo em todos os eletrodos, independente dos tempos testados. Como discutido anteriormente, a interação com o alvo tende a provocar uma diminuição do sinal de corrente e, apesar da diferença entre os sinais obtidos ter sido pequena, o tempo de 30 minutos apresentou melhor sinal de interação sonda-alvo, uma vez que o sinal de corrente foi mais baixo comparado ao de 20 minutos, como visualizado na Figura 55(b). Já para o tempo de 40 minutos, os valores de corrente foram maiores que 30 minutos, indicando que houve saturação da superfície e/ou lixiviamento durante o processo de lavagem.

Figura 55 – Detecção dos EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) contendo Alvo T₃ 2 µg mL⁻¹ com diferentes tempos de interação, obtido por VPD em solução de K₄Fe(CN)₆ 5,0 mmol L⁻¹ em meio de KCl 0,1 mol L⁻¹, com velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹ (a), e intensidades de corrente dos EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/ALVO em diferentes tempos de interação (b).



Com base nas discussões realizadas anteriormente e nos resultados mostrados na Tabela 2 e na Figura 55, foram escolhidas as concentrações de 1,0 e 2,0 µg mL⁻¹, para sonda Anti-T₃ e alvo T₃, respectivamente, e um tempo de interação sonda-alvo de 30 minutos nas próximas etapas de estudo da plataforma. Uma vez que o sinal de resposta do alvo é sempre comparado ao da sonda, que funciona como uma referência, a justificativa de escolha dessas concentrações é que elas apresentaram o melhor *gap* entre os sinais de sonda e alvo na detecção do pico de oxidação do ferrocianeto de potássio.

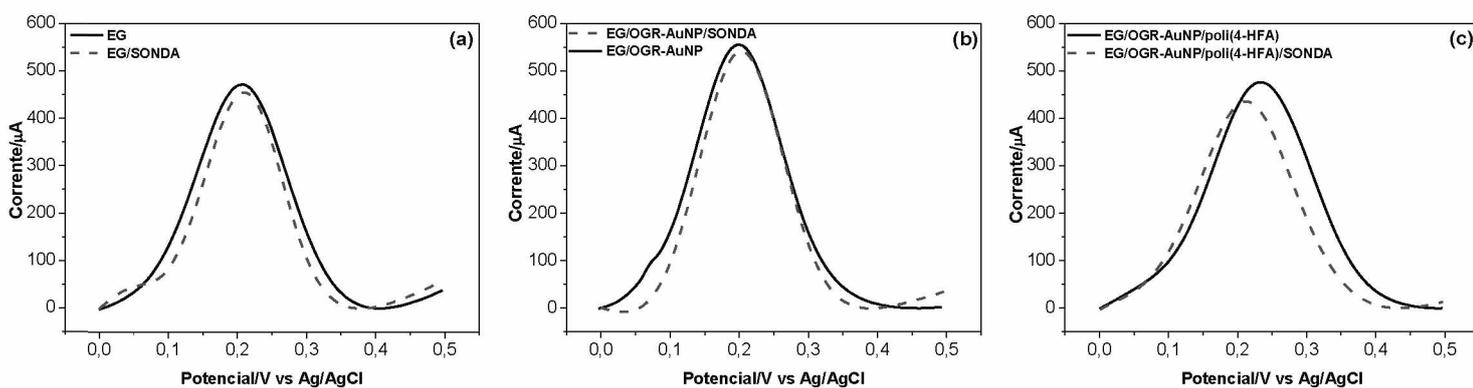
4.8 Caracterização eletroquímica do imunossensor

As curvas referentes aos testes de imobilização da sonda Anti-T₃ diretamente sobre EG e EG/OGR-AuNP estão mostradas na Figura 56, onde são usadas curvas referentes aos eletrodos sem a interação com a sonda para comparação.

Ao observar as curvas referentes ao EG na presença e na ausência de sonda, Figura 56(a), pode ser observado que não há mudança significativa nos valores de I_{Pa} e E_{Pa} entre elas. Este mesmo fato é observado ao comparar as curvas referentes ao EG/OGR-AuNP na

presença e na ausência de sonda, Figura 56(b). Estes resultados sugerem que não ocorre adsorção das biomoléculas sondas nas superfícies dos eletrodos que não apresentam o filme polimérico.

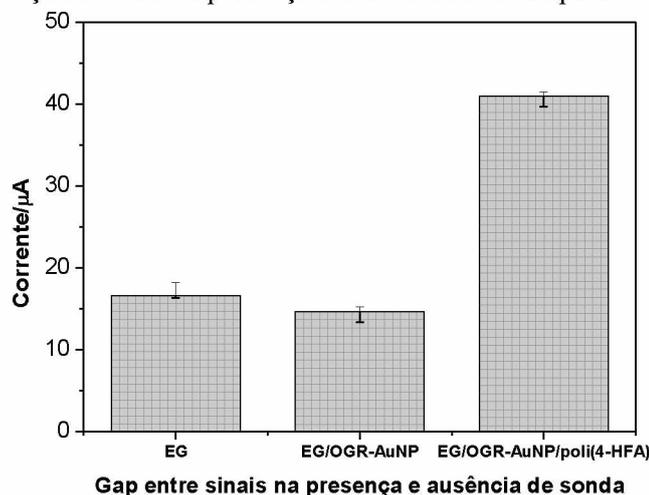
Figura 56 – Detecção dos EG (a), EG/OGR-AuNP (b) e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) (c) na presença e ausência de sonda, obtidos por VPD em solução de $K_4Fe(CN)_6$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} .



As curvas referentes ao EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) na presença e na ausência de sonda, Figura 56(c) mostram uma pequena diminuição na intensidade de I_{pa} em 11% e um deslocamento de E_{pa} de 0,23 V para 0,21 V, indicando a modificação do eletrodo com a presença da sonda.

A Figura 57 evidencia a diferença entre os sinais de resposta das diferentes superfícies na presença e na ausência de sonda, ou seja, o *gap* de sinais, embasando que a plataforma EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) foi a que teve um *gap* mais significativo na presença de sonda.

Figura 57 – Diferença de sinais na presença e ausência de sonda para diferentes superfícies.



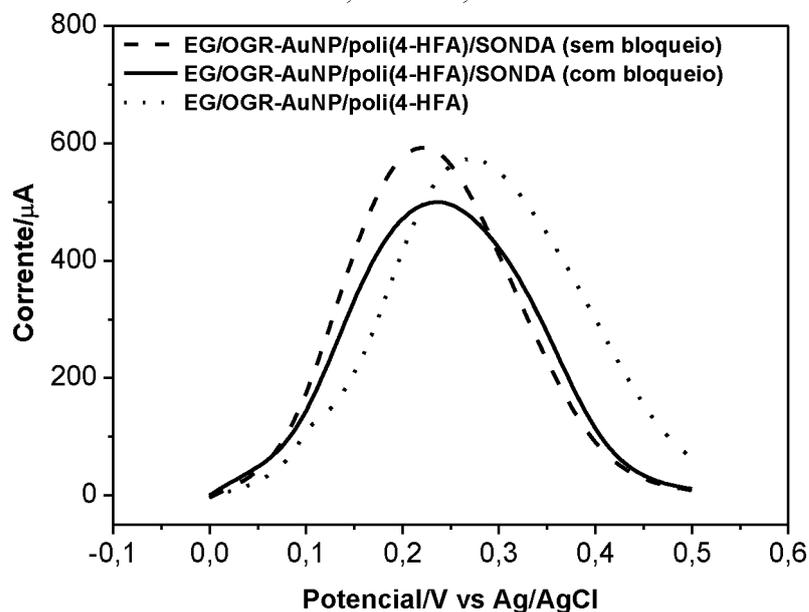
Vale ressaltar o fato observado a respeito da diminuição na intensidade de I_{pa} do EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) na presença de sonda quando comparado ao EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) na ausência de sonda, apesar da discussão já realizada acerca da facilitação do processo de oxidação do Fe^{2+} promovido pela sonda quando comparado ao alvo, tem-se que as biomoléculas sonda representam mais uma camada na interface eletrodosolução, acarretando uma maior dificuldade à transferência eletrônica com relação ao EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) sem sonda.

A utilização de EDC-NHS para ativação da superfície de EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) é de suma importância para imobilização do anticorpo Anti-T₃, uma vez que não foi obtido êxito na imobilização da sonda na superfície não ativada com EDC-NHS. Esse tipo de imobilização é predominantemente governado por adsorção física, que pode estar levando a uma adsorção aleatória ou a aglomeração das moléculas do anticorpo sobre o eletrodo, podendo causar repulsões eletrostáticas entre grupos expostos e, conseqüentemente, enfraquecendo a interação e sugerindo um processo de lixiviamento das mesmas durante o ensaio. A etapa de lavagem com solução de EA foi necessária para desativação dos grupos carboxilas ativados com EDC-NHS que não se ligaram a nenhum anticorpo. A EA é capaz de promover uma ligação amida, resultando em uma ligação forte que não é facilmente rompida ou substituída.

A imobilização da molécula de glicina sobre a superfície do eletrodo é feita com o objetivo de bloquear a superfície do eletrodo, para evitar a ocorrência de reações não-específicas ou não desejáveis. A Figura 58 mostra os voltamogramas obtidos por VPD em $K_4Fe(CN)_6$ 5,0 mmol L⁻¹ em meio de KCl 0,1 mol L⁻¹, com relação ao estudo da glicina como molécula de bloqueio, após a imobilização da biomolécula sonda.

Pode ser observado pela Figura 58 que, quando não há bloqueio na superfície de EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/SONDA, a intensidade do sinal de I_{pa} é maior que EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/SONDA com bloqueio. Como o pico observado é referente ao processo oxidativo de espécies em solução, a ausência de bloqueio faz com que a superfície do eletrodo e os grupos funcionais expostos da sonda estejam mais disponíveis na interface, facilitando o processo oxidativo de Fe^{2+} . A adição da molécula de bloqueio, que é uma molécula que adsorve na superfície, possivelmente mascara alguns grupos expostos da sonda que atraem as espécies eletroativas, dificultando a chegada das mesmas, evidenciado pela diminuição de corrente e o deslocamento do E_{pa} para valores mais anódicos.

Figura 58 – Detecção dos EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA), EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/SONDA – sem bloqueio de glicina e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/SONDA, obtidos por VPD em solução de $K_4Fe(CN)_6$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} .



4.8.1 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

Os estudos de modificação do eletrodo de grafite, bem como de biofuncionalização com a sonda e interação com o alvo por EIE, estão representados por diagramas de Nyquist, diagramas de Bode e modelos de circuitos elétricos, sendo que os gráficos mostrados na Figura 59(a) são referentes aos EG e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA), na Figura 59(b) aos EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/SONDA e, na Figura 59(c) aos EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/SONDA e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/ALVO.

A Figura 60 mostra os circuitos elétricos equivalentes empregados para ajustar os dados experimentais. O circuito para o eletrodo de grafite inclui o R_s que representa a resistência da solução eletrolítica, um elemento de fase constante (Q_{dl}), R_{ct} que representa a resistência à transferência de carga do par redox ($K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$) e impedância de Warburg (W) que é associado ao processo difusional dos íons. Adicionalmente, os demais sistemas apresentaram um elemento difusional, a impedância transmissiva (T) que está relacionada à difusão finita de espécies num meio onde uma das interfaces dificulta esta difusão^{114,115}.

Figura 59 – Diagramas de Nyquist (Z'' vs. Z') e de Bode em $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 5 mmol L⁻¹ em meio de KCl 0,1 mol L⁻¹ dos EG e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) (a); EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/SONDA (b) e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/SONDA e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/ALVO (c). Amplitude 10 mV; Intervalo de frequência: 10 000 a 0,01 Hz.

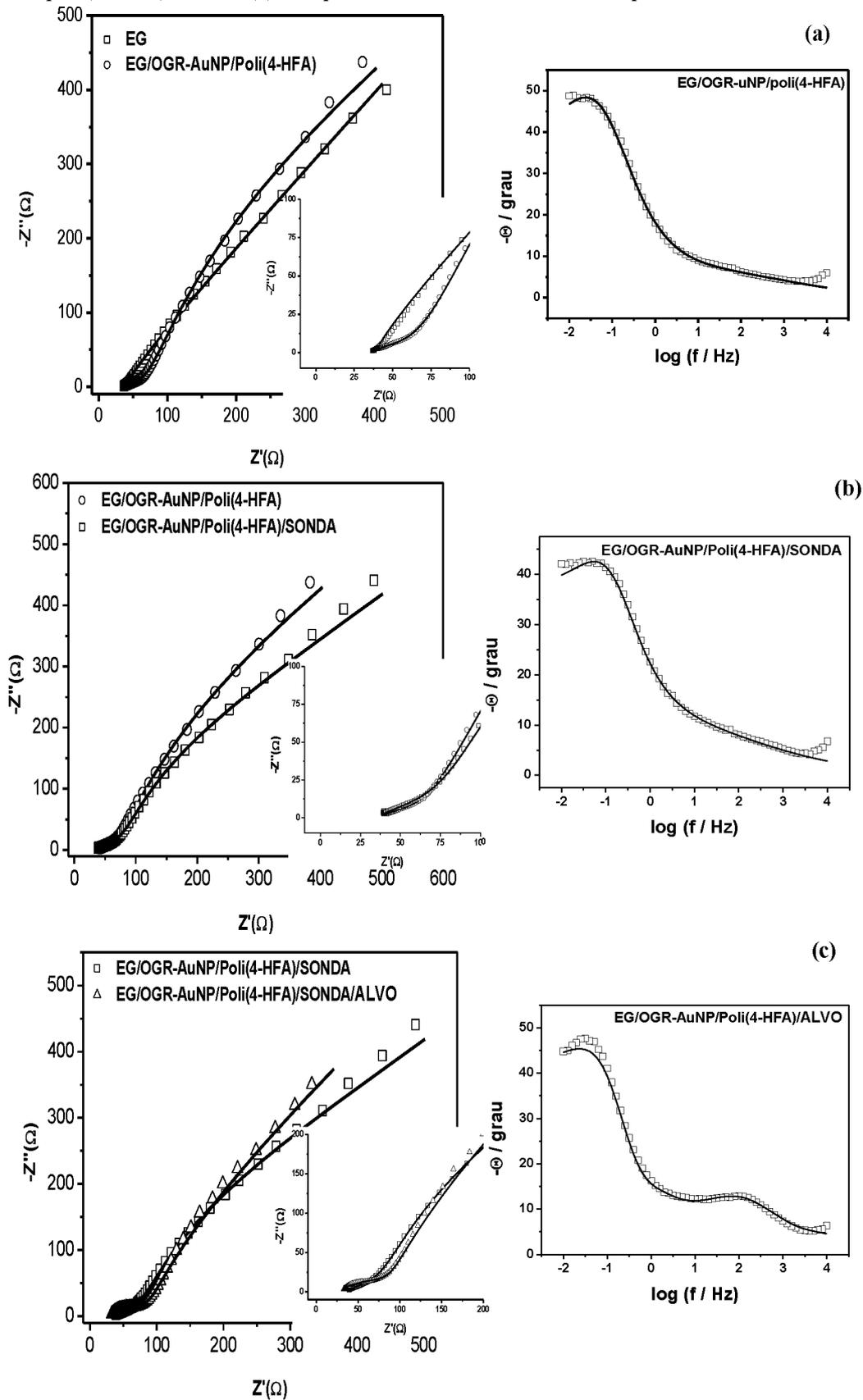
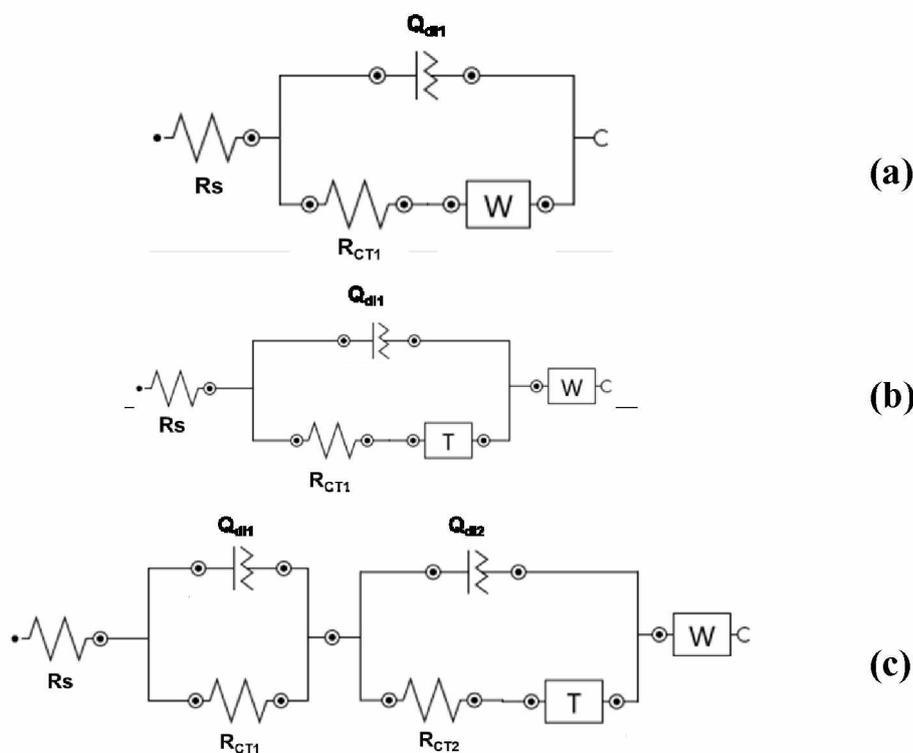


Figura 60 – Circuito elétrico equivalente proposto para os resultados de EIE para EG (a), EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/SONDA (b) e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/ALVO (c).



A resistência à transferência eletrônica foi empregada para analisar os sistemas, pois este parâmetro é direto e sensível, respondendo assim às mudanças na interface do eletrodo¹¹⁶, estes valores seguem compilados na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores de resistências, elementos de fase constante e impedância dos eletrodos.

	χ^2	R_s (Ω)	R_1 (Ω)	R_2 (Ω)
EG	0,02	38,9	1,59	-
EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)	0,01	36,6	25,1	-
EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/SONDA	0,02	34,5	41,8	-
EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/ALVO	0,04	22,4	63,6	1,09 k

Pode ser observado na Figura 59(a) que o EG apresenta resistência eletrônica muito baixa em regiões de altas frequências (1,59) devido à boa condutividade desse material. Após a modificação com EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA), é observado um aumento na resistência, devido à presença dos grupos funcionais do polímero (carboxila) (25,1 Ω), que promovem repulsão eletrônica com o par redox $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$, por esta sonda ser aniônica.

Ao analisar a Figura 59(b) e os dados da Tabela 3, foi observado que houve um pequeno aumento na resistência após a imobilização da biomolécula sonda e bloqueio com

glicina (41,8), corroborando com a pequena diferença do sinal eletroquímico de I_{pa} observado na detecção em VPD. Após a interação com o alvo, Figura 59(c), houve um aumento significativo nos valores de resistência (63,6) à passagem de corrente, evidenciando a interação entre a sonda e o alvo. Além disso, esse sistema apresentou um tipo adicional de resistência à transferência de carga, apresentando duas constantes de fase no diagrama de Bode da Figura 60(c), que pode estar relacionado à formação do imunocomplexo. Este aumento considerável nos valores de resistência pode servir como explicação para a diminuição em 72% do sinal de corrente da oxidação do Fe^{2+} quando em contato com o alvo.

De forma geral, os resultados de EIE mostraram um aumento na resistência à medida que se adicionam camadas na superfície do eletrodo, crescendo na direção filme – sonda – alvo, corroborando com os resultados obtidos pela técnica de VPD, possibilitando uma caracterização eletroquímica de cada etapa de modificação do eletrodo, evidenciando a imobilização das biomoléculas.

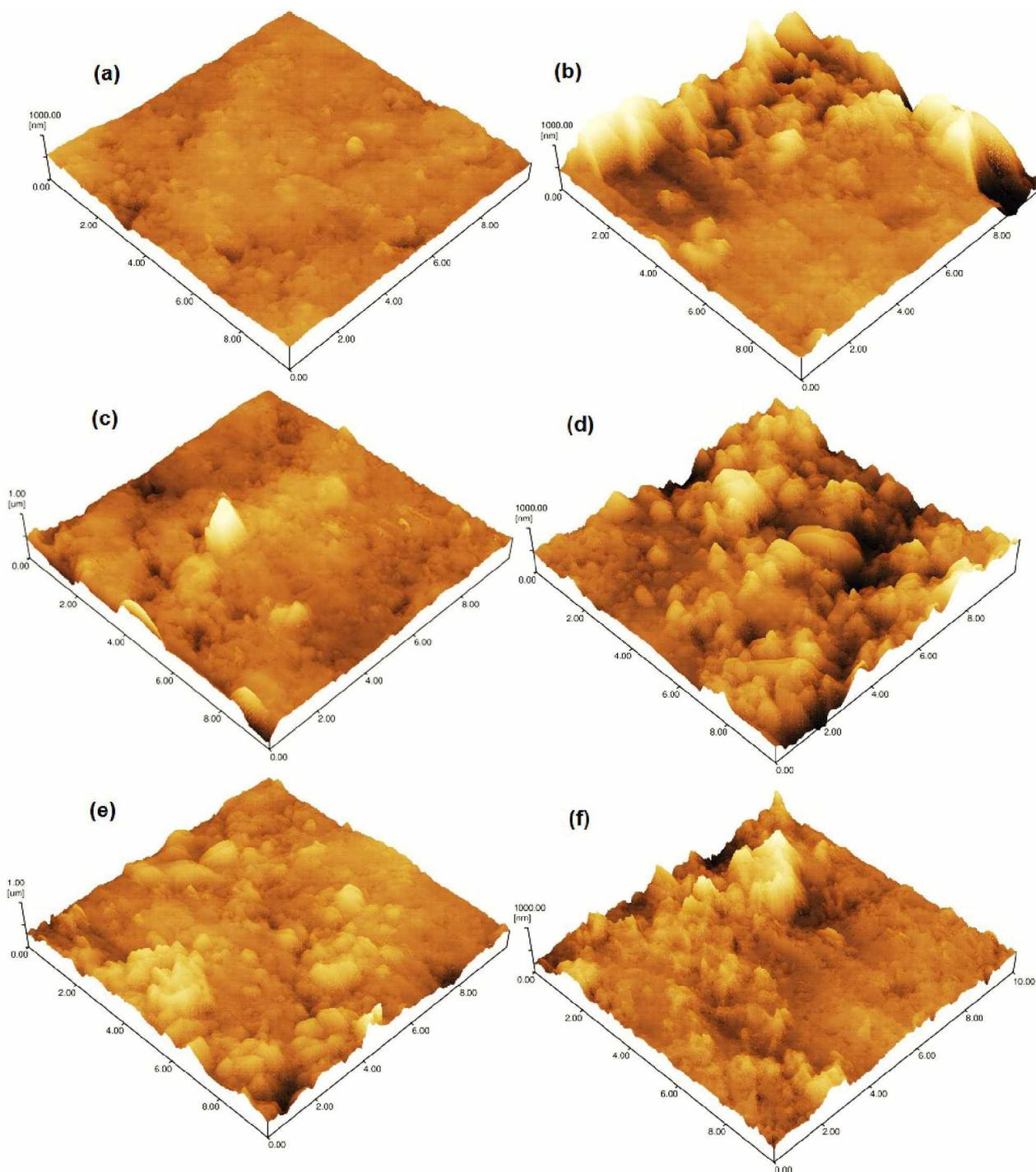
4.9 Estudo morfológico das etapas de construção da plataforma e do imunossensor

A Tabela 4 mostra os valores de altura média, rugosidade média e rugosidade média quadrática das medidas de AFM, calculados pelo *software* SMP Offline – HeightTrace do instrumento, enquanto que a Figura 61 mostra as imagens obtidas por AFM para EG e EG modificados a cada etapa de construção do imunossensor.

Tabela 4 – Valores de altura média (Rz), rugosidade média (Ra) e rugosidade média quadrática (Rq) dos eletrodos analisados por AFM.

	Rz (nm)	Ra (nm)	Rq (nm)
EG	500	32	42
EG/OGR-AuNP	1336	101	153
EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)	1057	59	87
EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/SONDA (sem bloqueio)	1086	105	138
EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/SONDA (com bloqueio)	992	66	88
EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/ALVO	1301	78	112

Figura 61 – Imagens de AFM para EG (a), EG/OGR-AuNP (b), EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) (c), EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/SONDA (sem bloqueio) (d) EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/SONDA (com bloqueio) (e) e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/ALVO (f).



É possível visualizar que o EG, Figura 61(a), apesar de se caracterizar como um material poroso⁹² apresenta uma estrutura mais plana com relação aos demais. A presença de OGR-AuNP sobre EG, Figura 61(b) é caracterizada pelo aparecimento de partículas agregadas de tamanhos diferentes espalhadas sobre a superfície, apesar de permitirem que a

mesma fique exposta em partes. O nanocompósito aumenta a rugosidade média da superfície em cerca de 3 vezes, Tabela 4, resultando no aumento da área superficial observada nos estudos eletroquímicos. A etapa de modificação com o filme poli(4-HFA), Figura 61(c) revela uma diminuição na rugosidade quando comparada a EG/OGR-AuNP, apesar de continuar elevada quando comparada a EG, Tabela 4, sugerindo que o filme promove um recobrimento dos vales sobre o nanocompósito e sobre a superfície de EG.

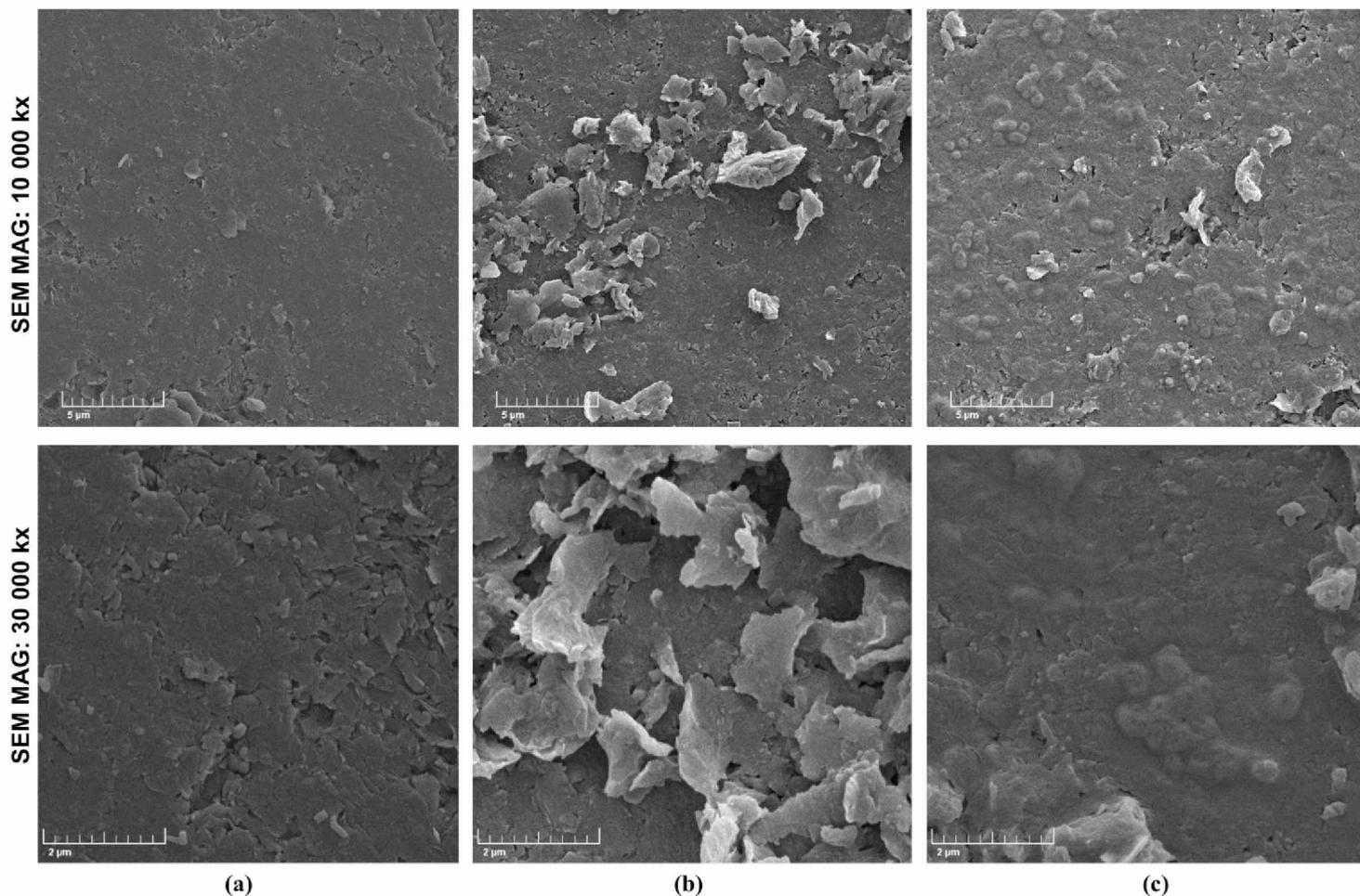
A adição de sonda Anti-T₃ sem o bloqueio, Figura 61(d), mostra valores de rugosidade elevados, Tabela 4. Esse aumento na rugosidade pode estar relacionado com a interação do anticorpo com os nanomateriais, evidenciado pela presença de vales, sugerindo uma maior quantidade desse material exposto na interface, além do melhor recobrimento da superfície, indicando a efetiva ligação da sonda a plataforma EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA).

Já ao adicionar a molécula de bloqueio, Figura 61(e), percebe-se novamente uma diminuição na rugosidade da superfície, Tabela 4, sugerindo que as moléculas de glicina agem no preenchimento de espaços entre os nanomateriais e a superfície, encobrendo alguns grupos expostos, como sugerido na discussão dos resultados observados na detecção em VPD para o EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/SONDA na ausência e na presença de bloqueio, do item 4.8. Observa-se ainda que o valor de rugosidade desta etapa está próximo ao de EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA), Tabela 4, que pode estar relacionado a pequena alteração na resistência a passagem de corrente observado nos resultados de EIE para essas duas etapas.

Após interação com moléculas alvo T₃, Figura 61(f), é possível visualizar que os vales antes observados, agora apresentam picos mais estreitos, sugerindo ser a formação de imunocomplexos, ou seja, a interação de sonda e alvo, evidenciada pela diferença nas morfologias de (d) e (f) da Figura 61. O aumento na rugosidade observado também evidencia a presença das moléculas do alvo, Tabela 4, e mais uma vez está de acordo com os resultados obtidos por EIE.

As imagens de MEV estão mostradas na Figura 62, corroborando com os resultados obtidos por AFM.

Figura 62 – Imagens de MEV com ampliações de 10.000 e 30.000 vezes para EG (a), EG/OGR-AuNP (b) e EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA) (c).



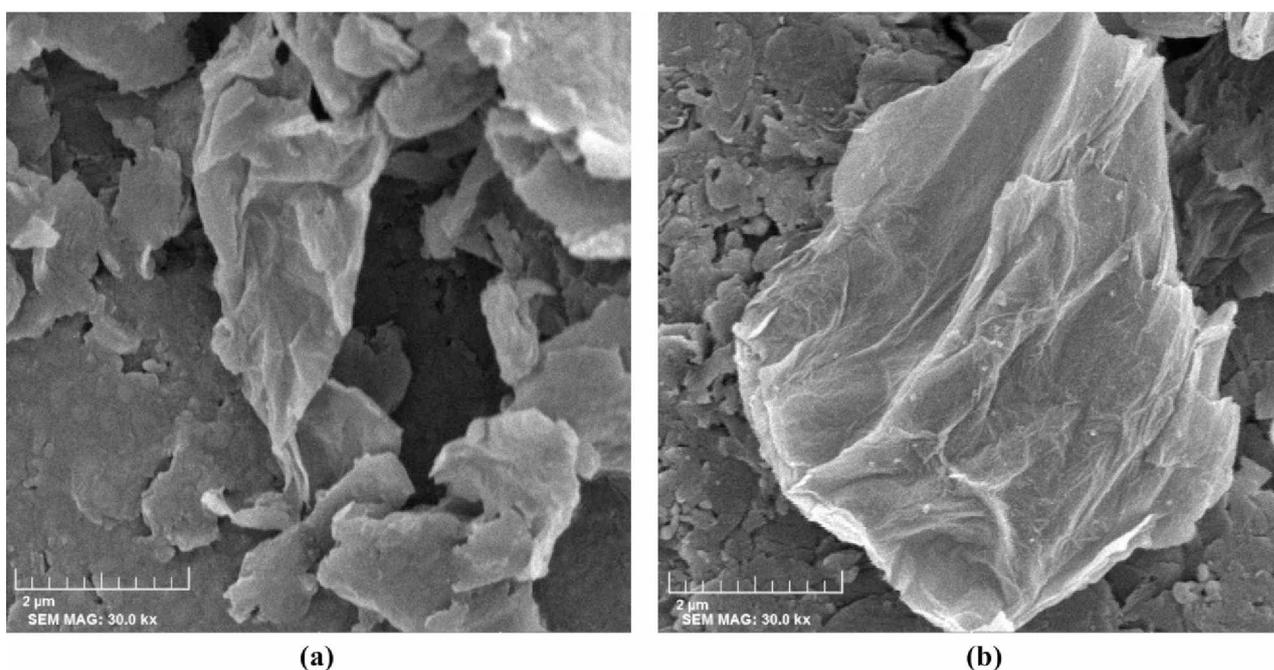
A Figura 62(a) permite a visualização de uma superfície razoavelmente plana para EG, apesar da presença de buracos característicos⁹² e alguns fragmentos do próprio grafite, que podem ser resultantes do processo de polimento. A Figura 62(b) revela a distribuição não uniforme de OGR-AuNP pela superfície do EG, de forma particulada com estruturas e tamanhos diferentes, como também observado nas imagens de AFM. A imagem de EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA), Figura 62(c), mostra um recobrimento com pequenas estruturas globulares na superfície do eletrodo, como uma espécie de erupção e, uma vez que ainda é perceptível a visualização de partículas do nanocompósito, há, agora, uma perda da nitidez dos detalhes antes visualizados.

Ambas as imagens de AFM e MEV para o EG modificado com OGR mostram que as folhas antes dispersas, não ficam totalmente separadas pela superfície e, sim caracterizadas morfologicamente como partículas. Este fato deve estar relacionado pelo processo como este material é incorporado no eletrodo. Durante a secagem em forno, as folhas dispersas de OGR,

altamente hidrofóbicas, vão se depositando na superfície do eletrodo e se aglomerando, pelas interações de van der Waals, formando essa estrutura.

Ao observar uma partícula razoavelmente grande de OGR em um EG/OGR, Figura 63(a) é possível a visualização dos enrugamentos característicos sobre sua superfície, sugerindo serem as folhas mais expostas de OGR, conforme discussão já feita no item 4.1.4.

Figura 63 – Imagens de MEV com ampliação de 30.000 vezes para EG/OGR (a) e EG/OGR-AuNP (b).

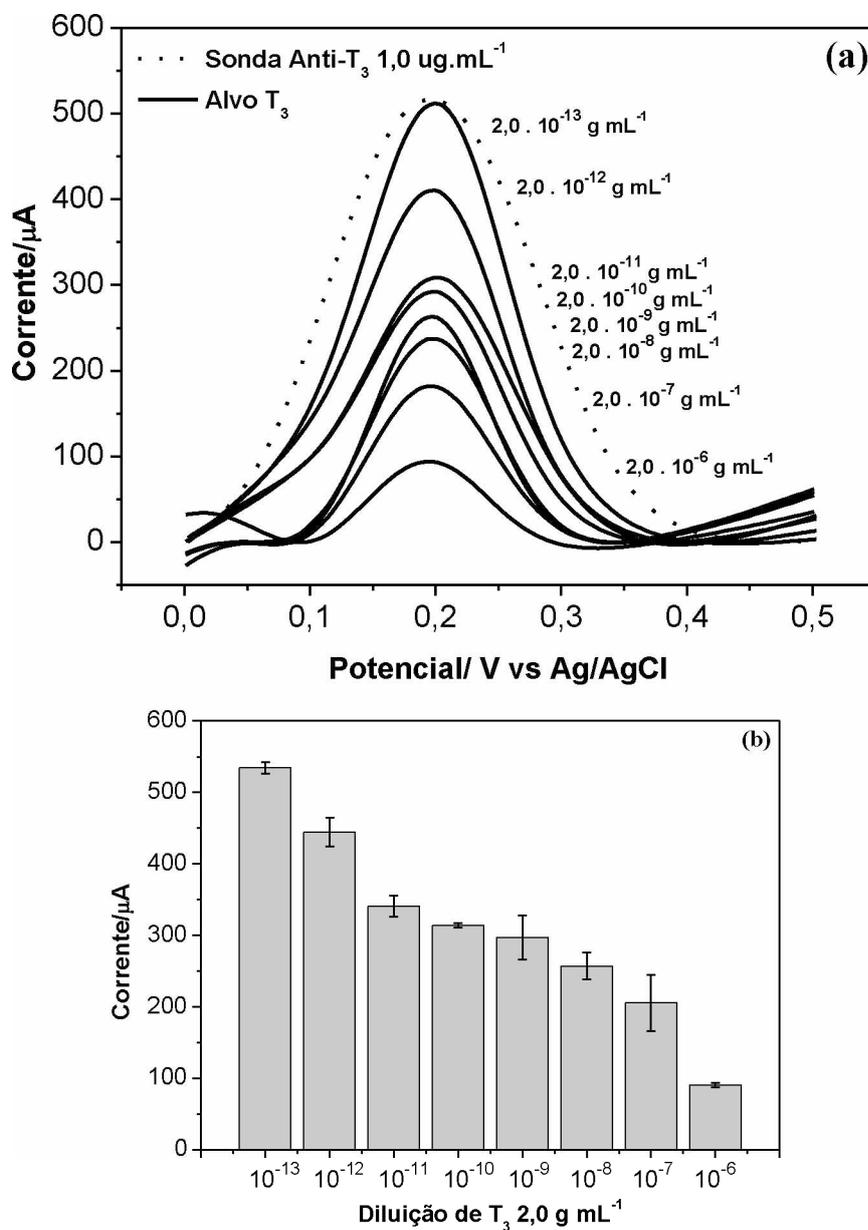


A imagem na Figura 63(b) é referente ao EG/OGR-AuNP, que permite a visualização de pequenos pontos brancos sobre a superfície, principalmente sobre OGR, indicando serem relativos às AuNP de maiores agregações, uma vez que a comparação com as imagens de EG/OGR, Figura 63(a), não permitem a visualização de nenhum ponto de intensidade mais clara.

4.10 Faixa de concentração e curva analítica

As curvas referentes às detecções do alvo T₃ em diferentes diluições para o estabelecimento da melhor faixa de concentração estão mostradas na Figura 64, onde a curva referente à resposta da sonda Anti-T₃ é usada para comparação.

Figura 64 – Detecção dos EG/OGR-AuNP/poli(4-HFA)/SONDA contendo o Alvo T_3 em diferentes diluições, obtido por VPD em solução de $K_4Fe(CN)_6$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} (a) e relação entre corrente de pico anódica e diluição de T_3 $2,0 \text{ g mL}^{-1}$ (b).

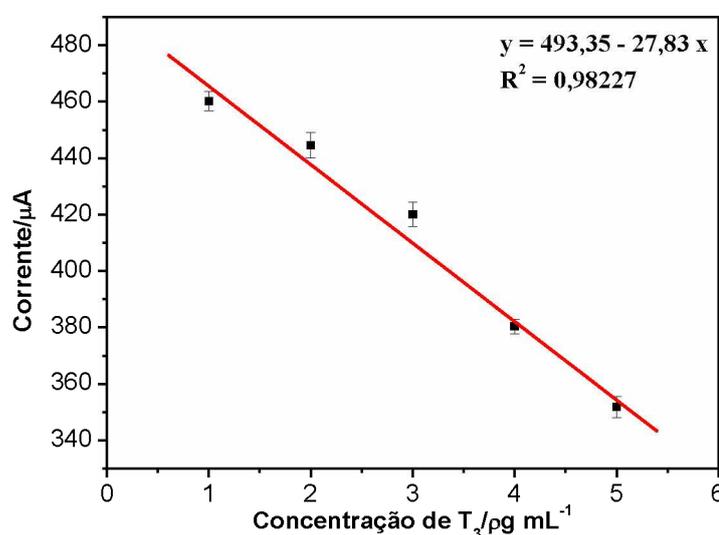


A partir das diluições do alvo T_3 é possível observar pela Figura 64 que, quanto mais diluído o alvo, maior o valor de I_{pa} . Como o sinal monitorado é o pico de oxidação de Fe^{2+} e já se sabe que a presença de alvo leva a diminuição da resposta de corrente, os resultados obtidos com a diluição estão em concordância com os anteriores, pois quanto mais diluído, menor a quantidade de alvo e mais disponível as moléculas de sonda poderão estar na superfície do eletrodo, facilitando a chegada das espécies eletroativas.

Como o sinal de sonda é utilizado para comparação, percebe-se que o limite de detecção do alvo está entre as concentrações de $2,0 \cdot 10^{-12}$ e $2,0 \cdot 10^{-13} \text{ g mL}^{-1}$, pois é o sinal de resposta que mais se aproxima do padrão de comparação. Sabendo que a concentração de $T_{3(\text{Livre})}$ presente no sangue é de 2,50 a $3,90 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e a faixa de concentração alcançada é superior a este valor de referência, foi possível realizar a construção de uma curva analítica que abrangesse essa faixa de concentração do alvo T_3 .

A Figura 65 apresenta a curva analítica proposta para quantificação do alvo T_3 , onde os sinais de resposta analíticos obtidos pela corrente de pico anódica, obtido por VPD em solução de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} .

Figura 65 – Curva analítica de T_3 na faixa de $1,0$ a $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.



A partir do gráfico mostrado na Figura 65, foi efetuada uma análise de regressão linear da corrente *versus* a concentração do alvo T_3 , obtendo um perfil de linearidade com $R^2 = 0,98227$. Ao observar o valor obtido do coeficiente angular da equação de reta, percebe-se que ele é relativamente alto ($\sim 28 \mu\text{A } \mu\text{g mL}^{-1}$), ou seja, pequenas variações na concentração de T_3 causam grandes variações nas respostas de corrente, evidenciando um sistema consideravelmente sensível. A partir deste resultado, é esperado que o imunossensor proposto seja eficaz no monitoramento de concentração do hormônio tireoidiano T_3 em soro de pacientes saudáveis, pois a curva apresenta uma faixa de trabalho linear que coincide com a concentração de referência de T_3 , assim como de pacientes com hipo ou hipertireoidismo, onde os níveis de T_3 , estarão abaixo de $2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ou acima de $4 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

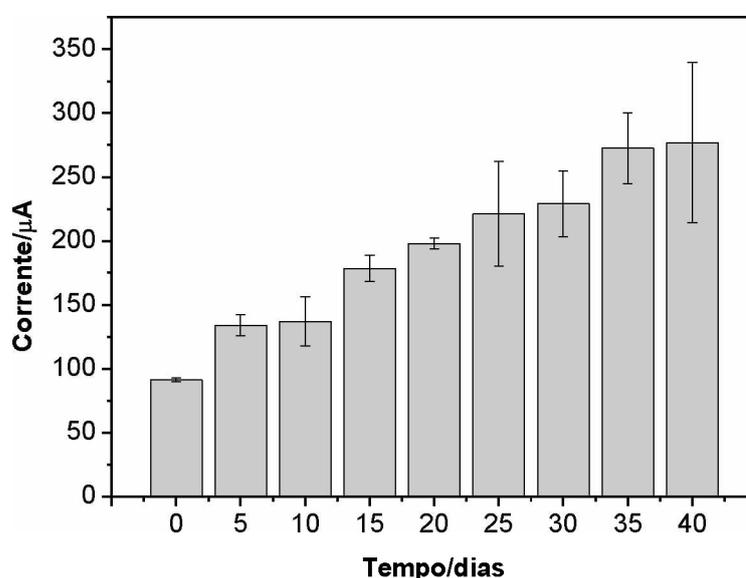
Este resultado é promissor para aplicação em amostras de soro reais e, apresenta a vantagem de utilizar pequenas quantidades de amostra, sendo necessário apenas $10 \text{ } \mu\text{L}$ para

realização de uma leitura, ou 30 μL para ter a resposta em triplicata, além de necessitar de pequenos tempos de respostas, pois o teste dura cerca de 30 minutos.

4.11 Definição da estabilidade do imunossensor

Um gráfico de barras com relação ao tempo de resposta e o sinal de corrente de pico anódico, obtido na detecção dos alvos, está representado na Figura 66.

Figura 66 – Estabilidade do imunossensor proposto durante o tempo de 40 dias.



Observando a Figura 66, percebe-se que nos primeiros 10 dias há um aumento de aproximadamente 50% do valor de resposta de corrente do imunossensor, que chega a mais de 100% no vigésimo dia. Este resultado indica que a estabilidade do imunossensor proposto deve ser otimizada em estudos futuros, uma vez que anticorpos são moléculas muito estáveis devido à presença de pontes dissulfeto em sua estrutura, podendo durar meses na ausência de protease¹¹⁷.

Este resultado pode ter sido causado pela formação de cristais de gelo na superfície do eletrodo no período que os mesmos foram retirados do congelador e deixados aquecer a temperatura ambiente. Os cristais de gelo podem destruir a estrutura proteica, gerando ineficiência do anticorpo¹¹⁸. Uma alternativa pode ser a refrigeração até 4 °C, ao invés do congelamento dos eletrodos.

5. CONCLUSÕES

O procedimento adotado para síntese química de óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido se mostrou satisfatório para obtenção dos produtos. A caracterização por espectroscopia na região do infravermelho evidenciou a presença de grupos oxigenados no óxido de grafite e a redução significativa desses grupos e, até mesmo, ausência de alguns no óxido de grafite reduzido. Por análise termogravimétrica foi observada a maior estabilidade térmica de óxido de grafite reduzido, causada pela ausência de grupos oxigenados. Imagens de microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura revelaram a morfologia característica de folhas dispersas de óxido de grafeno, enquanto imagens de microscopia eletrônica de varredura evidenciaram a estrutura mais compacta do óxido de grafeno reduzido.

A incorporação de óxido de grafeno reduzido e posterior eletrodeposição de nanopartículas de ouro, formando um nanocompósito sobre a superfície de eletrodos de grafite, mostraram um aumento significativo na resposta de corrente do eletrodo, que está relacionada com a área superficial do mesmo, melhorando, assim, a condutividade elétrica e a transferência eletrônica do eletrodo.

A eficiência da modificação dos eletrodos de grafite com o nanocompósito foi primeiramente evidenciada durante os estudos de eletropolimerização do filme de ácido 4-hidroxifenilacético, onde a combinação desses materiais levou a formação de uma maior quantidade de filme, cujas propriedades eletroquímicas são superiores às do polímero derivado do ácido 4-hidroxifenilacético isolado. Além de proporcionar uma melhora na transferência eletrônica durante a eletropolimerização, o nanocompósito realça a presença de três pares redox do filme do ácido 4-hidroxifenilacético.

Devido a presença do nanocompósito levar a formação de uma maior quantidade de filme polimérico derivado do ácido 4-hidroxifenilacético, ele, conseqüentemente, aumenta a possibilidade de que mais material biológico seja imobilizado sobre a superfície do imunossensor, devido ao aumento de grupos funcionais do filme.

Os melhores resultados no processo de imobilização de Anti-T₃ e interação com o alvo T₃ foram obtidos com a concentração de 1 e 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, por imobilização

covalente da sonda na superfície contendo o nanocompósito e o filme polimérico do ácido 4-hidroxifenilacético mediada pela utilização de EDC-NHS.

Os resultados obtidos pela técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica corroboraram com os estudos obtidos em voltametria de pulso diferencial, comprovando o aumento de resistência a cada etapa de modificação do eletrodo de grafite e incorporação de biomoléculas, seguindo a ordem crescente de nanocompósito – filme – sonda – alvo.

A caracterização do imunossensor por imagens de microscopia de força atômica apresentaram alterações significativas nos valores de rugosidade média a cada etapa de construção do sensor, que estão concordantes com o aumento considerável de sinais de resposta do eletrodo no estudo eletroquímico por voltametria de pulso diferencial. As imagens de microscopia eletrônica de varredura nas etapas de modificação até a construção da plataforma corroboram com as imagens de microscopia de força atômica, além de evidenciarem a etapa de modificação da eletrodeposição das nanopartículas de ouro, quando comparada com imagens do eletrodo contendo somente óxido de grafeno reduzido.

Detecções de diluições do Alvo T₃ mostraram que o imunossensor proposto tem limite de detecção de $2,0 \cdot 10^{-13} \text{ g mL}^{-1}$, que é uma concentração inferior a concentração de T_{3(Livre)} presente no sangue. A partir do limite de detecção, foi possível a construção de uma curva analítica de concentração de T₃ com faixa linear de resposta na ordem de 1,0 a 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, que aumenta a expectativa de aplicação em amostras reais de pacientes. Estes resultados possibilitam a análise utilizando pequeno volume de amostra e baixos tempos de resposta. O imunossensor proposto tem maior estabilidade em 10 dias, quando estocado em refrigeração abaixo de 0 °C.

6. PERSPECTIVAS

- Estudo de seletividade do imunossensor desenvolvido;
- Otimização da estabilidade do imunossensor;
- Aplicação do imunossensor em amostras de soro de pacientes reais;
- Desenvolvimento de imunossensor para o diagnóstico de T₄ e/ou TSH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. **Semana Internacional da Tireoide**. 2011. Disponível em: <<http://www.endocrino.org.br/semana-internacional-da-tireoide-2011/>>. Acesso em: 25 fev. 2017.
- 2 – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Nacional da Saúde**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/pns/2013/default_xls.shtm> . Acesso em: 25 fev. 2017.
- 3 – BAHADIR, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. **Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/biowarfare analyses**. Analytical Biochemistry, 2015. p. 107-121.
- 4 – KUILLA, T.; BHADRA, S.; YAO, D.; KIM, N. H.; BOSE, S.; LEE, J. H. **Recent advances in graphene based polymer composites**. Progress in Polymer Science, v. 35, 2010. p. 1350-1375.
- 5 – XU, Q.; GU, S.; JIN, L.; ZHOU, Y.; YANG, Z.; WANG, W.; HU, X. **Graphene/polyaniline/gold nanoparticles nanocomposite for the direct electron transfer of glucose oxidase and glucose biosensing**. Sensors and Actuators B: Chemical, v.190, 2014. p. 562-569.
- 6 – HALL, J. E.; GUYTON, A. C. **Tratado de Fisiologia Médica**. Tradução de Alcides Marinho Junior et al. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 1151 p.
- 7 – MACIEL, R. M. B. Fisiologia e Avaliação Diagnóstica. In: SAAD, M. J. A.; MACIEL, R. M. B.; MENDONÇA, B. B. **Endocrinologia**. São Paulo: Atheneu, 2007. p. 299-330.
- 8 – LARSEN, P. R.; DAVIES, T. F.; SCHLUMBERGER M.; HAY, L. D. Fisiologia da tireoide e avaliação diagnóstica de pacientes com doenças tireoidianas. In: KRONENBERG, H. M.; MELMED, S.; POLONSKY, K. S.; LARSEN, P. R. **Williams tratado de endocrinologia**. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p. 252-281.
- 9 – AZEVEDO, M.; SALES, B.; MAIA, L.; LEAL, E. Interpretação dos Testes de Função Tireoidiana. In: VILLAR, L. (Ed. Responsável). **Endocrinologia Clínica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 219-230.
- 10 – LOPES, H. J. de J. **Função Tireoidiana: principais testes laboratoriais e aplicações diagnósticas**. 2002. Disponível em: <<http://www.goldanalisa.com.br/arquivos/>>. Acesso em: 25 jan. 2017.
- 11 – SPENCER, C. A. **Thyroid Function Tests: Assay of Thyroid Hormones and Related Substances**. 2013. Disponível em: <<http://www.thyroidmanager.org/chapter/assay-of-thyroid-hormones-and-related-substances/>>. Acesso em: 31 jan. 2017.
- 12 – DUFOUR, D. R. **Laboratory Tests of Thyroid Function: Uses and Limitations**. Endocrinology and Metabolism Clinics os North America, v. 36, 2007. p. 579-594.
- 13 – COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR. **Licenciamento e Controle de Instalações Medicinas**. Disponível em: <

<http://www.cnen.gov.br/images/cnen/documentos/drs/orientacoes/NEW-P3-Licenciamento-e-Controle-de-Instala%C3%A7%C3%B5es-Medicinas.pdf>>. Acesso em: 02 mar. 2017.

14 – GOUVEIA, S.; LEITÃO, F.; RIBEIRO, C.; CARRILHO, F. **Fatores de Interferência no estudo da função tiroideia**. Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, n. 11, 2016. p. 277-286.

15 – COUTO, R. A. S.; LIMA, J. L. F. C.; QUINAZ, M. B. **Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis**. Talanta, v. 146, n. 1, 2016. p. 801-814.

16 – INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Compendium of Chemical Terminology**. Compiled by MCNAUGH, A. D.; WILKINSON A. 2. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997. Disponível em: <[https://goldbook.iupac.org\(2006-\)](https://goldbook.iupac.org(2006-))>. Acesso em: 03 fev. 2017.

17 – CAMMANN, K. **Bio-Sensors Based on Ion-Selective Electrodes**. Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie, n. 287, 1977. p. 1-9.

18 – CLARCK, L. C. Jr.; LYONS, C. **Electrod systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery**. Annals New York Academy of Sciences, 1962. p. 29-45.

19 – MEHROTRA, P. **Biosensors and their applications – A review**. Journal of Oral Biology and Craniofacial Research, v. 6, 2016. p. 153-159.

20 – LUONG, J. H. T.; MALE, K. B.; GLENNON, J. D. **Biosensor technology: Technology push versus market pull**. Biotechnology Advances, n. 26, 2008. p. 492-500.

21 – ABDULHALIM, I.; ZOUROB, M.; LAKHTAKIA, A. Overview of Optical Biosensing Techniques. In: MARKS, R.S.; LOWE, C.R.; CULLEN, D.C.; WEETALL, H.H.; KARUBE, I. (Eds.). **Handbook of Biosensors and Biochips**, 2008. p. 1-34.

22 – SKLÁDAAL, P. **Piezoelectric Quartz Crystal Sensors Applied for Bioanalytical Assays and Characterization of Affinity Interactions**. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 14, n. 4, 2003. p. 491-502.

23 – ZHANG, Y.; TADIGADAPA, S. **Calorimetric biosensors with integrated microfluidic channels**. Biosensors and Bioelectronics, n. 19, 2004. p. 1733-1743.

24 – THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. **Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification**. Analytical Letters, n. 34, 2001. p. 635-659.

25 – SHRUTHI, G. S.; AMITHA, C. V.; MATHEW, B. B. **Biosensors: A Modern Day Achievement**. Journal of Instrumentation Technology, v. 2, n. 1, 2014. p. 26-39.

26 – BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica – Princípios, Métodos e Aplicações**. Coimbra: Livraria Almedina, 1996. 471 p.

27 – SILVA, J. J. de B. **Desenvolvimento de Biosensores Eletroquímico e Pizoelétrico de DNA para Diagnósticos Clínicos**. 2004. 114 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

- 28 – PERUMAL, V.; HASHIM, U. **Advances in biosensors: Principle, architecture and applications** – Review Article. *Journal of Applied Biomedicine*, n. 12, 2014. p. 1-15.
- 29 – BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2001. 833 p.
- 30 – BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electroanalysis**. Oxford: chemistry primers, 1998. 88 p.
- 31 – SANTOS, A. R. dos. **Análise por impedância eletroquímica “on-line” de conjuntos eletrodo/membrana (MEA) de células a combustível a membrana polimérica (PEMFC)**. 2007. 147 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 32 – ORAZEM, M. E.; TRIBOLLET, B. **Electrochemical impedance spectroscopy**. Flórida: John Wiley & Sons, Hoboken, 2008.
- 33 – PUTZBACH, W.; RONKAINEN, N. **Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review**. *Sensors*, n. 13, 2013. p. 4811-4840.
- 34 – YANG, C.; DENNO, M. E.; PYAKUREL, P.; VENTON, B. J. **Recent trends in carbon nanomaterial-based electrochemical sensors for biomolecules: A review**. *Analytica Chimica Acta*, n. 887, 2015. p. 17-37.
- 35 – KUMAR, S.; AHLAWAT, W.; KUMAR, R.; DILBAGHI, N. **Graphene, carbon nanotubes, zinc oxide and gold as elite nanomaterials for fabrication of biosensors for healthcare**. *Biosensors and Bioelectronics*, n. 70, 2015. p. 498-503.
- 36 – ALLEN, M.; TUNG, V. C.; KANER, R. B. **Honeycomb Carbon: A review of Graphene**. *Chemical Reviews*, n. 110, 2010. p. 132-145.
- 37 – SHAO, Y.; WANG, J.; WU, H.; LIU, J.; AKSAY, I. A.; LIN, Y. **Graphene Based Electrochemical Sensors and Biosensors: a review**. *Electroanalysis*, vol. 22, n. 10, 2010. p. 1027-1036.
- 38 – NOVOSELOV, K. S.; GEIM, A. K.; MOROZOV, S. V.; JIANG, D.; ZHANG, Y.; DUBONOS, S. V.; GRIGORIEVA, I. V.; FIRSOV, A. A. **Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films**. *Science*, v. 306, n. 5696, 2004. p. 666-669.
- 39 – AMBROSI, A.; CHUA, C. K.; BONANNI, A.; PUMERA, M. **Electrochemistry of Graphene and Related Materials**. *American Chemical Society*, n. 114, 2014. p. 7150-7188.
- 40 – BRODIE, B. C. **On the Atomic Weight of Graphite**. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, v. 149, 1859. p. 249-259.
- 41 – HUMMERS, JR., W. S.; OFFEMAN, R. E. **Preparation os Graphitic Oxide**. *American Chemical Society*, n. 80, 1958. p. 1339.
- 42 – MAO, S.; PU, H.; CHEN, J. **Graphene oxide and its reduction: modeling and experimental progress**. *The Royal Society of Chemistry, Advances*, n. 2, 2012. p. 2643-2662.
- 43 – CHUA, C. K.; PUMERA, M. **Chemical reduction of graphene oxide: a synthetic chemistry viewpoint**. *Chemical Society Reviews*, n. 43, 2014. p. 291-312.

- 44 – BAI, H.; LI, C.; SHI, G. **Functional composite Materials Based on Chemically Converted Graphene**. *Advanced Materials*, n. 23, 2011. p. 1089-1115.
- 45 – DREYER, D. R.; PARK, S.; BIELAWSKI, C. W.; RUOFF, R. S. **The chemistry of graphene oxide**. *Chemical Society Reviews*, n. 39, 2010. p. 228-240.
- 46 – DREYER, D. R.; MURALI, S.; ZHU, Y.; RUOFF, R. S.; BIELAWSKI, C. W. **Reduction of graphite oxide using alcohols**. *Journal of Materials Chemistry*, n. 21, 2011. p. 3443-3447.
- 47 – HOFMANN, U.; KÖNIG, E. **Untersuchungen über Graphitoxyd**. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*, v. 234, 1937. p. 311-336.
- 48 – STANKOVICH, S.; DIKIN, D. A.; PINER, R. D.; KOHLHAAS, K. A.; KLEINHAMMES, A.; JIA, Y.; WU, Y.; NGUYEN, S. T.; RUOFF, R. S. **Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide**. *Carbon*, n. 45, 2007. p. 1558-1565.
- 49 – GAO, H.; DUAN, H. **2D and 3D graphene materials: Preparation and bioelectrochemical applications**. *Biosensors and Bioelectronics*, n. 65, 2015. p. 404-419.
- 50 – GAO, X.; JANG, J.; NAGASE, S. **Hydrazine and Thermal Reduction of Graphene Oxide: Reaction Mechanism, Product, Structures, and Reaction Design**. *Journal of Physical Chemical C*, n. 114, 2010. p. 832-842.
- 51 – RAMESHA, G. K.; KUMARA, A. V.; SAMPATH, M. S. **Graphene and graphene oxide as effective adsorbents toward anionic and cationic dyes**. *Journal of Colloid and Interface Science*, n. 361, 2011. p. 270-277.
- 52 – WU, S.; SHI, T.; ZHANG, L. **Preparation and properties of amine-functionalized reduced graphene oxide/waterborne polyurethane nanocomposites**. *High Performance Polymers*, 2015. p. 1-13.
- 53 – BRUST, M.; KIELY, C. J. **Some recent advances in nanostructure preparation from gold and silver particles: a short topical review**. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, n. 202, 2002. p. 175-186.
- 54 – KURNIAWAN, F.; TSAKOVA, V.; MIRSKYA, V. M. **Gold Nanoparticles in Nonenzymatic Electrochemical Detection of Sugars**. *Electroanalysis*, n. 18, 2006. p. 1937-1942.
- 55 – ISAEVA, E. I.; KIRYUKHINA, S. N.; GORBUNOVA, V. V. **Photochemical synthesis of silver and gold nanoparticles in polyhydric alcohols**. *Russian Journal of General Chemistry*, n. 83, 2013. p. 619-623.
- 56 – RUIYI, L.; QIANFANG, X.; ZAIJUN, L.; SUN, X.; JUNKANG, L. **Electrochemical immunosensor for ultrasensitive detection of microcystin-LR based on graphene-gold nanocomposite/functional conducting polymer/gold nanoparticle/ionic liquid composite film with electrodeposition**. *Biosensors and Bioelectronics*, n. 44, 2013. p. 235-240.
- 57 – ZAIJUN, L.; XIULAN, S.; QIANFANG, X.; RUIYI, L.; YINJUN, F.; SHUPING, Y.; JUNKANG, L. **Green and controllable strategy to fabricate well-dispersed graphene-gold nanocomposite film as sensing materials for the detection of hydroquinone and resorcinol with electrodeposition**. *Electrochimica Acta*, n. 85, 2012. p. 42-48.

- 58 – LIN, X.; NI, Y.; KOKOT, S. **Glassy carbon electrodes modified with gold nanoparticles for the simultaneous determination of three food antioxidants.** *Analytica Chimica Acta*, n. 765, 2013. p. 54-62.
- 59 – MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Introdução a Polímeros.** 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Edgard Blücher Ltda, 2004. 191 p.
- 60 – MARINHO, J. R. D. **Macromoléculas e polímeros.** 1. ed. Barueri: Manole, 2005. 506 p.
- 61 – SANTANA, A. T. de. **Polímeros Condutores: estudos e utilização de polímeros condutores.** 2012. 34 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Graduação de Tecnologia em Polímeros) – Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro.
- 62 – PADILLA, R. M. A. **Estudo de Transporte de Carga de Polímeros de Polianilina.** 2011. 84 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica) – Departamento de Engenharia Elétrica, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- 63 – DEKKER, M. **Handbook of Conducting Polymers.** 3 ed. Skotheim, Terje A.; Reynolds, John R. editores. New York: CRC Press, 1998. 1693 p.
- 64 – MARTINS, P. O. **Síntese, caracterização e aplicação do poli(ácido 3-hidroxifenilacético) no desenvolvimento de biossensor para detecção de marcador cardíaco.** 2011. 97 p. Dissertação (Programa de Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- 65 – CASTRO, A. C. H. de. **Construção de bioeletrodo para detecção da bactéria *Neisseria meningitidis*.** 2012. 70 p. Dissertação (Pós-graduação em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- 66 – FELIPE, A. C. **Eletrossíntese e caracterização de novos materiais derivados de 4-anisidina.** 2011. 83 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- 67 – PANG, Y.; LI, X.; DING, H.; SHI, G.; JIN, L. **Electropolymerization of high quality electrochromic poly(3-alkyl-thiophene)s via a room temperature ionic liquid.** *Electrochimica Acta*, n. 52, 2007. p. 6172-6177.
- 68 – SILVA, T. A. R. da S. **Imobilização e detecção de biomoléculas em matrizes de poli(ácido 4-hidroxifenilacético): aplicações no desenvolvimento de genossensores.** 2008. 88 p. Dissertação (Programa de pós-graduação em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- 69 – GOMES, M. F. **Caracterização estrutural do poli(ácido 4-hidroxifenilacético) eletropolimerizado sobre eletrodo de grafite e sua aplicação no desenvolvimento de imunossensor amperométrico para diagnóstico de Leishmaniose visceral.** 2011. 88 p. Dissertação (Programa de pós-graduação em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- 70 – RODRIGUES, L. P. **Desenvolvimento e caracterização de filmes de poli(ácidos hidroxifenilacéticos) para aplicação na biodetecção de *Neisseria meningitidis* e *Anaplasma marginale*.** 2014. 177 p. Tese (Programa de pós-graduação em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

- 71 – 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, n. 1072, 2014. p. 298-306.
- 72 – 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 and Science, 2008. p. 1963-1970.
- 73 – LUPPA, P. B.; SOKOLL, L. J.; CHAN, D. W. **Immunosensors – principles and application to clinical chemistry**. Clinica Chimica Acta, n. 314, 2001. p. 1-26.
- 74 – WAN, Y.; SU, Y.; ZHU, X.; LIU, G.; FAN, C. **Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics**. Biosensors and Bioelectronics, n. 47, 2013. p. 1-11.
- 75 – SALAM, F.; TOTHILL, I. E. **Detection of *Salmonella typhimurium* using a na electrochemical immunosensor**. Biosensors and Bioelectronics, n. 24, 2009. p. 2630-2636.
- 76 – SAM, S.; TOUAHIR, L.; ANDRESA, J. S.; ALLONGUE, P.; CHAZALVIEL, J.-N.; GOUGET-LAEMMEL, A. C.; VILLENEUVE, C. H. de; MORAILLON, A.; OZANAM, F.; GABOUZE, N.; DJEBBAR, S.; **Semiquantitative Study of the EDC/NHS Activation of Acid Terminal Groups at Modified Porous Silicon Surfaces**. American Chemical Society, n. 26, 2010. p. 809-814.
- 77 – GRABAREK, Z.; GERGELY, J. **Zero-Length Crosslinking Procedure with the Use of Active Esters**. Analytical Biochemistry, n. 185, 1990. p. 131-135.
- 78 – NAKAJIMA, N.; IKADA, Y. **Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media**. Bioconjugate Chemical, n. 6, 1995. p. 123-130.
- 79 – SETFORD, S. J.; NEWMAN, J. D. **Enzyme Biosensors**. In: SETFORD, S. J.; NEWMAN, J. D. Microbial Enzymes and Biotransformations. Barredo, José Luis editor. v. 17. Totowa: Humana Press, 2005. p. 29-60
- 80 – VESTERGAARD, M.; KERMAN, K.; TAMIYA, E. **Na Overview of Label-free Electrochemical Protein Sensors**. Sensors, v. 7, 2007. p. 3442-3458.
- 81 – GIZELI, E.; LOWE, C. **Immunosensors**. Analytical biotechnology, v. 7, 1996. p. 66-71.
- 82 – FOWLER, J. M.; WONG, D. K. Y.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. **Recent developments in electrochemical immunoassays and immunosensors**. In: ZHANG, X.; JU, H.; WANG, J. (Eds.). San Diego: Electrochemical Sensors, Biosensors and Their Biomedical Applications, 2008. p. 115-140.
- 83 – JUSTINO, C. I. L.; DUARTE, A. C.; ROCHA-SANTOS, T. A. P. **Immunosensors in Clinical Laboratory Diagnostics**. In: MAKOWSKI, Gregory S. editor. Advances in Clinical Chemistry. v. 73. 2016. p. 65-108.
- 84 – RONKAINEN-MATSUNO, N. J.; THOMAS, J. H.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. **Electrochemical immunoassay moving into the fast lane**. Trends in analytical chemistry, v. 21, n. 4, 2002. p. 213-226.

- 85 – LOPES, P. D. **Interação Ag-Ac - Testes sorológicos primário e secundário.** Jaboticabal, 2016. 54 slides, color. Acompanha texto. Disponível em: <
<http://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/patologia/HELIOJOSEMONTASSIER/aula-8-interacao-ag-ac-testes-sorologicos-primarios-e-secundarios.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2017.
- 86 – MOTTA, V. T. Aminoácidos e proteínas. In: **Bioquímica básica.** Rio de Janeiro: MedBook, 2005. p. 29-67.
- 87 – BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica.** 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. 1059 p.
- 88 – ABOUL-ENEIN, H. Y.; STEFAN, R.; RADU, G. L.; BAIULESCU, G.. **The construction of na Amperometric Immunosensor for the Thyroid Hormones (+)-3,3',5-Triiodo-L-Thyronine (L-T₃).** Analytical Letters, v. 32, n. 3, 1999. p. 447-455.
- 89 – ABOUL-ENEIN, H. Y.; STEFAN, R.; LIETESCU, 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-Thyroxine (T₄).** Journal Immunoassay & Immunochemistry, v. 23, n. 2, 2002. p. 181-190.
- 90 – STEFAN, R.; STADEN, J. F. van; ABOUL-ENEIN, H. Y. **Simultaneous determination of L-thyroxine (L-T₄), D-thyroxine (D-T₄), and L-triiodothyronine (L-T₃) using a sensor/sequential injection analysis system.** Talanta, n. 64, 2004. p. 151-155.
- 91 – MOLDOVEANU, I.; STADEN, R. S. van; STADEN, J. F. van; RADU, G. L. **Analysis of L-thyroxine and 3,3',5-triiodo-L-thyronine using potentiometric microsensors.** UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science, v. 75, 2014. p. 3-10.
- 92 – SILVA, H. S. da. **Desenvolvimento de um imunossensor para detecção do hormônio tireoideano L-Triiodotironina (L-T₃).** 2017. 106 p. Tese (Programa de pós-graduação em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- 93 – DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia Eletrônica de Varredura: Aplicações e preparação de amostras.** Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. 60 p.
- 94 – MALISKA, A. M. **Microscopia Eletrônica de Varredura.** Santa Catarina, [20--]. 98 p. (Apostila)
- 95 – MANSUR, H. S. Técnicas de caracterização de materiais. In: **Biomateriais.** Belo Horizonte, 2016. 143 p. Disponível em: <
<http://www.biomaterial.com.br/modulomicroscopia2016.html>>. Acesso em: 02 nov. 2015.
- 96 – FERREIRA, A. A. P. **Microscopia de Força atômica aplicada em Imunoensaios.** Química Nova, v. 29, n. 1, 2006. p. 137-142.
- 97 – SILVA, A. C. C. da. **Nanotecnologia em diagnóstico e terapia no Brasil.** 2015. 128 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 98 – FORATO, L. A.; FILHO, R. B.; OSIRO, D.; BICUDO, T. de C.; COLNAGO, L. A. A **espectroscopia na região do Infravermelho e algumas aplicações.** 1. ed. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2010. 14 p.

- 99 – PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. Revisão técnica de Paulo Sergio Santos. Tradução de Pedro Barros. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 700 p.
- 100 – MACHADO, M. E. S. **Análise Térmica Diferencial e Termogravimétrica**. 2008. 21 p.
- 101 – MURASAWA, N.; KOSEKI, H.; LI, X.; IWATA, Y.; SAKAMOTO, T. **Study on Thermal Behaviour and Risk Assessment of Biomass Fuels**. International Journal of Energy Engineering, 2012. p. 242-252.
- 102 – BERNAL, C.; COUTO, A. B.; BREVIGLIERI, S. T.; CAVALHEIRO, É. T. G. **Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais - DSC**. Química Nova, v. 25, n. 5, 2002. p. 849-855.
- 103 – SILVA, J. V.; MADURRO, A. G. B.; MADURRO, J. M. **Metodologia de preparação do composto polimérico formado por óxido de grafeno reduzido e poli (ácido 3-hidroxifenilacético), como matriz para hibridização de oligonucleotídeo**. Patente: Privilégio de Inovação. BR102015028052. 06 nov. 2015, data da publicação do pedido de privilégio. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.
- 104 – SILVA, J. V. **Preparação, caracterização e aplicação da plataforma baseada em óxido de grafeno reduzido e poli(ácido 3-hidroxifenilacético) para diagnóstico do vírus da dengue**. 2017. 115 p. Tese (Programa de pós-graduação em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- 105 – TANG, Z.; ZHANG, L.; ZENG, C.; LIN, T.; GUO, B. **General route to graphene with liquid-like behavior by non-covalent modification**. Soft Matter, n. 8, 2012. p. 9214.
- 106 – YAN, S.; QI, T.; CHEN, D.; LI, Z.; LI, X.; PAN, S. **Magnetic solid phase extraction based on magnetite/reduced graphene oxide nanoparticles for determination of trace isocarbophos residues in different matrices**. Journal of Chromatography A, n. 1347, 2014. p. 30-38.
- 107 – BARBOSA, L. C. de A. **Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: Editora UFV, 2007. 189 p.
- 108 – ZHOU, X.; ZHANG, J.; WU, H.; YANG, H.; ZHANG, J.; GUO, S. **Reducing Graphene Oxide via Hydroxylamine: A Simple and Efficient Route to Graphene**. The Journal of Physical Chemistry C, n. 115, 2011. p. 11957-11961.
- 109 – COTE, L. J.; KIM, F.; HUANG, J. **Langmuir-Blodgett Assembly of Graphite Oxide Single Layers**. Journal American Chemical Society, n. 131, 2009. p. 1043-1049.
- 110 – DIDEYKIN, A.; ALEKSENSKIY, A. E.; KIRILENKO, D.; BRUNKOV, P.; GONCHAROV, V.; BAIDAKOVA, M.; SAKSEEV, D.; VUL', A. YA. **Monolayer graphene from graphite oxide**. Diamond & Related Materials, n. 20, 2011. p. 105-108.
- 111 – PARK, S.; NA, J.; POTTS, J. R.; VELAMAKANNI, A.; MURALI, S.; RUOFF, R. S. **Hydrazine-reduction of graphite- and graphene oxide**. Carbon, n. 49, 2011. p. 3019-3023.
- 112 – SHEN, J.; HU, Y.; SHI, M.; LU, X.; QIN, C.; LI, C.; YE, M. **Fast and Facile Preparation of Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide Nanoplatelets**. Chemistry of Materials, n. 21, 2009. p. 3514-3520.

113 – SILVA, G. T. dos S. T. da. **Estudo da interação entre nanopartículas de ouro, L. Triptofano e organilcalcogênios**. 2015. 75 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química) – Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados.

114 – BECKER D.; TEENDER K. J. **The impedance of fast charge transfer reactions on boron doped diamond electrodes**. *Electrochimica Acta*, n. 49, v. 29, 2003. p. 231-239.

115 – DALMOLIN C. **Preparação e caracterização de eletrodos de polímeros condutores sobre carbono vítreo reticulado (RVC) para aplicação em baterias secundárias**. 2006. Tese (Programa de Pós-Graduação em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos.

116 – WANG, Y.; HUANG, X.; LI, H.; GUO, L. **Sensitive impedimetric DNA biosensor based on (Nb,V) codoped TiO₂ for breast cancer susceptible gene detection**. *Materials Science and Engineering C*, n. 77, 2017. p. 867-873.

117 – CAMPBELL, A. M. **Monoclonal antibody and imunossensor technology**. 1. ed. v. 23. Glasgow: Elsevier Science, 1992. 426 p.

118 – JOHNSON, M. **Antibody Shelf Life/How to Store Antibodies**. Disponível em: <<https://www.labome.com/method/Antibody-Shelf-Life-How-to-Store-Antibodies.html>>. Acesso em: 26 jun. 2017.