

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA – UFU**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**GRADUAÇÃO EM QUÍMICA INDUSTRIAL**

**FERNANDA SILVA SOLER**

**ESTUDO ELETROQUÍMICO E MORFOLÓGICO DO COPOLÍMERO  
POLIANILINA-4-AMINOFENOL PARA DETECÇÃO DO HORMÔNIO  
TRIODOTIRONINA**

**UBERLÂNDIA**

**DEZEMBRO DE 2018**

**FERNANDA SILVA SOLER**

**ESTUDO ELETROQUÍMICO E MORFOLÓGICO DO COPOLÍMERO  
POLIANILINA-4-AMINOFENOL PARA DETECÇÃO DO HORMÔNIO  
TRIIODOTIRONINA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à banca examinadora da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para obtenção do título de bacharel em Química Industrial.

**Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro**  
**Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Graci Brito Madurro**

**UBERLÂNDIA**  
**DEZEMBRO DE 2018**

**FERNANDA SILVA SOLER**

**ESTUDO ELETROQUÍMICO E MORFOLÓGICO DO COPOLÍMERO  
POLIANILINA-4-AMINOFENOL PARA DETECÇÃO DO HORMÔNIO  
TRIODOTIRONINA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à  
Universidade Federal de Uberlândia - UFU,  
como requisito para a obtenção do título de  
Bacharel em Química Industrial.

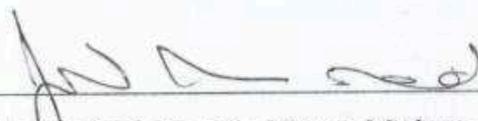
**Banca de avaliação:**



Prof. Dr. João Flávio da Silveira Petrucci  
Universidade Federal de Uberlândia (UFU)



Prof. Dr. Sidnei Gonçalves da Silva  
Universidade Federal de Uberlândia (UFU)



Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro  
Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

**Uberlândia(MG), 14 de dezembro de 2018**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder todos os dias a oportunidade de lutar pelos meus objetivos e principalmente por colocar pessoas especiais na minha vida.

Aos meus pais, Marcia e Rodrigo pelo amor incondicional e por sempre acreditarem em mim, por serem o meu porto seguro e pela infinita paciência que tiveram nos meus dias mais difíceis.

Às minhas irmãs, Lorena e Jéssica, por me inspirarem e me incentivarem a ser melhor a cada dia.

Aos meus amigos, Sheila, Douglas e Érica, pelo companheirismo e por sempre estarem ao meu lado durante esses 4 anos.

A todos os membros da Empresa Júnior de soluções em Química (QuímEJ) e do Movimento Empresa Júnior (MEJ) que proporcionaram em minha vida um crescimento imensurável e que me incentivaram a sempre dar o melhor de mim.

A todos os membros da família LAFIP, em especial à Mônica que sempre esteve ao meu lado, compartilhando comigo todo o seu conhecimento e me ajudando em todo o desenvolvimento do trabalho em questão.

A esta universidade, seu corpo docente, administração e direção que oportunizaram momentos e aprendizagens que me ajudarão e farão de mim uma grande profissional.

Ao meu orientador, João Marcos, que acreditou em mim desde o princípio e me concedeu essa grande oportunidade de aprender e crescer profissionalmente.

A CNPQ pelo fomento a pesquisa.

*“Não importa o que você seja, quem você seja, ou o que deseja na vida, a ousadia em ser diferente reflete na sua personalidade, no seu caráter, naquilo que você é. E é assim que as pessoas lembrarão de você um dia”*

Ayrton Senna

## RESUMO

No Brasil cerca de 15% da população sofre com disfunções na glândula tireoide, apesar da metade desconhecer de tal condição (IBGE). Os hormônios tireoidianos sintetizados pela glândula tireoide são excretados na corrente sanguínea, no entanto, por serem altamente hidrofóbicos, eles circulam ligados a proteínas plasmáticas, tornando-os inativos, dessa forma, a porção livre desses hormônios para atuação no metabolismo das células é muito baixa. Dentre as metodologias que podem ser utilizadas para detecção de distúrbios tireoidianos estão os biossensores, os quais se apresentam como uma alternativa promissora, apresentando a vantagem de um diagnóstico simples, rápido e de baixo custo. Em imunossensores o sucesso da reação imunológica depende da etapa de imobilização da biomolécula sonda, onde o desenvolvimento de copolímeros pode apresentar um diferencial, por meio da combinação das propriedades de diferentes monômeros. Neste trabalho, o copolímero poli(anilina-4-aminofenol) (razão molar 1:1) foi eletropolimerizado sobre a superfície de eletrodos de grafite, utilizando solução monomérica ( $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Polianilina e poli(4-aminofenol) também foram eletropolimerizados nas mesmas condições para comparação. Para a imobilização da biomolécula sonda, visando o desenvolvimento de um biossensor, o anticorpo Anti-T<sub>3</sub> foi incorporado à superfície dos eletrodos modificados com os diferentes filmes poliméricos. Em sequência, os eletrodos modificados contendo a sonda foram colocados em contato com soro contendo o alvo T<sub>3</sub>. Medidas de Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) foram realizadas para detecção das diferentes superfícies, por monitoramento do pico de oxidação de Fe<sup>2+</sup> proveniente do K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>. Foi obtido sucesso na imobilização do anticorpo Anti-T<sub>3</sub>, com a utilização de EDC-NHS, sobre a superfície do copolímero poli(anilina-4-aminofenol), assim como na detecção do alvo T<sub>3</sub> presente no soro, evidenciado pela diminuição da intensidade de corrente de pico de oxidação do Fe<sup>2+</sup> a cada etapa de biofuncionalização, sendo uma redução de 25% na presença da sonda e de 23% após a interação sonda-alvo. Este fato foi bem mais pronunciado sobre o copolímero poli(anilina-4-aminofenol), que apresentou a maior redução de corrente de pico, quando comparado aos demais: polianilina e poli(4-aminofenol) sugerindo que foi imobilizado uma maior quantidade de anti-T<sub>3</sub> na superfície do eletrodo de poli(anilina-4-aminofenol). O efeito sinérgico no copolímero mostrou ser promissor para aplicação do material no diagnóstico quantitativo do alvo T<sub>3</sub> em soro de pacientes, visto que não foi necessária a adição de reagentes de ligação cruzada para promover a imobilização do anticorpo, e de nenhum outro nanomaterial para alcance da concentração do hormônio T<sub>3</sub> na amostra de soro, que normalmente se encontra na ordem de picogramas/mL. A caracterização morfológica do imunossensor apresentou alterações significativas nos valores de rugosidade, concordantes com os estudos eletroquímicos.

Palavras-chave: Triiodotironina – T<sub>3</sub>; Imunossensor; Polianilina; Poli(4-aminofenol); Voltametria cíclica; Copolímero.

## ABSTRACT

In Brazil about 15% of the population suffers from dysfunctions in the thyroid gland, although half are unaware of this condition (IBGE). Thyroid hormones synthesized by the thyroid gland are excreted in the bloodstream, however, because they are highly hydrophobic, they circulate bound to plasma proteins, rendering them inactive, so that the free portion of these hormones for action on the metabolism of the cells is very low. Among the methodologies that can be used to detect thyroid disorders are biosensors, which are presented as a promising alternative, presenting the advantage of a simple, fast and low-cost diagnosis. In immunosensors the success of the immunological reaction depends on the immobilization step of the probe biomolecule, where the development of copolymers may present a differential, by combining the properties of different monomers. In this work, the poly(aniline-4-aminophenol) copolymer (1:1 molar ratio) was electropolymerized on the surface of graphite electrodes using monomeric solution (1,0 mmol L<sup>-1</sup>). Polyaniline and poly(4-aminophenol) were also electropolymerized under the same conditions for comparison. For the immobilization of the biomolecule probe, aiming the development of a biosensor, the Anti-T<sub>3</sub> antibody was incorporated to the surface of the electrodes modified with the different polymeric films. In sequence, the modified electrodes containing the probe were placed in contact with serum containing the T<sub>3</sub> target. Differential Pulse Voltammetry (DPV) measurements were performed to detect the different surfaces by monitoring the Fe<sup>2+</sup> oxidation peak from K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>. Anti-T<sub>3</sub> antibody immobilization with the use of EDC-NHS on the surface of the poly(aniline-4-aminophenol) copolymer, as well as the detection of the T<sub>3</sub> target present in the serum, evidenced by the decrease of the intensity of Fe<sup>2+</sup> oxidation peak current at each biofunctionalization stage, with a 25% reduction in the presence of the probe and 23% after the target probe interaction. This fact was much more pronounced on the poly(aniline-4-aminophenol) copolymer, which presented the greatest reduction of peak current when compared to the others: polyaniline and poly(4-aminophenol) suggesting that a higher amount of anti-T<sub>3</sub> on the surface of the poly(aniline-4-aminophenol) electrode. The synergistic effect on the copolymer was shown to be promising for application of the material in the quantitative diagnosis of the T<sub>3</sub> target in patient serum, since the addition of crosslinking reagents was not required to promote immobilization of the antibody, and no other nanomaterial to reach the target concentration of the hormone T<sub>3</sub> in the serum sample, which is usually in the order of picograms/mL. The morphological characterization of the immunosensor showed significant changes in the roughness values, consistent with the electrochemical studies.

Key words: Triiodothyronine - T<sub>3</sub>; Immunosensors; Polyaniline; Poly(4-aminophenol); Cyclic voltammetry; Copolymer

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-AMF – 4-aminofenol

Anti-T<sub>3</sub> – Anticorpo Anti-hormônio triiodotironina

AFM – Microscópio de força atômica (Atomic Force Microscope)

BIOSENS – Laboratório de Biossensores

DIT – Diodotirosina

EDC – N-etil-N'-(3-(dimetilamino)propil)carbodiimida

EG – Eletrodo de grafite

E<sub>i</sub> – Potencial inicial

HT – Hormônios Tireoidianos

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IP – Corrente de pico (IP<sub>a</sub> para pico anódico e IP<sub>c</sub> para pico catódico)

IV – Infravermelho

MEV – Microscópio Eletrônico de Varredura

NHS – N-hidroxissuccinimida

PAni – Polianilina

Poli(4-AMF) – Polímero do 4-aminofenol

Poli(Ani-4-AMF) – Copolímero Poli(anilina-4-aminofenol)

R<sub>ct</sub> – Resistência à transferência de carga

R<sub>s</sub> – Resistência da solução

T<sub>3</sub> – Hormônio triiodotironina (3,5,3'-triiodo-L-tironina)

T<sub>4</sub> – Hormônio tiroxina (3,5,3',5'-tetraiodo-L-tiroxina)

VC – Voltametria Cíclica

VPD – Voltametria de Pulso Diferencial

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b> Configuração esquemática dos componentes básicos de um biossensor.....	14
<b>Figura 2-</b> Representação estrutural da triiodotironina ou 3,5,3'-triiodo-L-tironina (T <sub>3</sub> ) e da tiroxina ou 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina (T <sub>4</sub> ). ....	16
<b>Figura 3-</b> Representação básica da ativação das células alvos por hormônios tireoidianos....	17
<b>Figura 4-</b> Classificação dos biossensores de acordo com o elemento biológico sensível. ....	19
<b>Figura 5-</b> Estrutura de alguns polímeros condutores.....	20
<b>Figura 6-</b> Estrutura molecular da polianilina.....	22
<b>Figura 7-</b> Diferentes formas da anilina.....	22
<b>Figura 8-</b> Formação do cátion radical e suas estruturas de ressonância. ....	23
<b>Figura 9-</b> Mecanismo de polimerização oxidativa da anilina.....	24
<b>Figura 10-</b> Reação de eletrooxidação do poli(4-AMF). ....	25
<b>Figura 11-</b> Classificação dos copolímeros.....	26
<b>Figura 12-</b> Potenciostato CH Instruments modelo 760C.....	32
<b>Figura 13-</b> Modelo da célula eletroquímica de três compartimentos. ....	32
<b>Figura 14-</b> Eletrodo auxiliar de platina (b) e eletrodo de referência de Ag/AgCl (a). ....	33
<b>Figura 15-</b> Representação esquemática das etapas de preparação dos eletrodos de grafite. ...	33
<b>Figura 16-</b> Eletrodos de grafite devidamente preparados acoplados a uma base condutora de latão. ....	34
<b>Figura 17-</b> Esquema representativo da modificação do EG com os filmes polimérico. ....	36
<b>Figura 18-</b> Espectrofotômetro FT-IR Frontier Single Range - MIR da PerkinElmer. ....	37
<b>Figura 19-</b> MEV Tescan modelo Vega3 LMU (a) e revestidor de pulverização Quorum 150 R (b).....	38
<b>Figura 20-</b> AFM Shimadzu modelo SPM 9600.....	38
<b>Figura 21-</b> Esquema representativo geral das etapas de preparação do imunossensor para diagnóstico do hormônio tireoidiano T <sub>3</sub> com EG modificado.....	39
<b>Figura 22-</b> Esquema representativo das etapas de preparação do imunossensor para diagnóstico do hormônio tireoidiano T <sub>3</sub> , com o EG modificado com o copolímero na presença do EDC-NHS.....	40
<b>Figura 23-</b> Exemplos de voltamogramas cíclicos ideais dos eletrodos de grafite em solução de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,1 mol L <sup>-1</sup> ), velocidade de varredura de 50 mV s <sup>-1</sup> . ....	42
<b>Figura 24-</b> Eletropolimerização de poli(4-aminofenol) (a) polianilina (b) e poli(anilina-4-aminofenol)(c) por VC em meio de ácido sulfúrico 0,1 mol L <sup>-1</sup> e 10 ciclos de varredura na faixa de potencial de -0,1 a +1,2 V, 20 ciclos e velocidade de varredura de 50 mV s <sup>-1</sup> . ....	43
<b>Figura 25-</b> Voltamogramas cíclicos em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 mol L <sup>-1</sup> , 50mV s <sup>-1</sup> dos eletrodos de grafite modificados com poli(4-aminofenol) (1,0 mmol L <sup>-1</sup> ), polianilina (1,0 mmol L <sup>-1</sup> ) e poli(anilina-4-aminofenol) proporção molar 1:1 (1,0 mmol L <sup>-1</sup> ). ....	44
<b>Figura 26-</b> Últimos ciclos de voltametria dos EG contendo os filmes polianilina, poli(4-aminofenol) e poli(anilina-4-aminofenol), em solução de K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> /K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> 5,0 mmol L <sup>-1</sup> em meio de KCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> , 50 mV s <sup>-1</sup> . ....	45
<b>Figura 27-</b> Espectro de infravermelho para polianilina (a) poli(4-aminofenol) (b) copolímero (c) poli(anilina-4-aminofenol). ....	46
<b>Figura 28-</b> Espectros da polianilina (a) e do poli(4-aminofenol) (b). ....	49

<b>Figura 29-</b> Imagens de AFM para EG (a) poli(4-aminofenol) (b), polianilina (c) e para o copolímero (d). .....	50
<b>Figura 30-</b> Imagens de MEV com ampliações de 10.000 e 30.000 vezes para EG/poli(4-aminofenol) (a), EG/polianilina (b) e EG/poli(anilina-4-aminofenol) (c).....	52
<b>Figura 31-</b> Comportamento eletroquímico de EG/poli(4-aminofenol) (a), EG/polianilina (b) e EG/poli(anilina-4-aminofenol) (c) frente as etapas de imobilização da sonda e interação sonda-alvo, obtidos por VPD em solução de $K_4Fe(CN)_6$ 5,0 mmol L <sup>-1</sup> em meio de KCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> , com velocidade de varredura de 20 mV s <sup>-1</sup> . .....	53
<b>Figura 32-</b> Voltamogramas obtidos por VPD em $K_4Fe(CN)_6$ 5,0 mmol L <sup>-1</sup> em meio de KCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> , de EG/poli(anilina-4-aminofenol) submetido a interação com alvo T <sub>3</sub> presente em soro na ausência da molécula sonda (a) e de EG/poli(anilina-4-aminofenol) submetido a imobilização da sonda utilizando solução equimolar de EDC-NHS (5 mmol L <sup>-1</sup> ) (b).....	55
<b>Figura 33-</b> Imagens de AFM para EG/copolímero (a), EG/ EG/copolímero/sonda (b), EG/copolímero/sonda/glicina (c), EG/copolímero/alvo (com bloqueio) (d).....	56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Atribuições das principais absorções do espectro da polianilina. ....	47
<b>Tabela 2-</b> Atribuições das principais absorções do espectro do poli(4-aminofenol).....	47
<b>Tabela 3-</b> Atribuições das principais absorções do espectro do copolímero poli(anilina-4-aminofenol).....	48
<b>Tabela 4-</b> Valores de altura média (Rz), rugosidade média (Ra) e rugosidade média quadrática (Rq) dos eletrodos analisados por AFM. ....	51
<b>Tabela 5-</b> Valores de altura média (Rz), rugosidade média (Ra) e rugosidade média quadrática (Rq), obtidos por AFM dos eletrodos analisados em cada etapa de construção do imunossensor. ....	57

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1. Hormônios Tireoidianos</b> .....	15
<b>1.2. Biossensores</b> .....	18
<b>1.3. Polímeros</b> .....	20
1.3.1. Polianilina .....	21
1.3.2. Poli (4-aminofenol) .....	24
1.3.3. Copolímeros .....	26
<b>1.4. Eletrodos quimicamente modificados</b> .....	27
<b>1.5. Imunossensores eletroquímicos</b> .....	28
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	29
<b>2.1. Objetivos específicos</b> .....	29
<b>3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	29
<b>3.1. Soluções preparadas para o desenvolvimento do trabalho</b> .....	29
<b>3.2. Materiais e equipamentos utilizados para o desenvolvimento do trabalho</b> .....	30
<b>3.3. Métodos</b> .....	31
3.3.1. Preparação dos eletrodos utilizados e da célula eletroquímica .....	31
3.3.2. Seleção dos eletrodos de grafite .....	34
3.3.3. Eletropolimerização da polianilina .....	35
3.3.4. Eletropolimerização do poli(4-aminofenol) .....	35
3.3.5. Eletropolimerização do copolímero .....	35
3.3.6. Caracterização eletroquímica do copolímero poli(anilina-4-aminofenol) e dos polímeros polianilina e poli(4-aminofenol) .....	36
3.3.7. Caracterizações estruturais e morfológicas do copolímero poli(anilina-4-aminofenol) e dos filmes polianilina e poli(4-aminofenol) .....	37
3.3.8. Imobilização das biomoléculas na superfície do eletrodo modificado com o copolímero poli(anilina-4-aminofenol) e com os polímeros polianilina e poli(4-aminofenol) para a construção do imunossensor. ....	38
3.3.9. Caracterização eletroquímica do imunossensor .....	41
3.3.10. Caracterização morfológica das etapas de construção do imunossensor .....	41
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	41
<b>4.1. Seleção dos eletrodos de grafite</b> .....	41
<b>4.2. Caracterização eletroquímica do copolímero poli(anilina-4-aminofenol) e dos polímeros polianilina e poli(4-aminofenol)</b> .....	42

<b>4.3. Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho (IV) do Copolímero poli(anilina-4-aminofenol) e dos filmes polianilina e poli(4-aminofenol).</b> .....	45
<b>4.4. Microscopia de Força Atômica (AFM) e Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do copolímero poli(anilina-1-aminofenol) e dos filmes polianilina e poli(4-aminofenol)</b> .....	50
<b>4.5. Caracterização eletroquímica do imunossensor</b> .....	53
<b>4.6. Microscopia de Força Atômica (AFM) das etapas de construção do imunossensor</b> .....	56
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	57
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	59

## 1. INTRODUÇÃO

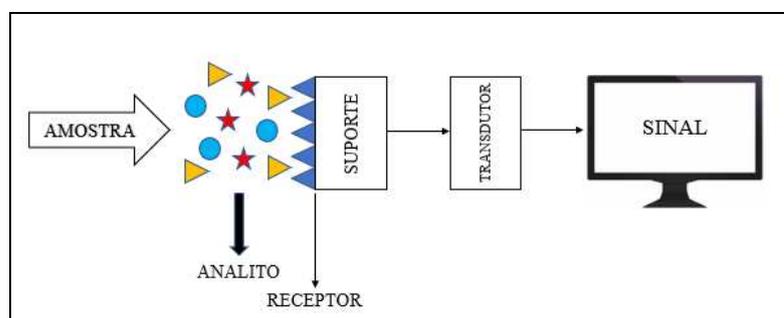
O desenvolvimento de sensores vem sendo estudado para aplicações em diversas áreas, podendo-se destacar a sua utilização na medicina, em diagnósticos de distúrbios em evolução; em questões ambientais, para detecção de poluentes como pesticidas, compostos fenólicos, metais pesados, entre outras áreas (RIBOVSK, 2015).

Atualmente, tem-se uma ampla comercialização de alguns desses dispositivos, como por exemplo, sensores para o monitoramento do nível de glicose no sangue, principalmente por pacientes diabéticos e, sensores para medição da quantidade do hormônio gonadotrofina coriônica humano (do inglês *Human Chorionic Gonadotropin* - HCG) na urina, utilizado no teste de gravidez (PAULI, 2014).

Tais dispositivos apresentam algumas vantagens, como a possibilidade de construção de sistemas miniaturizados, a utilização de frações reduzidas de amostras para análises, baixo custo de produção, além de permitirem análises com alta sensibilidade e especificidade (CECCHETTO, 2014).

Os sensores são dispositivos analíticos capazes de converter uma resposta de um analito presente na amostra em um sinal analítico mensurável. Quando o receptor é um elemento biológico, tais como anticorpos, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, organelas e células, onde o processo bioquímico é a fonte do sinal analítico, os sensores são definidos como biossensores (SEGATTO, 2017). A configuração esquemática de um biossensor está ilustrada na Figura 1.

**Figura 1-** Configuração esquemática dos componentes básicos de um biossensor.



FONTE: AUTORA, 2018

Como observado na Figura 1, os biossensores são dispositivos constituídos por um elemento de biorreconhecimento (receptor), 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 transdutor físico-químico, capaz de transformar o sinal produzido pela interação biológica em um sinal elétrico, determinando conseqüentemente a presença, atividade e concentração do analito de interesse; e um sistema de saída, que fornece uma resposta analítica útil (SEGATTO, 2017).

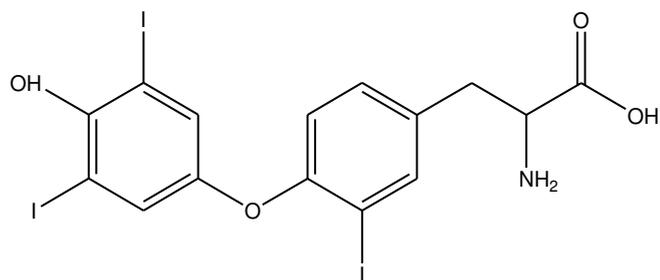
Portanto, sabendo-se da ampla aplicação dos biossensores eletroquímicos na medicina, como por exemplo, no diagnóstico de tuberculose, malária, HIV, câncer, doenças cardíacas, e, devido as suas características de baixo custo de fabricação, detecção rápida e fácil (RIBOVSK, 2015), a elaboração de um biossensor para detecção de distúrbios tireoidianos surge como uma alternativa promissora, pois a confecção do mesmo, modificando a superfície do eletrodo com o copolímero poli(anilina-4-aminofenol), pode levar ao aumento da sensibilidade e um ambiente favorável para a imobilização de biomoléculas.

Conhecendo-se tais vantagens e o mecanismo de funcionamento desses sistemas, este trabalho teve como enfoque a caracterização eletroquímica e morfológica do copolímero poli(anilina-4-aminofenol) e a construção de uma plataforma de imunossensor para a detecção do hormônio da tireoide triiodotironina ( $T_3$ ). Esta plataforma é baseada na utilização do copolímero poli(anilina-4-aminofenol) sobre eletrodo de grafite, que serviu como matriz para a imobilização do anticorpo específico anti-triiodotironina (anti- $T_3$ ). As técnicas eletroquímicas utilizadas para o desenvolvimento desse trabalho foram voltametria cíclica (VC) e voltametria de pulso diferencial (VPD).

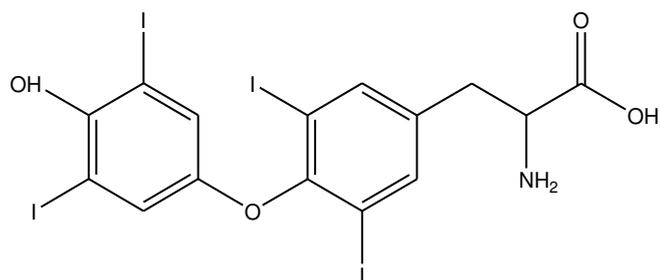
### **1.1. Hormônios Tireoidianos**

Os hormônios tireoidianos (HT) desempenham a importante função de manter o metabolismo funcionando de forma regular em todos os vertebrados, sendo crucial nas etapas do crescimento e desenvolvimento do organismo (MESSIAS *et al.*, 1999). O pró-hormônio tiroxina ou 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina ( $T_4$ ) é sintetizado e secretado pela glândula tireoide junto com uma pequena quantidade do hormônio ativo, a triiodotironina ou 3,5,3'-triiodo-L-tironina ( $T_3$ ) (WAJNER *et al.*, 2008), cujas fórmulas estruturais estão apresentadas na Figura 2.

**Figura 2-** Representação estrutural da triiodotironina ou 3,5,3'-triiodo-L-tironina (T<sub>3</sub>) e da tiroxina ou 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina (T<sub>4</sub>).



**3,5,3'-Triiodotironina (T<sub>3</sub>)**



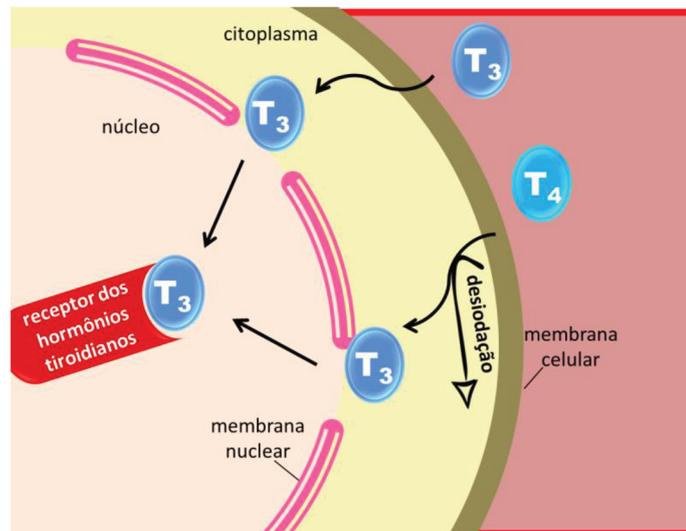
**Tiroxina (T<sub>4</sub>)**

FONTE: SEGATTO, 2017

O iodo é essencial na síntese desses hormônios, sendo quatro átomos de iodo por molécula de T<sub>4</sub>, correspondendo 66% de sua massa molar e, três átomos de iodo por molécula de T<sub>3</sub>, equivalente a 58% de sua massa molar, como observado na Figura 2. O iodo é obtido por meio de dieta, sendo absorvido no trato gastrointestinal na forma de iodeto (I<sup>-</sup>) para o sangue, sendo capturado pela glândula tireoide, uma das maiores glândulas do sistema endócrino (LUNARDELLI, 2007).

Apesar de T<sub>4</sub> ser produzido e secretado em quantidade significativamente maior que T<sub>3</sub>, o responsável pela maioria, ou até mesmo todas as funções tireoidianas no organismo é o T<sub>3</sub>, devido a maior afinidade dos receptores celulares a ele. Além disso, as proteínas plasmáticas se ligam a T<sub>4</sub> mais fixamente que em T<sub>3</sub>. Acredita-se que o T<sub>4</sub> sofre uma desiodação para a forma de T<sub>3</sub> ao entrar em contato com os receptores celulares presentes nos tecidos-alvo (Figura 3), ou até mesmo durante o processo de transporte pelo sangue (CARRAZZA, 2012).

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



FONTE: SEGATTO, 2017

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no Brasil cerca de 15% da população sofre com disfunções na glândula tireoide, como por exemplo, tireotoxicose autoimune, Cretinismo - hipotireoidismo na criança, Mixedema - hipotireoidismo no adulto, Tiroidite de Hashimoto - hipotireoidismo autoimune, Bócio, Tumores da tireoide, neoplasias e cânceros da tireoide, apesar da metade desconhecer tal condição. Dentre as diversas disfunções causadas quando os hormônios tireoidianos encontram-se em níveis alterados, pode-se destacar o hipotireoidismo e o hipertireoidismo.

O hipotireoidismo resulta da deficiência de iodo, gerando a reprodução diminuída dos hormônios tireoidianos e levando a manifestações clínicas características de insuficiência da glândula tireoide, tais como, baixo índice metabólico, intolerância ao frio, fraqueza muscular, fadiga e depressão. Já o hipertireoidismo é caracterizado pela secreção aumentada dos hormônios da tireoide e que não se encontra mais sob o controle regulador dos centros hipotalâmicos e hipofisários, levando as manifestações clínicas de um estado hipermetabólico, tais como perda de peso, fraqueza muscular, irritabilidade, ansiedade, tremores e distúrbios do sono (LUNARDELLI, 2007).

O método mais utilizado para o diagnóstico de  $T_{3(Livre)}$ , empregando marcadores, geralmente o  $I^{125}$ , é o enzima-imuno-fluorimétrico ou quimiluminescência, onde os níveis normais de L-triiodotironina ( $T_3$ ) estão na faixa de 80 a 200 ng/100ml. Este método é muito utilizado devido à alta sensibilidade, porém demanda aquisição de aparelhos de alto custo e pessoal especializado. Nos laboratórios, os exames clínicos devem ser altamente específicos e

sensíveis para a forma livre, que apresenta uma faixa de concentração de 2,30 a 3,90  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de soro, em pacientes adultos com funcionamento normal da glândula tireoide (LARSEN *et al.*, 2010), porém, como a quantidade de  $T_{3(\text{Livre})}$  no sangue é baixa se comparada à quantidade de  $T_3$  ligado a proteínas plasmáticas, é problemático garantir o equilíbrio  $T_{3(\text{Livre})}/T_{3(\text{Ligados a proteínas})}$  e minimizar a diluição dos soros de pacientes, fazendo com que os resultados obtidos dos imunoenaios sejam, ainda, muito suscetíveis às variações, gerando resultados falso-positivo quando em soros de pacientes que não apresentam disfunções tireoidianas, mas tem a presença de certos fármacos, níveis elevados de ácidos graxos, anticorpos heterófilos ou inibidores de ligação hormonal. (GOUVEIA *et al.*, 2016).

Dessa forma, o desenvolvimento de técnicas de dosagem específicas, envolvendo sensores torna-se promissor para a utilização e comercialização dos mesmos para o diagnóstico de  $T_{3(\text{livre})}$  de forma rápida e fácil, já que 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 deve ser rápida e pequeno volume de amostras é requerido, não demandando pessoal especializado (TYMECKI *et al.*, 2006, CHEN *et al.*, 2005, LI *et al.*, 2005).

## 1.2. Biossensores

Os biossensores são dispositivos que utilizam reações biológicas para detecção de analitos-alvo (WANG, 2000). Tais dispositivos combinam um componente biológico, que interage com um substrato alvo, a um transdutor físico, que converte os processos de biorreconhecimento em sinais mensuráveis (WANG, 2000; PATHAK *et al.*, 2007).

Os biossensores são construídos a partir de um componente que introduz a amostra, um sistema de reconhecimento molecular, um transdutor e uma unidade processadora de sinal, conforme apresentado na Figura 1 (LEE *et al.*, 2008).

Desta forma, o receptor é responsável pelo reconhecimento do analito e também pela especificidade e sensibilidade do biossensor. Já o transdutor é o elemento que percebe as alterações causadas pela interação entre o receptor biológico e seu analito e as converte num sinal analiticamente mensurável, ou seja, que pode ser eletronicamente visualizado, amplificado e armazenado (CASTILLO *et al.*, 2004; MEHRVAR, 2004).

O elemento biológico de reconhecimento deve apresentar uma elevada especificidade, estabilidade em condições normais de armazenamento e ensaios com pequena ou nenhuma alteração entre si (RIBOVSK, 2015).

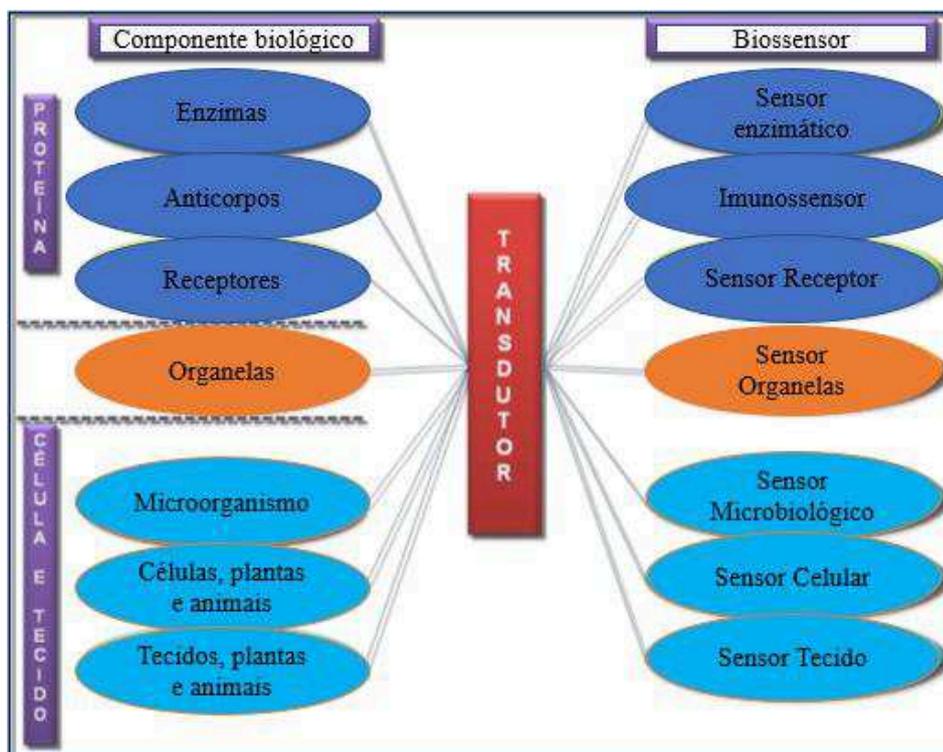
Segue algumas das exigências da escolha de um biocomponente para atuar como elemento de reconhecimento biológico:

- Disponibilidade de um sítio reativo que possa reagir/interagir com o analito;
- Estabilidade frente ao meio e às condições de medição;
- Possibilidade de modificação/imobilização sobre suporte por métodos químicos sem afetar o seu desempenho.

Alguns biocomponentes são adequados para o uso na composição dos biossensores, entre eles: enzimas, cofatores, receptores, anticorpos, células de micro-organismos, organelas e tecidos (vegetais, animais e fúngicos) (SILVA, 2011).

Assim, de acordo com o elemento biológico utilizado para a sua construção, os biossensores podem ser divididos em várias classes (Figura 4). Dentre elas, as classes mais desenvolvidas são: biossensores enzimáticos, microbiológicos, os quimiorreceptores e os imunossensores.

**Figura 4-** Classificação dos biossensores de acordo com o elemento biológico sensível.



FONTE: SILVA, 2011

Como observado na Figura 4, um exemplo de biossensores são os imunossensores. Estes dispositivos, desenvolvidos no presente trabalho, são capazes de detectar a interação entre um antígeno e um anticorpo e cujo sucesso da reação imunológica depende da etapa de imobilização da biomolécula sonda, onde o desenvolvimento de copolímeros pode apresentar um diferencial, por meio da combinação das características de diferentes monômeros (MARQUES, 2013).

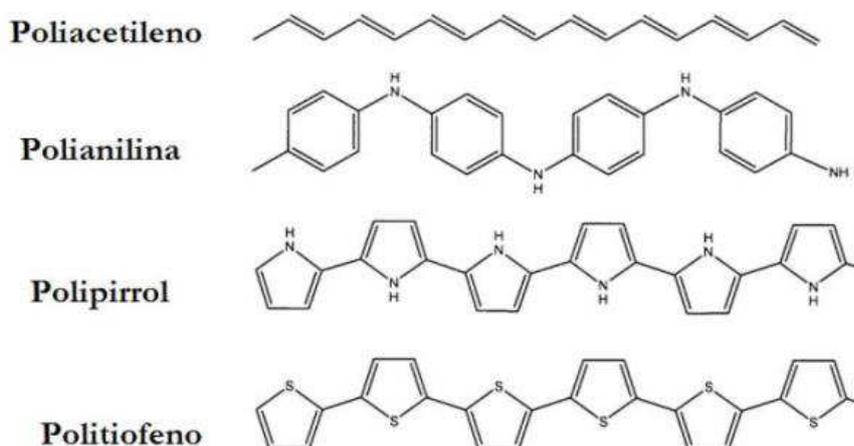
### 1.3. Polímeros

Polímeros consistem de cadeias longas formadas pela repetição de unidades mais simples, chamadas monômeros. Estes polímeros são em geral materiais orgânicos, conhecidos principalmente por serem excelentes isolantes térmicos e elétricos. No entanto, uma nova área de polímeros orgânicos tem sido desenvolvida, cuja importância está relacionada à possibilidade de conduzir corrente elétrica (ROCHA, 2000)

Os polímeros condutores são formados por cadeias contendo duplas ligações, permitindo assim o fluxo de elétrons em condições específicas de dopagem. Esse fluxo de elétrons pode ser considerado como resultado de defeitos estruturais na cadeia polimérica, originados durante o processo de polimerização. Assim, os polímeros condutores apresentam propriedades elétricas, magnéticas e ópticas semelhantes às propriedades dos semicondutores e até mesmo de alguns metais, sendo capazes de conduzir eletricidade (AUGUSTO, 2009).

Entre os polímeros condutores mais conhecidos destacam-se o poliacetileno, o polipirrol, o politiofeno e a polianilina, cujas estruturas estão representadas na Figura 5.

**Figura 5-** Estrutura de alguns polímeros condutores.



FONTE: AUGUSTO, 2009

Estes polímeros podem combinar as propriedades mecânicas e de processabilidade dos polímeros convencionais com um comportamento elétrico, óptico e magnético semelhante ao dos metais e semicondutores inorgânicos. Esta característica faz com que estes materiais se enquadrem na categoria dos chamados “metais sintéticos” que possuem diversas aplicações tecnológicas, como em baterias recarregáveis, dispositivos eletrônicos, sensores químicos e térmicos, biossensores, janelas inteligentes, díodos emissores de luz, eliminação de carga estática em microeletrônica, proteção contra corrosão e recobrimento de materiais (REZENDE *et al.*, 2000).

Dessa forma, assim como os biossensores, os polímeros conjugados têm atraído muito interesse como matriz para imobilização de biomoléculas, pois podem servir como intermediários nos processos de interação entre o receptor e o analito e na transdução do sinal, com o objetivo de melhorar o tempo de resposta, a sensibilidade e o limite de detecção de biossensores para diversas aplicações, que vão desde o diagnóstico de doenças até determinação de contaminantes em água (FERREIRA *et al.*, 2014).

Polímeros condutores elétricos também apresentam grande versatilidade em sua estrutura química. Por meio de modelagem química e novas rotas de síntese, alguns grupos de pesquisa vêm reportando a possibilidade de se modular as propriedades eletrônicas e mecânicas dessa classe de materiais poliméricos (DEEPSHIKHA, 2011). Outra vantagem atribuída aos polímeros conjugados reside na possibilidade de sua síntese eletroquímica permitir a imobilização de biomoléculas de forma simples na superfície do eletrodo (COSNIER, 2003). Com isso é possível o controle da distribuição espacial das biomoléculas imobilizadas, a espessura do filme e a manutenção da orientação da biomolécula pela modificação nas propriedades do polímero.

### 1.3.1. Polianilina

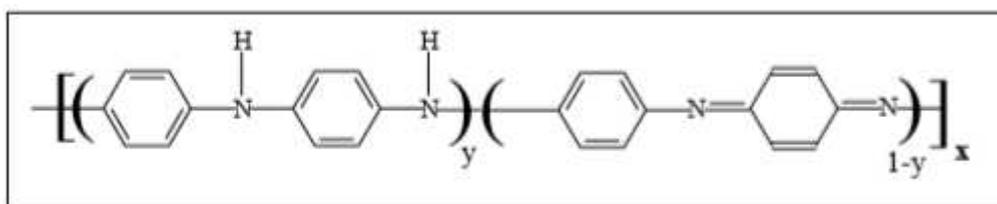
A polianilina (PANI) é um dos polímeros condutores mais promissores para aplicações e, portanto, um dos compostos mais estudados. Foi sintetizado pela primeira vez por Lethby em 1862, por meio da oxidação eletroquímica da anilina em meio de ácido sulfúrico (SYED *et al.*, 1991).

Este especial interesse, se deve por sua forma dopada possuir excelente estabilidade química combinada com níveis altos de condutividade elétrica que podem ser controlados, e

seu monômero, anilina é relativamente de baixo custo com polimerização a partir de uma reação direta de alto rendimento (PRON *et al.*, 2002)

As polianilinas representam uma classe de polímeros, cuja composição é dada por  $y$  e  $(y-1)$  unidades repetitivas das espécies reduzidas e oxidadas respectivamente, como observado na Figura 6.

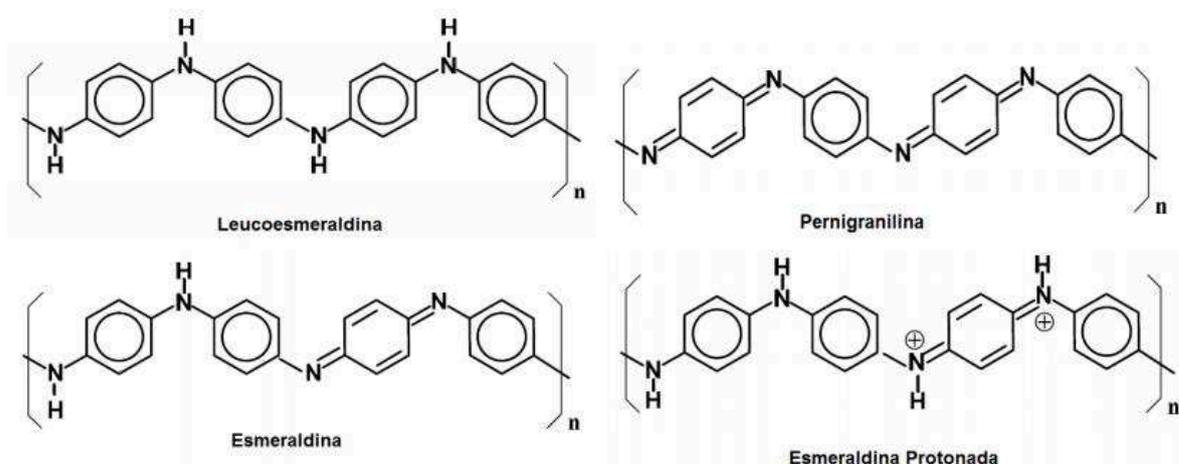
**Figura 6-** Estrutura molecular da polianilina.



FONTE: MATTOSO, 1996

O valor de  $y$  pode variar continuamente entre 1 para o polímero completamente reduzido (contendo somente nitrogênios amina) e zero no caso do polímero completamente oxidado (contendo somente nitrogênios imina). Os diferentes graus de oxidação da polianilina são designados pelos termos leucoesmeraldina, protoesmeraldina, esmeraldina, nigranilina e pernigranilina quando  $y$  for igual a 1; 0,75; 0,5; 0,25 e 0 respectivamente (Figura 7) (MATTOSO, 1996).

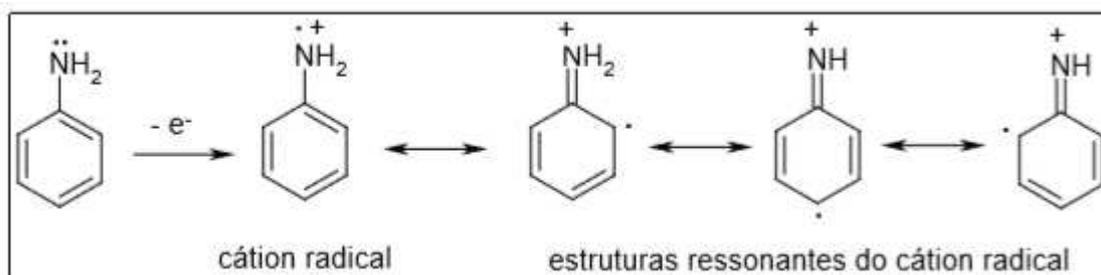
**Figura 7-** Diferentes formas da anilina.



FONTE: MATTOSO, 1996

A primeira etapa de polimerização envolve a oxidação da anilina formando o cátion radical (cátion nitrenium) pela transferência de elétrons do nível de valência do átomo de nitrogênio da anilina, sendo independente do pH do meio. O cátion radical da anilina possui três formas de ressonância, porém a forma com o elétron na posição *para* é a mais reativa devido ao efeito indutivo no substituinte e à ausência de impedimento estérico. A Figura 8 mostra a formação do cátion radical e suas estruturas de ressonância.

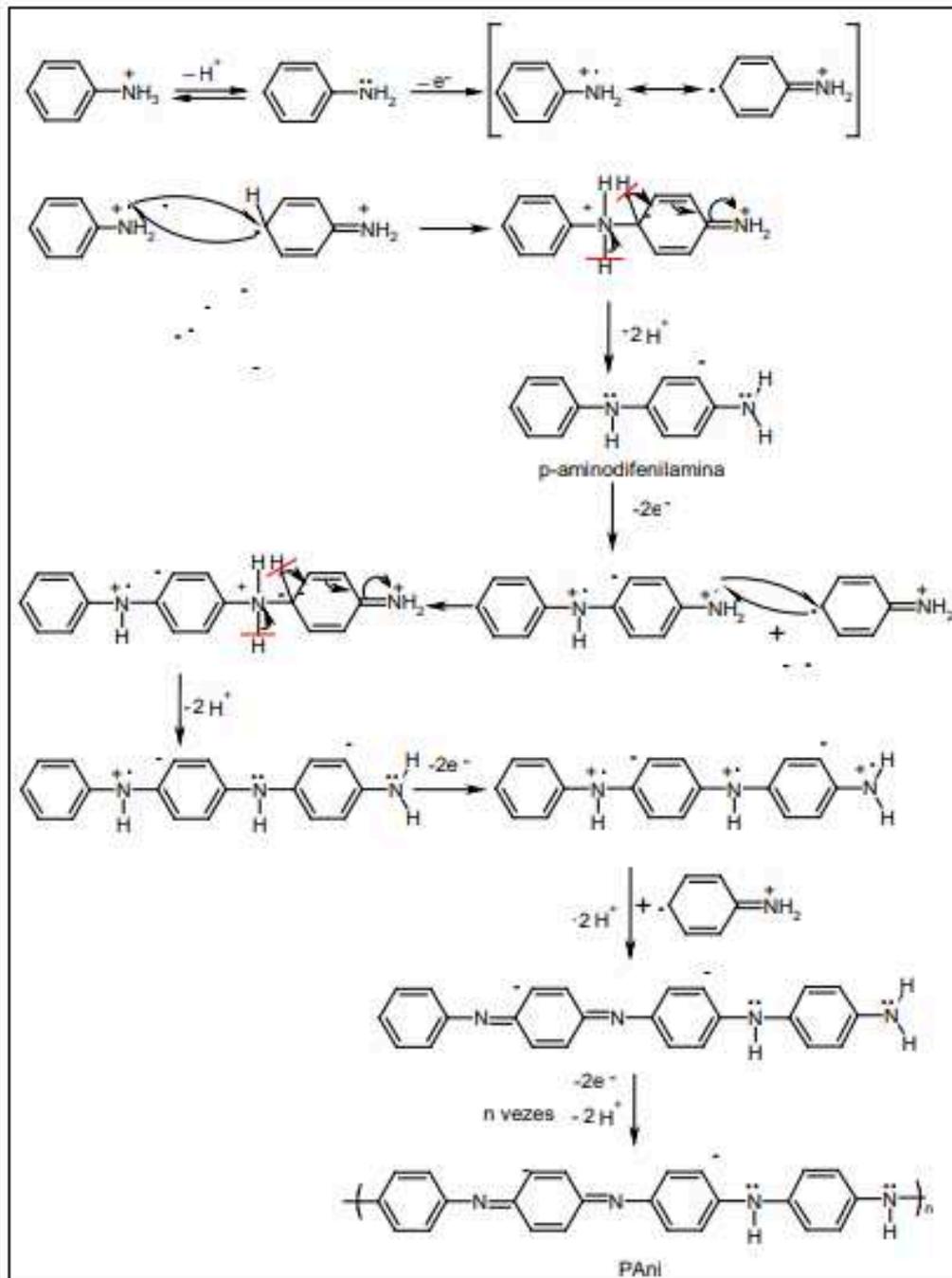
**Figura 8-** Formação do cátion radical e suas estruturas de ressonância.



FONTE: RATES, 2006

Na sequência do mecanismo de reação o dímero formado sofre oxidação e forma um novo cátion radical que pode reagir tanto com um monômero cátion radical ou com um dímero cátion radical para formar respectivamente um trímero ou um tetrâmero. O mecanismo geral de polimerização oxidativa da anilina está representado na Figura 9.

**Figura 9-** Mecanismo de polimerização oxidativa da anilina.



FONTE: RATES, 2006

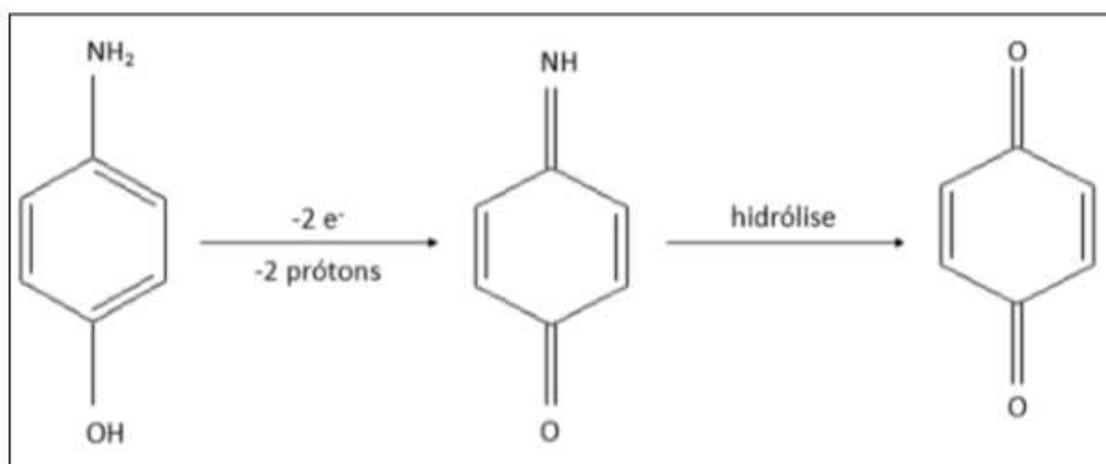
### 1.3.2. Poli (4-aminofenol)

Os aminofenóis (AMF) são compostos interessantes por apresentarem dois grupos substituintes diferentes ( $-\text{NH}_2$  e  $-\text{OH}$ ) expostos em sua estrutura aromática, que podem servir como sítios de ligação de biomoléculas (VIEIRA *et al.*, 2006). Durante o processo de síntese

de polímeros, os monômeros são oxidados para formarem cátions e, em seguida, reagem formando oligômeros que se depositam na superfície do eletrodo na forma de polímero.

A eletro-oxidação do 4-aminofenol (4-AMF) de acordo com Hawley e Adams (HAWLEY *et al.*, 1965), envolve a saída de dois elétrons e dois prótons, produzindo a 4-benzoquinona (Figura 10). Os autores sugerem também que uma segunda reação química entre 4-benzoquinona e 4-AMF se torna importante a medida que o valor de pH aumenta, fazendo possível a ocorrência da reação de acoplamento 1,4 e a geração de filme sobre a superfície do eletrodo.

**Figura 10-** Reação de eletrooxidação do poli(4-AMF).



FONTE: AUTORA, 2018

Um fator interessante relatado sobre alguns polímeros eletroativos é a influência do meio reacional em sua resposta eletroquímica, devido a diferença na protonação dos grupos -OH e -NH<sub>2</sub> influenciado pelo pH, podendo ser obtidos diferentes filmes poliméricos na superfície do eletrodo.

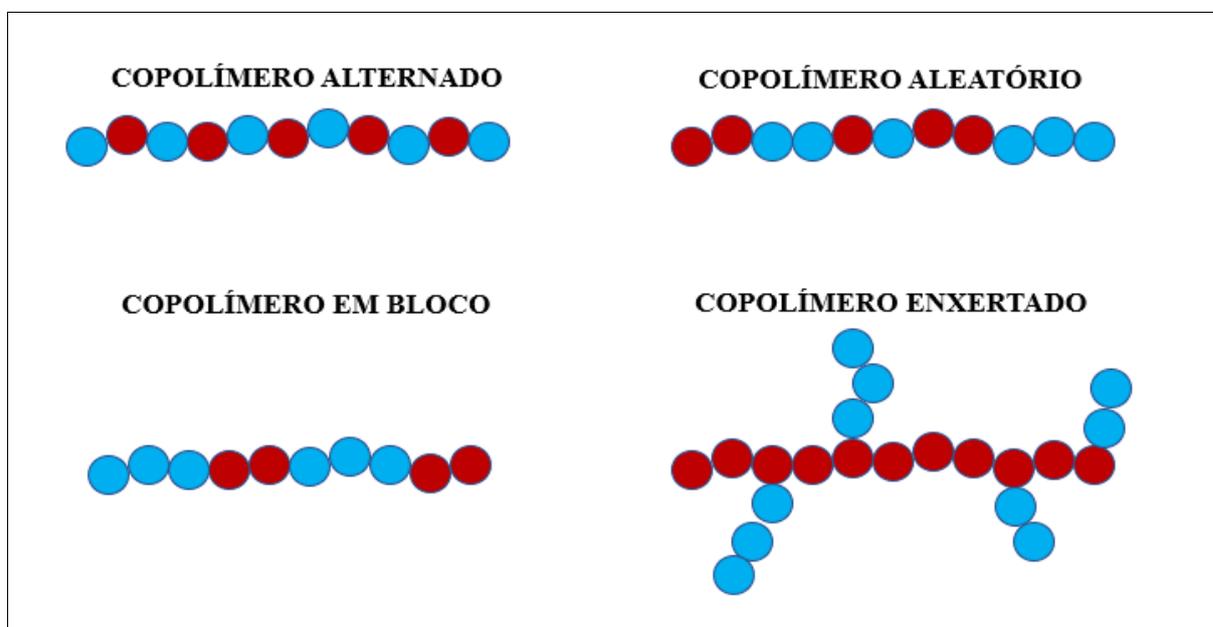
Estudos demonstraram que o polímero formado em meio ácido é eficiente na imobilização e detecção de material genético, sugerindo uma plataforma para a construção de biossensores de DNA. Nesse sentido, a combinação do monômero 4-AMF com a anilina para o presente estudo se mostra bastante promissor, dando origem ao copolímero poli(anilina-4-aminofenol) (CASTRO *et al.*, 2014).

### 1.3.3. Copolímeros

Os polímeros que contêm apenas uma unidade monomérica são chamados de homopolímeros, por exemplo, o PEG (polietileno glicol), enquanto os que contêm duas ou mais unidades monoméricas diferentes são conhecidos como copolímeros (MAURANO *et al.*, 1998).

De acordo com a disposição de seus monômeros, os copolímeros podem ser divididos em quatro classes: em bloco, alternado, aleatório, e enxertado (YOKOYAMA, 1992), como mostra a Figura 11.

**Figura 11-** Classificação dos copolímeros.



FONTE: ADAPTADO YOKOYAMA, 1992

Nos copolímeros, cada arranjo dos monômeros, juntamente com a natureza dos mesmos, conferem propriedades e características que atendem as condições desejadas. Assim, conhecendo-se as propriedades dos monômeros constituintes do copolímero, no caso em específico, do 4-aminofenol e anilina, mencionado anteriormente, observa-se que o desenvolvimento do copolímero poli(anilina-4-aminofenol) como estratégia para imobilização pode apresentar um diferencial, pela possibilidade de combinação das propriedades desses monômeros, como a fácil polimerização e boa estabilidade da polianilina, e considerável biocompatibilidade com diferentes tipos de biomoléculas por conter grupos amino e hidroxilas, no caso do poli(4-aminofenol).

#### 1.4. Eletrodos quimicamente modificados

Com o intuito de obter uma maior sensibilidade na detecção de analitos-alvo e uma melhor ambientação de biomoléculas, seja para proporcionar um ambiente mais adequado ou uma maior facilidade durante a imobilização, a modificação dos eletrodos de trabalho torna-se essencial e mostra-se promissor para aplicações em biossensores eletroquímicos (NASCIMENTO e ANGNES, 1998).

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, sendo a metodologia por adsorção muito empregada, devido principalmente à sua simplicidade e eficiência em muitos casos.

Na modificação química, a imobilização de espécies eletroativas ocorre 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 eletródicas (PUTZBACH, 2013).

Em suma, independente do método de modificação, os eletrodos com espécies quimicamente ativas (por exemplo: polímeros, nanopartículas metálicas, nanocompósitos, líquidos iônicos, entre outros) convenientemente imobilizadas em suas superfícies, tem como objetivo pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução. Além disso, os eletrodos quimicamente modificados (EQM) também apresentam características vantajosas como baixo custo, facilidade na construção e possibilidade de miniaturização, o que os difere de instrumentos utilizados em outros métodos como os cromatográficos e espectrofotométricos, por exemplo (MORILLO, 2017).

## 1.5. Imunossensores eletroquímicos

Dentre os diferentes tipos de sensores eletroquímicos, os imunossensores, cuja resposta bioquímica está ligada à interação antígeno-anticorpo, representam uma categoria que merece especial atenção, no que se refere a uma detecção sensível e seletiva (MARQUES, 2013).

Um imunossensor é definido como um dispositivo sensorial constituído por um anticorpo (ou antígeno) acoplado a superfície de um transdutor, que converte o sinal biológico de imunoafinidade em um sinal mensurável. As junções desses componentes desencadeiam a detecção específica e até, quantificação de moléculas alvos em amostras complexas (SANTANA, 2016).

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. No entanto, imunossensores eletroquímicos superam este problema e são rápidos, simples e econômicos, além de terem a vantagem de poderem ser miniaturizados, tornando-se portáteis. Os imunossensores eletroquímicos, em conjunção com a nanotecnologia, apresentam também a possibilidade de detectar analitos em volumes muito pequenos (ROCHA, 2014).

A metodologia de análise com imunossensor amperométrico, cuja interação antígeno-anticorpo é convertida em um sinal eletroquímico e a resposta é dada pela diferença significativa em magnitude da corrente elétrica do imunossensor na ausência do alvo, envolve etapas de lavagem após as interações do antígeno e anticorpo. Dessa forma, a imobilização do anticorpo específico na superfície do eletrodo constitui uma das etapas críticas do desenvolvimento do imunossensor. Em geral, a superfície sólida deve apresentar algumas características fundamentais como alta capacidade para ligação de imunorreagentes; ligação estável e não causar desnaturação da molécula imobilizada (RICCARDI *et al.*, 2001).

A associação de anticorpos com antígenos se dá de forma não covalente, denominada imunocomplexo e uma vez que ele se forma, não permite a reutilização do imunossensor, o que faz com que a maioria seja de uso único. Assim, devido às diversas características relacionados à utilização do imunossensor eletroquímico, como alta especificidade, baixos limites de detecção, aliados ao fato de serem compactos, permitindo o uso de amostras em microlitros, fazem com que os mesmos sejam promissores na utilização de diagnósticos de inúmeros distúrbios (OLIVEIRA, 2014).

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um imunossensor eletroquímico para o diagnóstico do hormônio tireoidiano triiodotironina – T<sub>3</sub> a partir de eletrodos de grafite modificados com o copolímero poli(anilina-4-aminofenol).

### 2.1. Objetivos específicos

- ✓ Preparar o copolímero poli(anilina-4-aminofenol) na proporção 1:1 das soluções monoméricas e os polímeros poli(4-aminofenol) e polianilina por via eletroquímica sobre eletrodos de grafite, utilizando as seguintes concentrações dos monômeros 0,1 mol L<sup>-1</sup> e 1,0 mmol L<sup>-1</sup>;
- ✓ Caracterizar eletroquimicamente os eletrodos de grafite modificados com o copolímero pela técnica de voltametria cíclica e compará-los com o eletrodo de grafite modificado apenas com os monômeros, utilizando a mesma técnica;
- ✓ Imobilizar o anticorpo Anti-triiodotironina como sonda na superfície do eletrodo de grafite modificado com o copolímero;
- ✓ Detectar o hormônio triiodotironina como alvo;
- ✓ Avaliar a resposta eletroquímica do eletrodo modificado com o poli(anilina-4-aminofenol) contendo a sonda e sua interação com o alvo, pela técnica de voltametria de pulso diferencial;
- ✓ Caracterizar morfologicamente a superfície do eletrodo de grafite modificado com o copolímero contendo as biomoléculas sonda e alvo;

## 3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 3.1. Soluções preparadas para o desenvolvimento do trabalho

- Solução estoque de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,1 mol L<sup>-1</sup>;
- Solução de cloreto de potássio (KCl, 99,89%, Neon) 3 mol L<sup>-1</sup>;
- Solução de ferro/ferrocianeto de potássio (K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>.3H<sub>2</sub>O, 99,5%, Fluka Analytical e K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 99,0%, Acros Organics) 5 mmol L<sup>-1</sup> em meio de solução de KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>;

- Solução monomérica de anilina nas concentrações de 0,1 mol L<sup>-1</sup> e 1,0 mmol L<sup>-1</sup> em meio de ácido sulfúrico (0,1 mol L<sup>-1</sup>);
- Solução monomérica de 4-aminofenol nas concentrações de 0,1 mol L<sup>-1</sup> e 1,0 mmol L<sup>-1</sup> em meio de ácido sulfúrico (0,5 mol L<sup>-1</sup>);
- Soluções do copolímero poli(anilina-4-aminofenol) nas concentrações de 0,1 mol L<sup>-1</sup> e 1,0 mmol L<sup>-1</sup>, em meio de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,1 mol L<sup>-1</sup>), na proporção dos monômeros 1:1 para anilina:4-aminofenol;
- Solução estoque de tampão fosfato (monohidrogenofosfato, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 98%, Neon, e dihidrogenofosfato, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 98%, Neon) 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4;
- Solução estoque de NHS 100 mmol L<sup>-1</sup>;
- Solução estoque de EDC (98%, Sigma Aldrich) 100 mmol L<sup>-1</sup>;
- Solução de anticorpo anti-T<sub>3</sub> 1,0 µg mL<sup>-1</sup> em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4;
- Solução de etanolamina (C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>N) 0,1 mol L<sup>-1</sup>;
- Solução estoque de glicina (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>) 50,0 mmol L<sup>-1</sup>;

#### Observações:

Todas as soluções mencionadas acima foram preparadas com água deionizada. Para o preparo da solução tampão, a água utilizada foi previamente autoclavada.

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).

### **3.2. Materiais e equipamentos utilizados para o desenvolvimento do trabalho**

- Autoclave modelo Vitali 21 L;
- Deionizador;
- Capela de fluxo laminar;
- Balança Analítica modelo Shimadzu AY220;
- Sonicar Ultrassônico, modelo Maxclean 1600;
- Balões volumétricos de volumes apropriados;
- *Eppendorf* de volume apropriado;
- Micropipetas volumétricas de diferentes volumetrias;
- Béqueres;

- Espátulas;
- Pisseta;
- Célula eletroquímica de três compartimentos com capacidade de 25 mL;
- Eletrodo auxiliar de platina;
- Eletrodo de referência de Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup> (3,0 mol L<sup>-1</sup>);
- Base condutora de latão;
- Discos de grafite;
- Lixas d'água 400 e 2000;
- Peça de latão de formato cilíndrico;
- Cola adesiva epóxi;
- Cola de prata;
- Suporte de Teflon;
- Espectrofotômetro FT-IR Frontier Single Range - MIR da PerkinElmer;
- Microscópio eletrônico de varredura (MEV) Tescan modelo Vega3 LMU de emissão de campo;
- Metalizador Quorum, modelo Q150ES;
- Microscópio de força atômica (AFM) Hitachi modelo 5100N;
- Potenciostato CH *Instruments* modelo 760C;

### 3.3. Métodos

#### 3.3.1. Preparação dos eletrodos utilizados e da célula eletroquímica

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato CH *Instruments* modelo 760C (Figura 12) localizado no LAFIP/BIOSENS (Laboratório de filmes poliméricos e nanotecnologia/ Laboratório de biossensores). O potenciostato é acoplado a um computador contendo *softwares* específicos para o controle dos parâmetros durante a realização dos experimentos e aquisição de dados. As respostas eletroquímicas foram obtidas por meio das técnicas de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial.

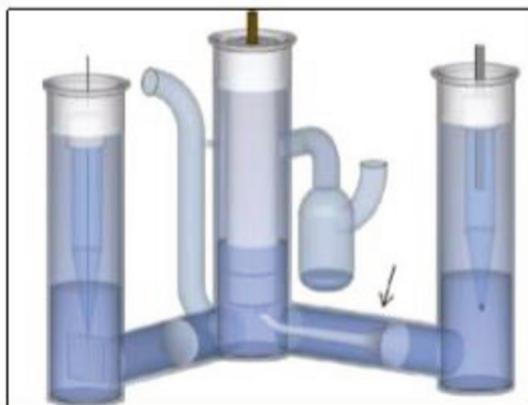
**Figura 12-** Potenciostato CH Instruments modelo 760C.



FONTE: SEGATTO, 2017

O sistema eletroquímico foi composto de uma célula eletroquímica de três eletrodos com capacidade de 25 mL (Figura 13).

**Figura 13-** Modelo da célula eletroquímica de três compartimentos.

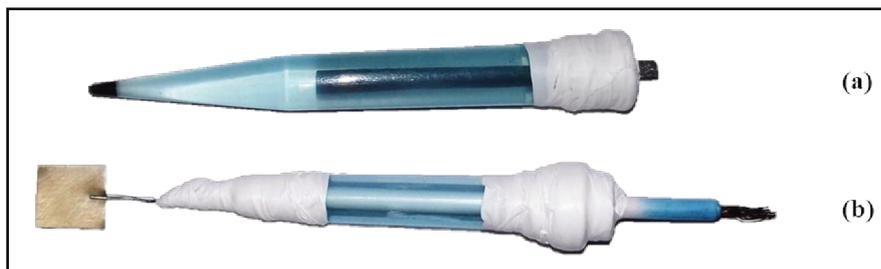


FONTE: SEGATTO, 2017

O eletrodo de referência foi um eletrodo de Ag/AgCl, onde o sal insolúvel de AgCl foi eletrodepositado sobre a prata. A placa foi, então, imersa em solução de KCl 3 mol L<sup>-1</sup> contida em uma ponteira azul, revestida em sua ponta com uma membrana semipermeável de bateria, Figura 14(a).

Com o objetivo de revestir o material do contra-eletrodo e facilitar o manuseio do mesmo, o contato elétrico foi feito por um fio de cobre e os mesmos foram colocados no interior de uma ponteira de capacidade de 1 mL (ponteira azul). O mesmo foi constituído de uma placa de platina, 2 cm<sup>2</sup> de área geométrica Figura 14 (b).

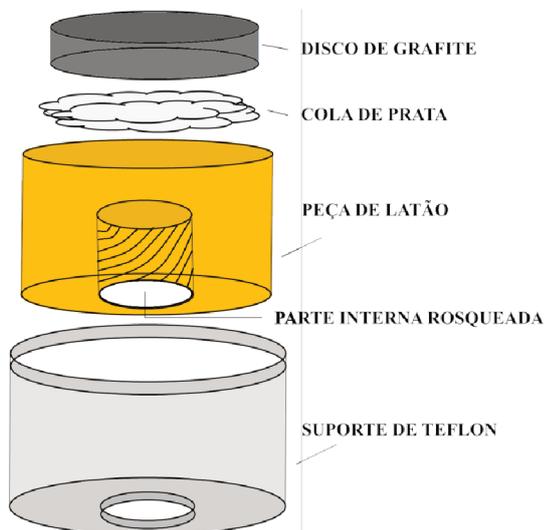
**Figura 14-** Eletrodo auxiliar de platina (b) e eletrodo de referência de Ag/AgCl (a).



FONTE: SEGATTO, 2017

O eletrodo de grafite (EG) (eletrodo de trabalho) foi fabricado artesanalmente, a partir de discos de grafite de 6 mm de diâmetro e espessura entre 1 – 3 mm, previamente cortados de uma barra de grafite. 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 24 horas da fixação da cola de prata, os espaços entre o disco de grafite, o latão e o teflon foram preenchidos, com auxílio de uma agulha, com cola adesiva epóxi e esperado mais 24 horas para secagem da mesma, como representado na Figura 15.

**Figura 15-** Representação esquemática das etapas de preparação dos eletrodos de grafite.



FONTE: SEGATTO, 2017

A fim de uniformizar e melhorar a superfície de contato do eletrodo de trabalho, os eletrodos de grafite foram polidos manualmente em lixas d'água 400 e 2000, seguido de polimento em feltro com suspensão de alumina 0,3  $\mu\text{m}$ .

Por fim, com o objetivo de eliminar resquícios de alumina ou outros interferentes, os eletrodos de grafite foram lavados três vezes com água destilada em banho de ultrassom por 1 minuto cada. Finalmente, os EG prontos para serem utilizados, foram secos sob fluxo de nitrogênio e rosqueados em uma base condutora de latão envolvida com teflon, como mostrado na Figura 16.

**Figura 16-** Eletrodos de grafite devidamente preparados acoplados a uma base condutora de latão.



FONTE: SEGATTO, 2017

Dessa forma, a fabricação desses eletrodos tem como vantagens a reutilização do latão disponível para colagem de novos discos de grafites, uma vez que os mesmos podem ser desmontados com facilidade, além de apresentar baixo custo de fabricação quando comparados à aquisição de eletrodos comerciais.

Assim, em todas as análises realizadas nesse trabalho, foi utilizado o sistema de três compartimentos e os eletrodos de grafite produzidos artesanalmente, mencionados acima.

### 3.3.2. Seleção dos eletrodos de grafite

Os eletrodos de grafite foram condicionados eletroquimicamente por meio de varreduras de potencial em solução do eletrólito suporte  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , na qual são realizados ciclos de voltametria até estabilização da corrente não-faradaica, na faixa de potencial de  $-0,1 \text{ V}$  a  $+1,2 \text{ V}$ , com velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . Os eletrodos foram lavados em água destilada e secos em fluxo de nitrogênio.

Foi estabelecido, por meio de estudos realizados pela equipe LAFIP, que para a obtenção de resultados eletroquímicos reprodutíveis, os valores de corrente entre diferentes eletrodos devem ser próximos a  $25 \mu\text{A}$ . Dessa forma, EG que apresentaram diferenças significativas de correntes foram descartados dos testes futuros.

### 3.3.3. Eletropolimerização da polianilina

Os eletrodos de grafite devidamente preparados e selecionados de acordo com o critério estabelecido no item 3.3.2, foram imersos na célula eletroquímica contendo a solução de anilina ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ), ambas concentrações preparadas em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) em uma balão volumétrico de 25 mL. A eletropolimerização foi realizada em um potenciostato CH *Instruments* modelo 760C com velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , na faixa de potencial de  $-0,1 \text{ V}$  a  $+1,2 \text{ V}$ . Foram realizadas as leituras em triplicatas.

### 3.3.4. Eletropolimerização do poli(4-aminofenol)

Os eletrodos de grafite devidamente preparados e selecionados foram imersos na célula eletroquímica contendo a solução de 4-aminofenol ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ), ambas concentrações preparadas em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) em uma balão volumétrico de 25 mL. A eletropolimerização foi realizada em um potenciostato CH *Instruments* modelo 760C com velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , na faixa de potencial de  $0,0 \text{ V}$  a  $+0,8 \text{ V}$ . Foram realizadas as leituras em triplicatas.

### 3.3.5. Eletropolimerização do copolímero

Os eletrodos de grafite aptos para trabalho foram imersos na célula eletroquímica contendo a solução do copolímero na proporção 1:1 das soluções monoméricas, na concentração de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Com o objetivo de caracterizar morfologicamente o material, o copolímero também foi eletropolimerizado na proporção 1:1, nas concentrações de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de cada monômero. Essas soluções do copolímero foram preparadas em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) em uma balão volumétrico de 25 mL.

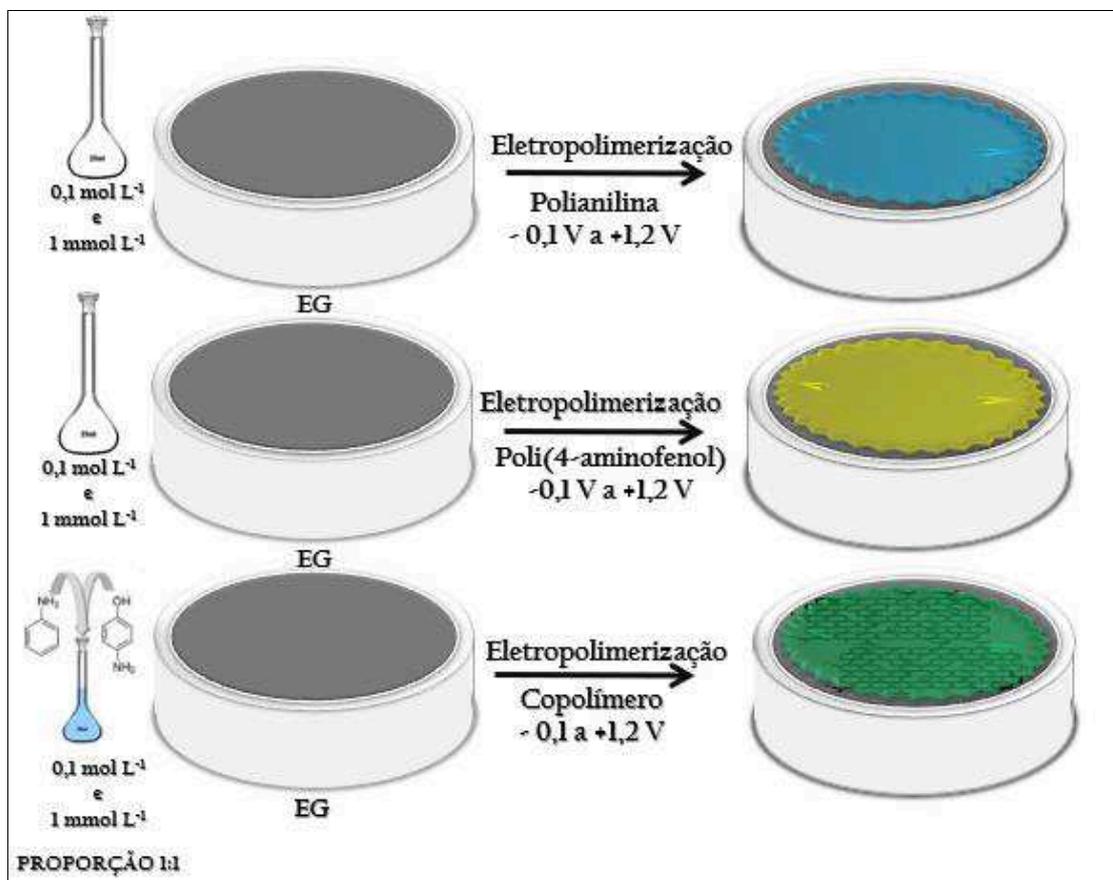
A eletropolimerização foi realizada em um potenciostato CH *Instruments* modelo 760C com velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , na faixa de potencial de  $-0,1 \text{ V}$  a  $+1,2 \text{ V}$ . Foram realizadas as leituras em triplicata de cada concentração.

### 3.3.6. Caracterização eletroquímica do copolímero poli(anilina-4-aminofenol) e dos polímeros polianilina e poli(4-aminofenol)

Após cada etapa de modificação (Figura 17), os eletrodos de grafite foram submetidos a varreduras de potencial em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) fazendo-se ciclagens até a estabilização da corrente, na faixa de potencial inicialmente realizada no EG antes da modificação ( $-0,1 \text{ V}$  a  $+1,2 \text{ V}$ ). 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 um perfil distorcido foram descartados.

Também foi realizada voltametria cíclica em solução de  $\text{KCl}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  contendo  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$   $5 \text{ mmol L}^{-1}$  após cada etapa de modificação da superfície com os filmes. 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.

**Figura 17-** Esquema representativo da modificação do EG com os filmes polimérico.



FONTE: AUTORA, 2018

### 3.3.7. Caracterizações estruturais e morfológicas do copolímero poli(anilina-4-aminofenol) e dos filmes polianilina e poli(4-aminofenol).

A leitura das medidas de infravermelho foi realizada em um espectrofotômetro FT-IR Frontier Single Range - MIR da PerkinElmer (Figura 18), pertencente ao Grupo de Materiais Inorgânicos do Triângulo (GMIT) localizado no Laboratório de Fotoquímica e Ciência de Materiais (LAFOT-CM) do Instituto de Química da UFU. As análises das amostras foram feitas no estado sólido, com a utilização do acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR) com cristal de diamante. Foram obtidos espectros na região compreendida entre 2200 e 400  $\text{cm}^{-1}$ .

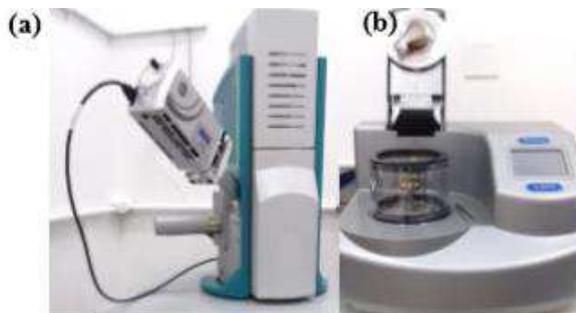
**Figura 18-** Espectrofotômetro FT-IR Frontier Single Range - MIR da PerkinElmer.



FONTE: AUTORA, 2018

Análises da morfologia do copolímero e dos polímeros, na concentração de 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$ , foram efetuadas utilizando o microscópio eletrônico de varredura Tescan modelo Vega3 LMU de emissão de campo, Figura 19 (a), do Laboratório Multiusuário 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 19 (b).

**Figura 19-** MEV Tescan modelo Vega3 LMU (a) e revestidor de pulverização Quorum 150 R (b).



FONTE: SEGATTO, 2017

Para realizar a análise de microscopia eletrônica de varredura, os EG modificados foram armazenados em atmosfera de nitrogênio até o momento da análise. A análise foi realizada no microscópio de força atômica Shimadzu modelo SPM 9600, Figura 20, do Laboratório Multiusuário do Instituto de Física da UFU. Os valores de altura média ( $R_z$ ), rugosidade média ( $R_a$ ) e rugosidade média quadrática ( $R_q$ ) foram calculados usando o software SMP Offline – HeightTrac.

**Figura 20-** AFM Shimadzu modelo SPM 9600.



FONTE: SEGATTO, 2017

3.3.8. Imobilização das biomoléculas na superfície do eletrodo modificado com o copolímero poli(anilina-4-aminofenol) e com os polímeros polianilina e poli(4-aminofenol) para a construção do imunossensor.

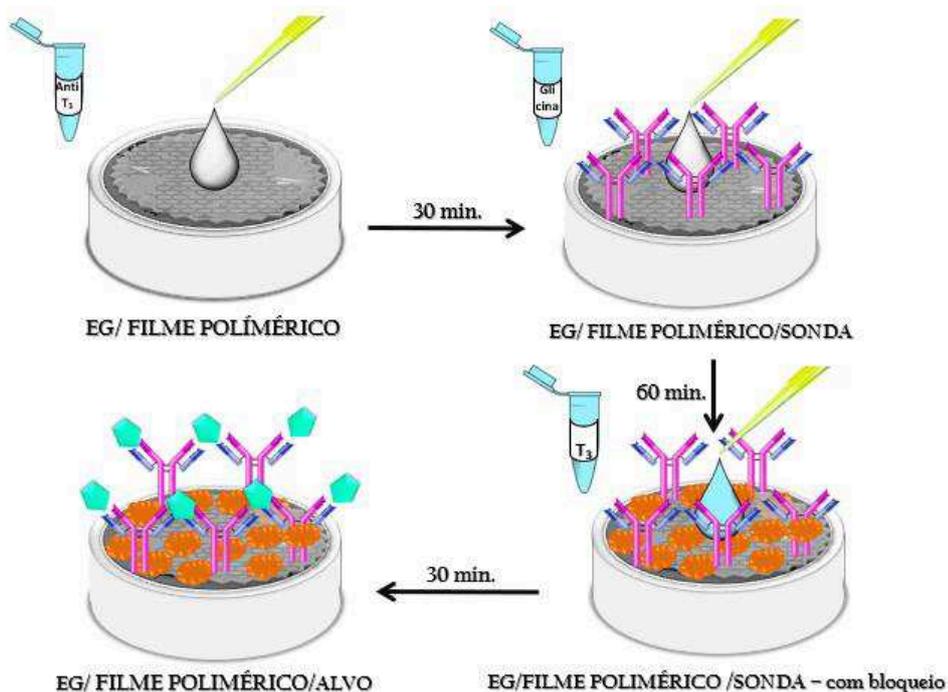
Inicialmente, com o objetivo de comparar a etapa de imobilização utilizando o EG modificado com o copolímero e com os polímeros polianilina e poli(4-aminofenol), 10  $\mu$ L da

solução do anticorpo anti-T<sub>3</sub> foram gotejados sobre a superfície dos eletrodos modificados com cada filme e foram deixados em contato por 30 minutos. Em seguida, com o intuito de remover os anticorpos não ligados, foi efetuada a lavagem com tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4, por 10 s.

Posteriormente, foram gotejados 10 µL de uma solução bloqueadora de glicina (50 mmol L<sup>-1</sup>) sobre os eletrodos contendo a biomolécula do Anti-T<sub>3</sub>, ficando em contato por 1 hora, seguido de lavagem com tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4, por 10 s. Esses eletrodos, prontos para detecção do alvo, foram denominados EG/poli(anilina-4-aminofenol)/SONDA, EG/polianilina/SONDA e EG/poli(4-aminofenol)/SONDA.

Por fim, 10 µL de soro contendo o alvo T<sub>3</sub> foram gotejados sobre a superfície dos eletrodos modificados contendo a sonda e deixado em contato por 30 minutos, para permitir a interação sonda-alvo. Posteriormente, o mesmo foi lavado em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4, por 10 s, para remoção das biomoléculas de T<sub>3</sub> que não interagiram. Após esse contato as plataformas passaram a ser denominadas EG/ poli(anilina-4-aminofenol)/ALVO, EG/polianilina/ALVO e EG/ poli(4-aminofenol)/ALVO. Um esquema representativo das etapas de preparação do imunossensor utilizando os eletrodos modificados com os filmes acima mencionados é representado na Figura 21.

**Figura 21-** Esquema representativo geral das etapas de preparação do imunossensor para diagnóstico do hormônio tireoidiano T<sub>3</sub> com EG modificado.



FONTE: AUTORA, 2018

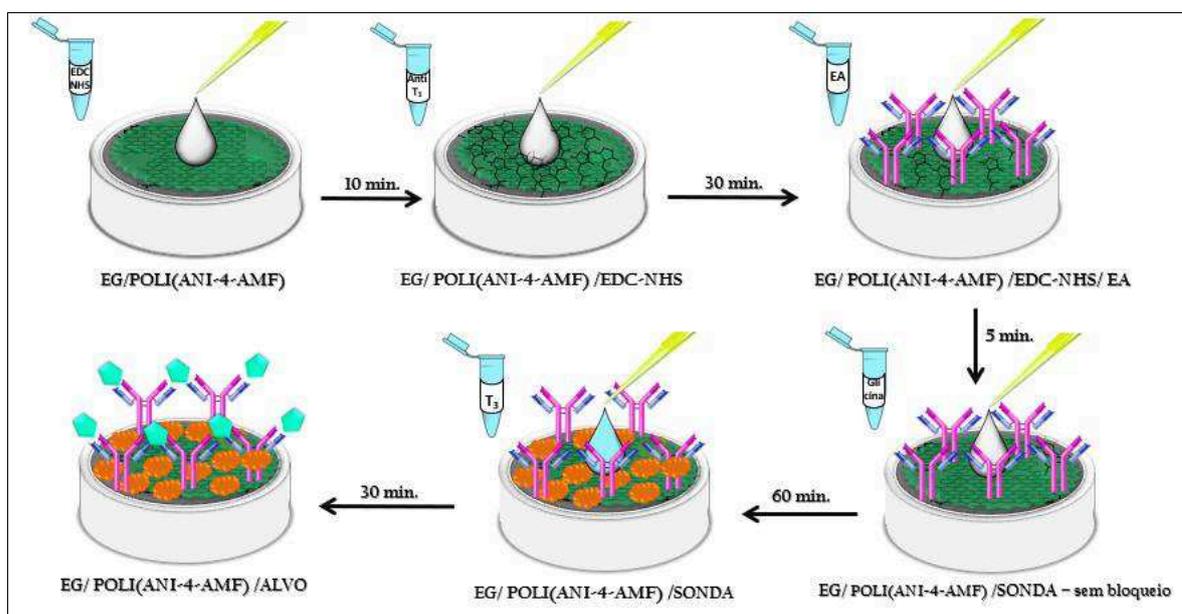
Para promoção de ligação química e, conseqüentemente, uma ligação orientada dos anticorpos, foi utilizada a solução equimolar de EDC-NHS para a ativação dos grupos funcionais expostos do copolímero. Para tanto, foi definido uma nova rota de preparação do mesmo, sendo gotejados 10  $\mu$ L da solução de EDC-NHS sobre a superfície dos eletrodos inicialmente, para que fosse intensificado a potencialidade no eletrodo modificado. A solução ativadora ficou em contato com a superfície por 10 min e, posteriormente, os eletrodos foram lavados com água destilada por 10 s, para remoção do excesso de reagente.

Em seguida, 10  $\mu$ L da solução do anticorpo anti-T<sub>3</sub> foram gotejados sobre a superfície ativada dos eletrodos e foram preparados da mesma forma inicialmente mencionada.

A etapa seguinte e inovadora em relação ao primeiro teste relatado acima (Figura 22), consistiu no gotejamento de 10  $\mu$ L da solução de etanolamina (EA) 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Essa solução ficou em contato com a superfície por 5 minutos e, depois os eletrodos foram lavados em água destilada por 10 segundos.

Posteriormente, a solução de glicina e a solução do alvo T<sub>3</sub> foram gotejadas na superfície do eletrodo, seguindo o mesmo procedimento descrito no início desse tópico. Segue o esquema representativo das etapas de preparação do imunossensor para diagnóstico do hormônio tireoidiano T<sub>3</sub>, com o EG modificado com o copolímero na presença do EDC-NHS.

**Figura 22-** Esquema representativo das etapas de preparação do imunossensor para diagnóstico do hormônio tireoidiano T<sub>3</sub>, com o EG modificado com o copolímero na presença do EDC-NHS.



FONTE: AUTORA, 2018

### 3.3.9. Caracterização eletroquímica do imunossensor

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

O estudo visou avaliação da presença da sonda biológica sobre a plataforma construída, comparado com EG sem modificação. Assim, foram utilizados os sinais de resposta dos eletrodos sem a sonda como referências para comparação dos sinais após interação com a sonda. Foi avaliada a resposta eletroquímica de interação sonda-alvo com e sem a presença do EDC-NHS no copolímero.

Por fim, para verificar o quanto foi eficiente a utilização da plataforma modificada com o copolímero para detecção do alvo  $\text{T}_3$  presente no soro foi realizado o monitoramento do valor de  $I_{pa}$  referente ao EG/poli(anilina-4-aminofenol)/ALVO, EG/polianilina/ALVO e EG/poli(4-aminofenol)/ALVO, utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD).

### 3.3.10. Caracterização morfológica das etapas de construção do imunossensor

Cada etapa de modificação do EG com os filmes poliméricos, tanto com o copolímero quanto com a polianilina e poli(4-aminofenol), foram caracterizadas 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, foram analisadas por AFM.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

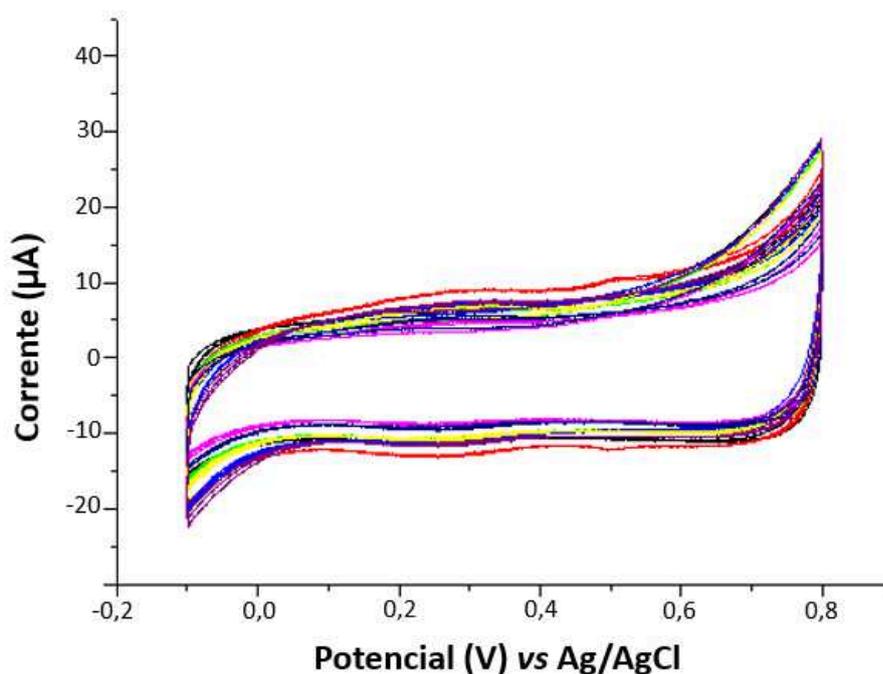
### 4.1. Seleção dos eletrodos de grafite

Como descrito no procedimento 3.3.2, para que os EG estejam aptos para trabalho é necessário que os valores de corrente entre diferentes eletrodos sejam próximos a  $25 \mu\text{A}$ .

Assim, a Figura 23 mostra o comportamento eletroquímico típico dos eletrodos de grafite submetidos à voltametria cíclica em solução do eletrólito suporte  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ).

A utilização de tal procedimento tem por objetivo avaliar o perfil eletroquímico dos eletrodos, bem como eliminar possíveis interferentes, como impurezas que eventualmente possam estar adsorvidas nas superfícies dos eletrodos e que sejam eletroativas na faixa de potencial trabalhada e que possam, de alguma forma, comprometer os resultados do presente trabalho.

**Figura 23-** Exemplos de voltamogramas cíclicos ideais dos eletrodos de grafite em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .



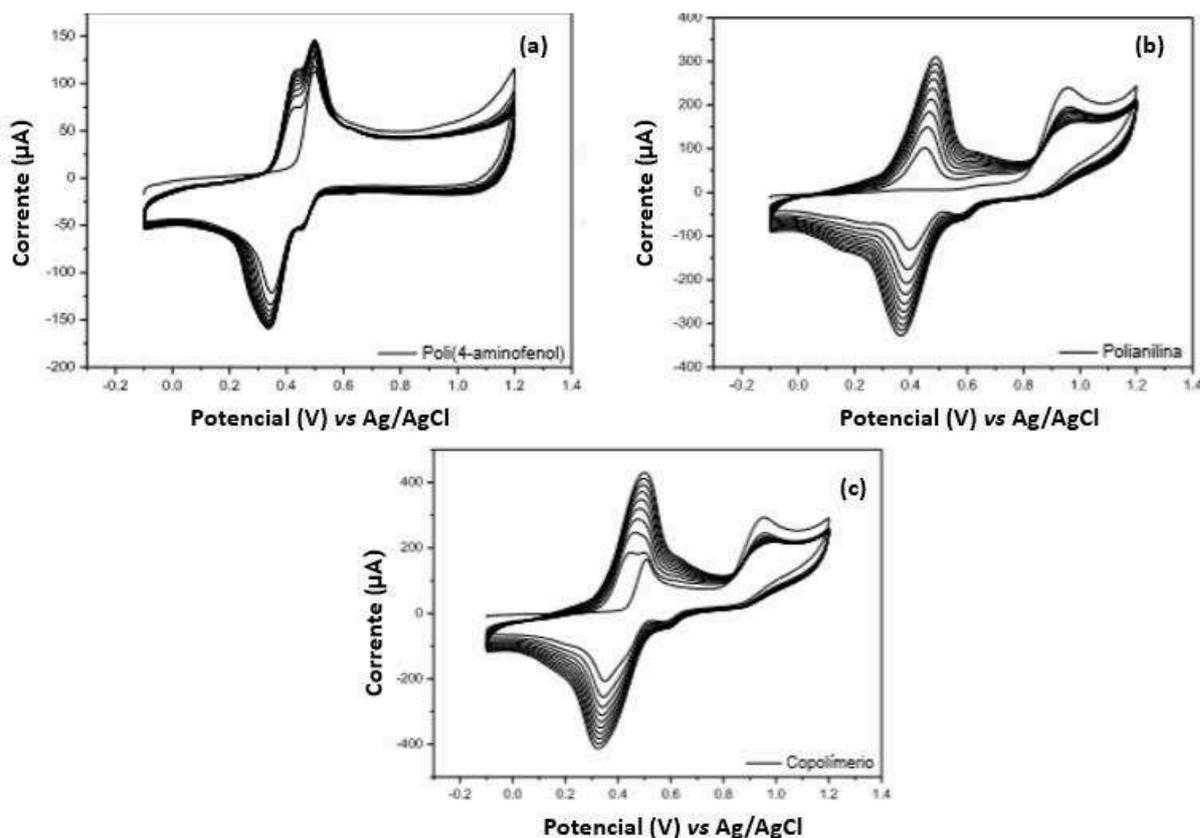
É observado pela Figura 23 que as diferenças entre os valores de corrente dos eletrodos são inferiores a  $25 \mu\text{A}$ . Dessa forma, ao longo do desenvolvimento do trabalho, os EG que apresentaram esse perfil eletroquímico foram escolhidos para a realização dos testes.

#### **4.2. Caracterização eletroquímica do copolímero poli(anilina-4-aminofenol) e dos polímeros polianilina e poli(4-aminofenol)**

Foi realizada a eletropolimerização dos três filmes diferentes em triplicatas, sendo o primeiro partindo do monômero de 4-aminofenol  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , o segundo a partir da solução monomérica de anilina ( $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e o terceiro a partir da mistura das soluções anteriores,

utilizando as mesmas concentrações citadas, numa proporção molar de 1:1, utilizando como eletrólito suporte ácido sulfúrico 0,1 mol L<sup>-1</sup> e 10 ciclos de varredura, cujos perfis eletroquímicos de todos os ciclos de potenciais durante o processo de eletropolimerização estão representados na Figura 24.

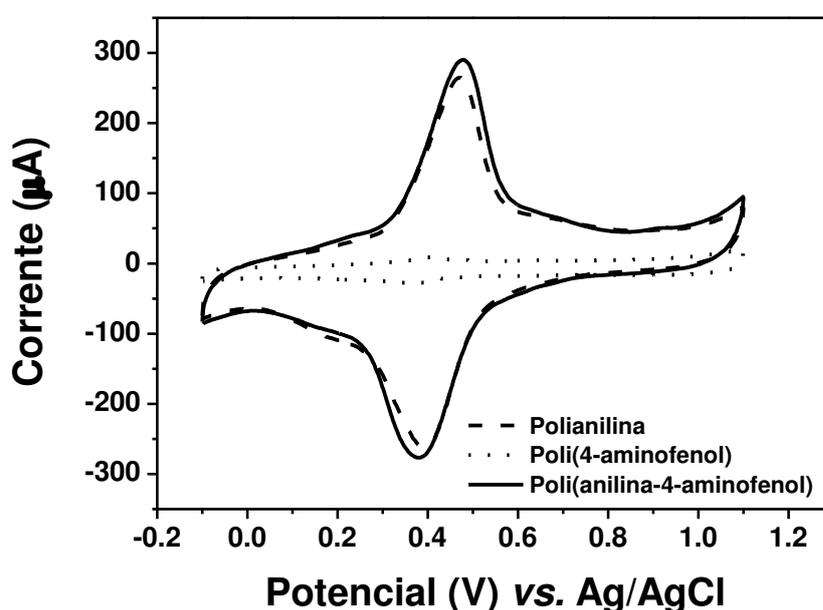
**Figura 24-** Eletropolimerização de poli(4-aminofenol) (a) polianilina (b) e poli(anilina-4-aminofenol)(c) por VC em meio de ácido sulfúrico 0,1 mol L<sup>-1</sup> e 10 ciclos de varredura na faixa de potencial de -0,1 a +1,2 V, 20 ciclos e velocidade de varredura de 50 mV s<sup>-1</sup>.



A Figura 24(b) mostra um pico em +1,0 V, referente a oxidação da anilina, sendo o potencial deslocado para valores mais anódicos quando comparado à literatura (ZARAGOZA *et al.*, 2006). A polianilina apresentou picos característicos, com pares oxi-red em +0,4 V e +0,1 V e pico largo e de baixo valor de corrente centrado em +0,6 V. Sendo o pico em +0,4 V descrito como a degradação de intermediários durante a eletropolimerização. A Figura 24(a) apresenta os picos característicos da eletropolimerização do poli(4-aminofenol), sendo o par em torno de +0,5 e +0,4 V, referentes ao processo reversível de oxirredução do 4-aminofenol e em aproximadamente +0,5 V e +0,3 V, referentes a formação do poli(4-aminofenol).

Quanto ao copolímero, o mesmo apresentou um perfil de eletropolimerização bastante similar ao da polianilina, diferenciando apenas pelo leve alargamento e deslocamento dos picos e apresentando um pequeno aumento no valor de corrente, como é melhor observado na Figura 25, onde estão relacionados os perfis de cada filme em um mesmo voltamograma, considerando apenas o décimo voltamograma cíclico de eletrodo de grafite em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .

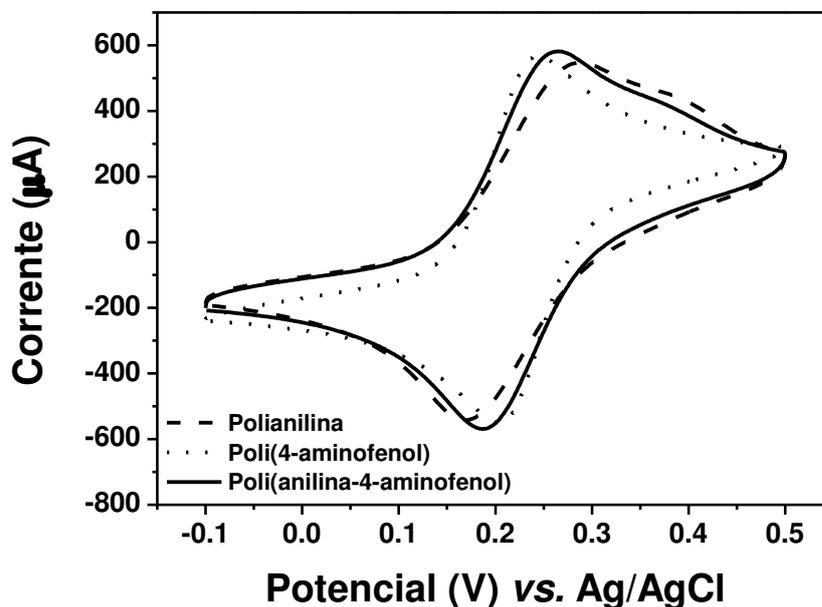
**Figura 25-** Voltamogramas cíclicos em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $50 \text{ mV s}^{-1}$  dos eletrodos de grafite modificados com poli(4-aminofenol) ( $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ), polianilina ( $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e poli(anilina-4-aminofenol) proporção molar 1:1 ( $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ).



Estas diferenças referentes ao copolímero estão em concordância com a ideia de modificação e potencialização da superfície do eletrodo utilizando a junção dos monômeros, indicando que a presença da anilina e do 4-aminofenol na proporção 1:1 favorece o processo de eletropolimerização do filme poli(anilina-4-aminofenol), além de propiciar um aumento da área superficial, como mostra os aumentos nas intensidades de corrente, significando a formação de uma maior quantidade de filme polimérico.

Por fim, para avaliar o processo de transferência de elétrons foram obtidos por voltametria cíclica, os voltamogramas 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  $\text{KCl}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , para os EG/polianilina, EG/poli(4-aminofenol) e EG/poli(anilina-4-aminofenol) que são mostrados na Figura 26.

**Figura 26-** Últimos ciclos de voltametria dos EG contendo os filmes polianilina, poli(4-aminofenol) e poli(anilina-4-aminofenol), em solução de  $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$  5,0 mmol L<sup>-1</sup> em meio de KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, 50 mV s<sup>-1</sup>.



A avaliação do processo de transferência eletrônica utilizando a sonda aniônica  $Fe^{2+/3+}$  mostrou que a combinação dos monômeros no copolímero leva a um estado intermediário de resistência elétrica aos dois filmes isolados, ocorrendo um aumento na resistência quando comparado ao poli(4-aminofenol) devido a presença de maior quantidade de material polimérico na superfície do eletrodo e, uma melhora na transferência quando comparado a polianilina, que é caracterizada como um material mais passivante.

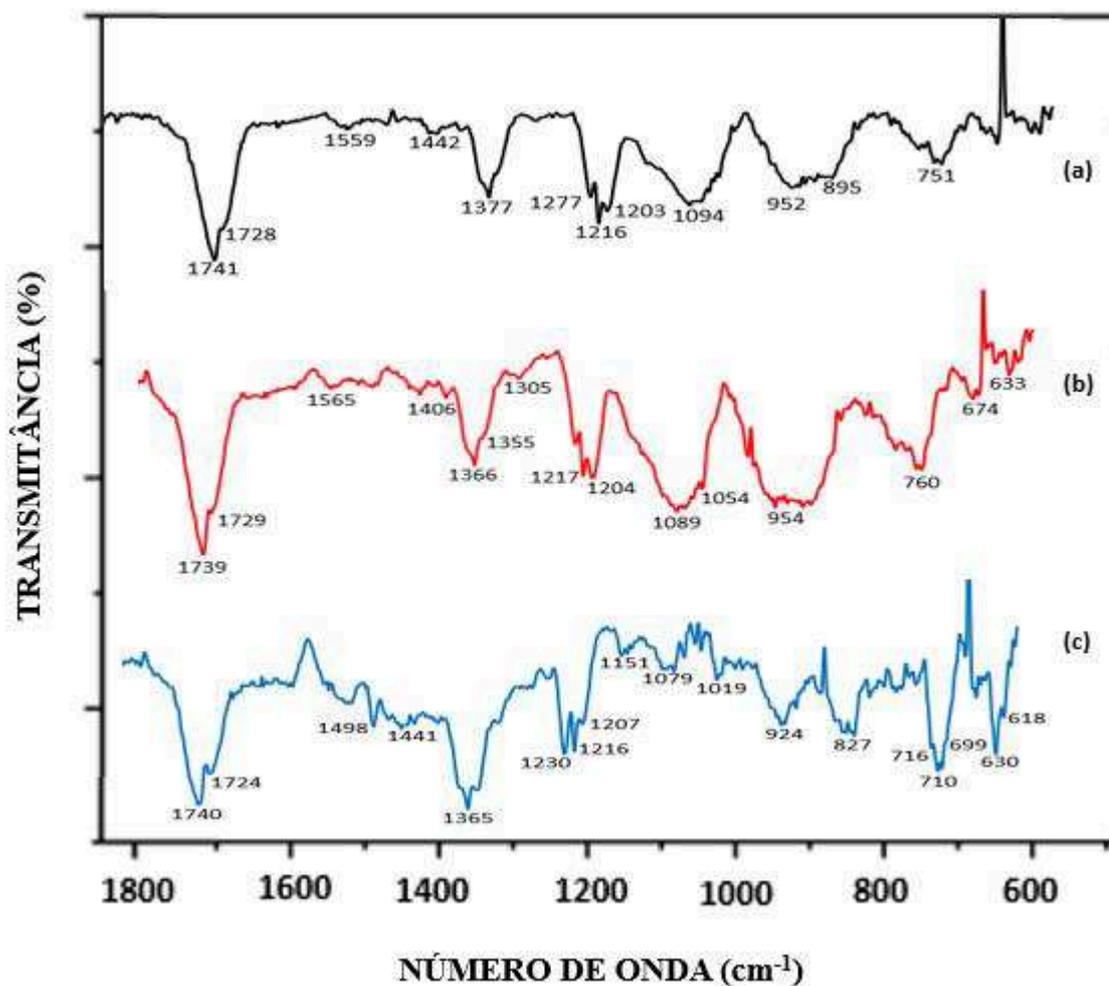
Este pequeno aumento na resistência eletrônica causado pela presença de grande quantidade de filme na superfície do eletrodo, não compromete a resposta do imunossensor, uma vez que a resistência é aumentada pela maior quantidade de grupos funcionais expostos. Visando a etapa de biofuncionalização, o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

#### **4.3. Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho (IV) do Copolímero poli(anilina-4-aminofenol) e dos filmes polianilina e poli(4-aminofenol).**

Com o objetivo de verificar as informações estruturais dos filmes em questão, principalmente seus grupos funcionais, foram realizadas análises por espectroscopia

vibracional na região do Infravermelho e foram obtidos para o copolímero poli(anilina-4-aminofenol) e para os filmes polianilina e poli(4-aminofenol), ambos na concentração de  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ , os respectivos espectros que estão mostrados na Figura 27, possibilitando assim, em partes, identificar a estrutura do copolímero formado.

**Figura 27-** Espectro de infravermelho para polianilina (a) poli(4-aminofenol) (b) copolímero (c) poli(anilina-4-aminofenol).



Para a melhor compreensão da Figura 27, nas Tabelas 1, 2 e 3 estão apresentados as principais absorções do espectro da polianilina, poli(4-aminofenol) e poli(anilina-4-aminofenol), respectivamente.

**Tabela 1-** Atribuições das principais absorções do espectro da polianilina.

Banda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
751	Anel aromático (deformação angular de 5 H adjacentes (anéis monossustituídos))
895	HC=CH
952	Anel aromático (estiramento de baixa intensidade)
1094	N-H
1203	Vibrações de desdobramento C-H
1216	
1377	C-N (aromáticos)
1442	C=C de aromáticos
1559	N-H (Banda fraca de deformação angular)
1741	Estiramento N-H

FONTE: AUTORA, 2018

**Tabela 2-** Atribuições das principais absorções do espectro do poli(4-aminofenol).

Banda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
633	Anel aromático ( 2 H adjacentes (anéis para-substituídos))
674	
760	Estiramento N-H
954	O-H (Banda larga (deformação angular) de média intensidade, devido à deformação angular)
1089	Estiramento C-O
1204	C-O de fenóis
1366	C-N (aromáticos)
1406	Estiramento forte de N=O
1565	C=C de aromáticos
1739	Estiramento N-H

FONTE: AUTORA, 2018

**Tabela 3-** Atribuições das principais absorções do espectro do copolímero poli(anilina-4-aminofenol).

Banda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
630	Anel aromático
710	Anel aromático (Deformação angular de 3 H adjacentes (anéis meta-substituídos e 1,2,3-trissubstituídos).
827	Estiramento N-H
924	O-H (Banda larga (deformação angular) de média intensidade, devido à deformação angular)
1019	Estiramento C-O
1079	Estiramento C-O
1151	Estiramento C-O
1230	C-O de fenóis
1365	Estiramento forte de N=O
1498	N-H (Banda fraca de deformação angular)
1740	Estiramento N-H

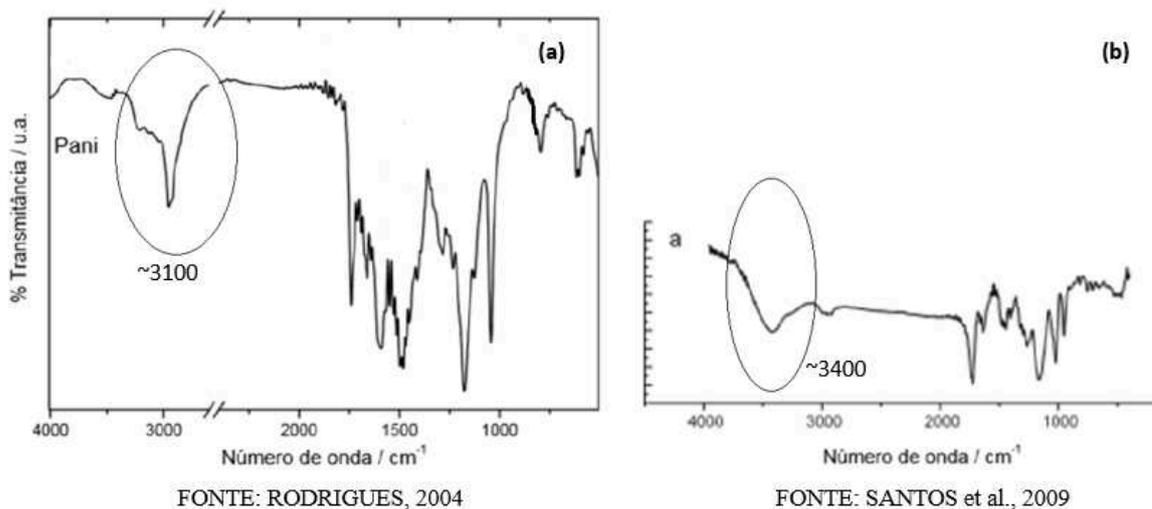
FONTE: AUTORA, 2018

No espectro do copolímero, da polianilina e do poli(4-aminofenol) mostrados na Figura 27, é possível perceber a similaridade dos mesmos no que se refere aos grupos funcionais. Em ambos os espectros, os números de onda em 1739 cm<sup>-1</sup>, 1366 cm<sup>-1</sup>, 1216 cm<sup>-1</sup>, 1089 cm<sup>-1</sup>, 954 cm<sup>-1</sup> e 710 cm<sup>-1</sup> estão presentes nos filmes, no entanto com características diferentes, por exemplo, em aproximadamente, 1089 cm<sup>-1</sup>, em que está localizado o estiramento C-O no poli(4-aminofenol) e o estiramento N-H na polianilina, observa-se uma diminuição de intensidade do pico no filme do copolímero nessa região, fato esse que pode ser devido à união dos monômeros e a redução desses grupos funcionais.

É observado também que nos espectros, tanto da polianilina [Figura 27(a)] quanto do poli(4-aminofenol) [Figura 27(b)], regiões características de números de onda não são identificados, como é o caso do estiramento O-H na região entre 3.600 - 3.200, que é caracterizado como uma banda forte, larga, resultante da associação polimérica, e a presença do estiramento na região compreendida entre 3.400 - 3.100, característica de NH<sub>2</sub> livre em aminas primárias, como é mostrado na Figura 28, em que estão mostrados os espectros da

polianilina e poli(4-aminofenol) retirados de trabalhos científicos (RODRIGUES, 2004 e SANTOS *et al*, 2009).

**Figura 28-** Espectros da polianilina (a) e do poli(4-aminofenol) (b).



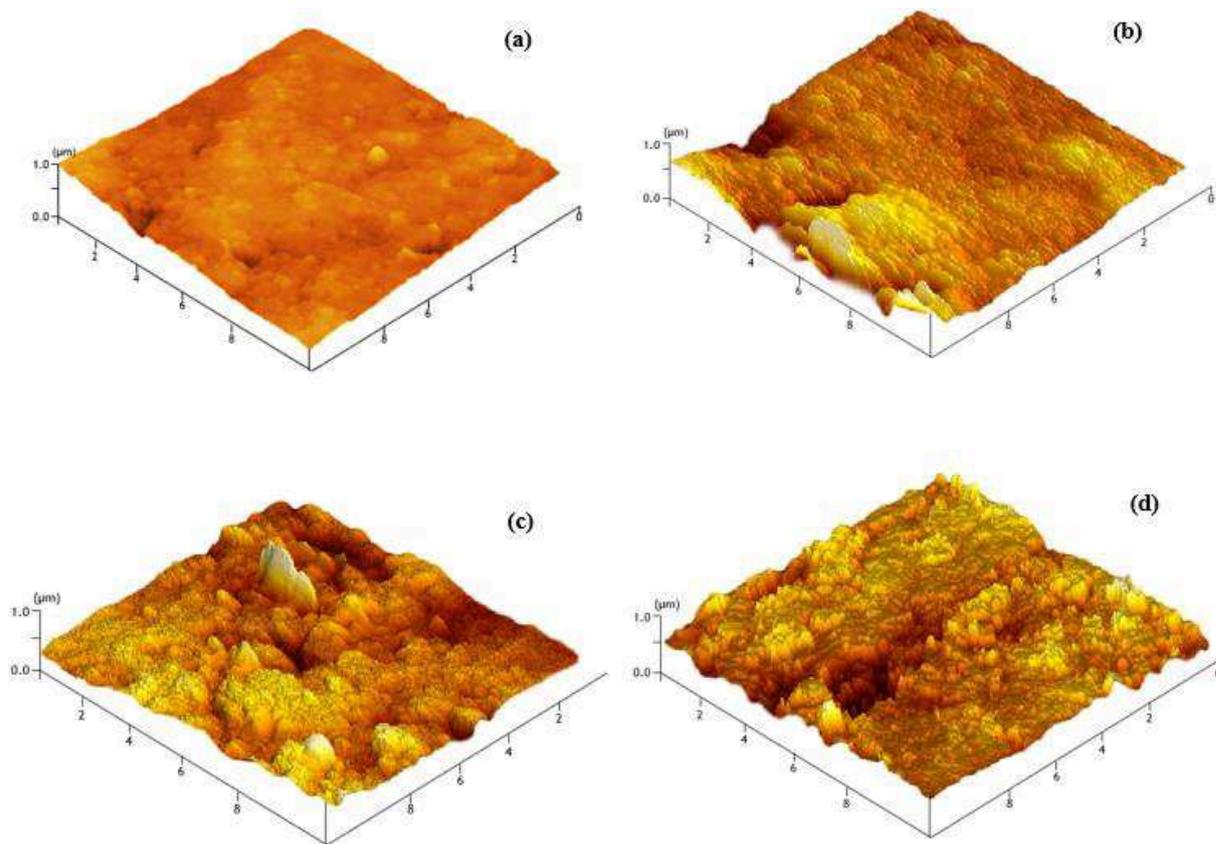
Dessa forma, tais ausências desses estiramentos característicos podem ser explicadas pela relação direta entre a intensidade da banda e a concentração, uma vez que a concentração utilizada para a síntese eletroquímica desses filmes foi de apenas  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , formando assim, pouco material na superfície do eletrodo e conseqüentemente, dificultando a realização das análises por espectroscopia vibracional na região do Infravermelho.

No entanto, mesmo com a ausência dos estiramentos característicos mencionados acima, no espectro do copolímero [Figura 27(c)], em comparação com os outros filmes, é perceptível o aumento dos grupos funcionais presentes na estrutura do mesmo. Dessa forma, os resultados apresentados se mostraram interessantes para a aplicação em imunossensores, pois a existência de diversos grupos funcionais expostos pode servir como sítios de ligação de biomoléculas.

#### 4.4. Microscopia de Força Atômica (AFM) e Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do copolímero poli(anilina-1-aminofenol) e dos filmes polianilina e poli(4-aminofenol)

A Figura 29 mostra as imagens obtidas por AFM para o EG modificado com cada filme com concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , a fim de permitir uma melhor visualização da morfologia, enquanto que 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.

**Figura 29-** Imagens de AFM para EG (a) poli(4-aminofenol) (b), polianilina (c) e para o copolímero (d).



FONTE: AUTORA, 2018

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

Modificações	Rz (nm)	Ra (nm)	Rq (nm)
EG	500	32	42
EG/polianilina	989	66	85
EG/poli(4-aminofenol)	982	60	89
EG/copolímero	1007	90	120

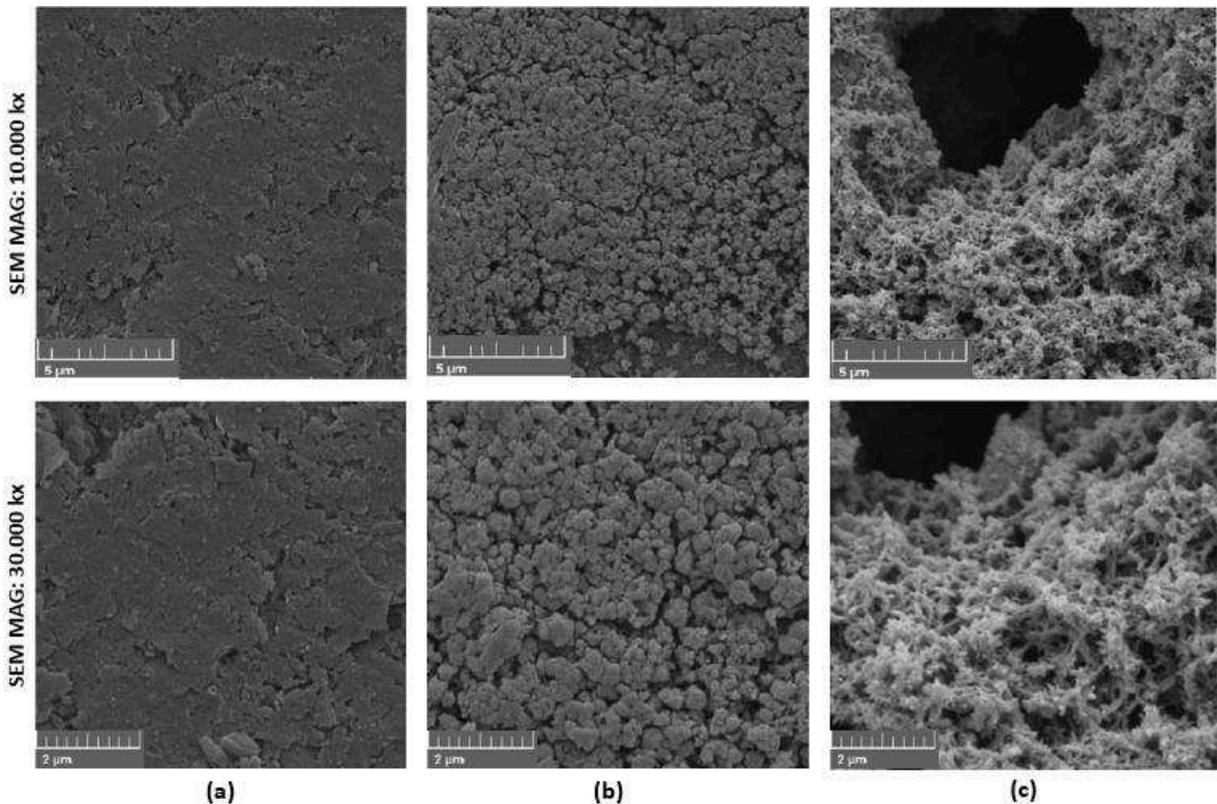
FONTE: AUTORA, 2018

Observa-se que o EG, Figura 29(a), apesar de se caracterizar como um material poroso apresenta uma estrutura mais plana com relação aos demais. É possível visualizar que os eletrodos de grafite modificados tanto com a polianilina quanto com o poli(4-aminofenol) não tiveram diferenças significativas de valores de altura média (Rz), rugosidade média (Ra) e rugosidade média quadrática (Rq), por mais que no poli(4-aminofenol) a estrutura é mais plana e na polianilina existe a presença de partículas agregadas de tamanhos diferentes espalhadas sobre a superfície. Já para o copolímero, ao contrário do que foi observado nos outros filmes na superfície do EG, os valores tanto de Rz, Ra e Rq foram ligeiramente maiores, possibilitando assim, notar a diferença da síntese quando se tem a junção dos monômeros anilina e 4-aminofenol.

Quanto à morfologia do copolímero, é observado um aumento da rugosidade média da superfície do mesmo de uma forma mais uniforme quando comparada à morfologia da polianilina, resultando no aumento da área superficial observada também nos estudos eletroquímicos que serão discutidos posteriormente.

Para melhor compreender a morfologia dos filmes sobre os eletrodos de grafite, imagens de MEV são mostradas na Figura 30.

**Figura 30-** Imagens de MEV com ampliações de 10.000 e 30.000 vezes para EG/poli(4-aminofenol) (a), EG/polianilina (b) e EG/poli(anilina-4-aminofenol) (c).



FONTE: AUTORA, 2018

A Figura 30(a) permite a visualização de uma superfície razoavelmente plana para EG/poli(4-aminofenol), apesar da presença de “escamas” e alguns fragmentos do próprio grafite, como por exemplos, pequenos buracos, que podem ser resultantes do processo de polimento. A Figura 30(b) revela a distribuição uniforme de polianilina pela superfície do EG, com recobrimento com pequenas estruturas globulares, como também observado nas imagens de AFM.

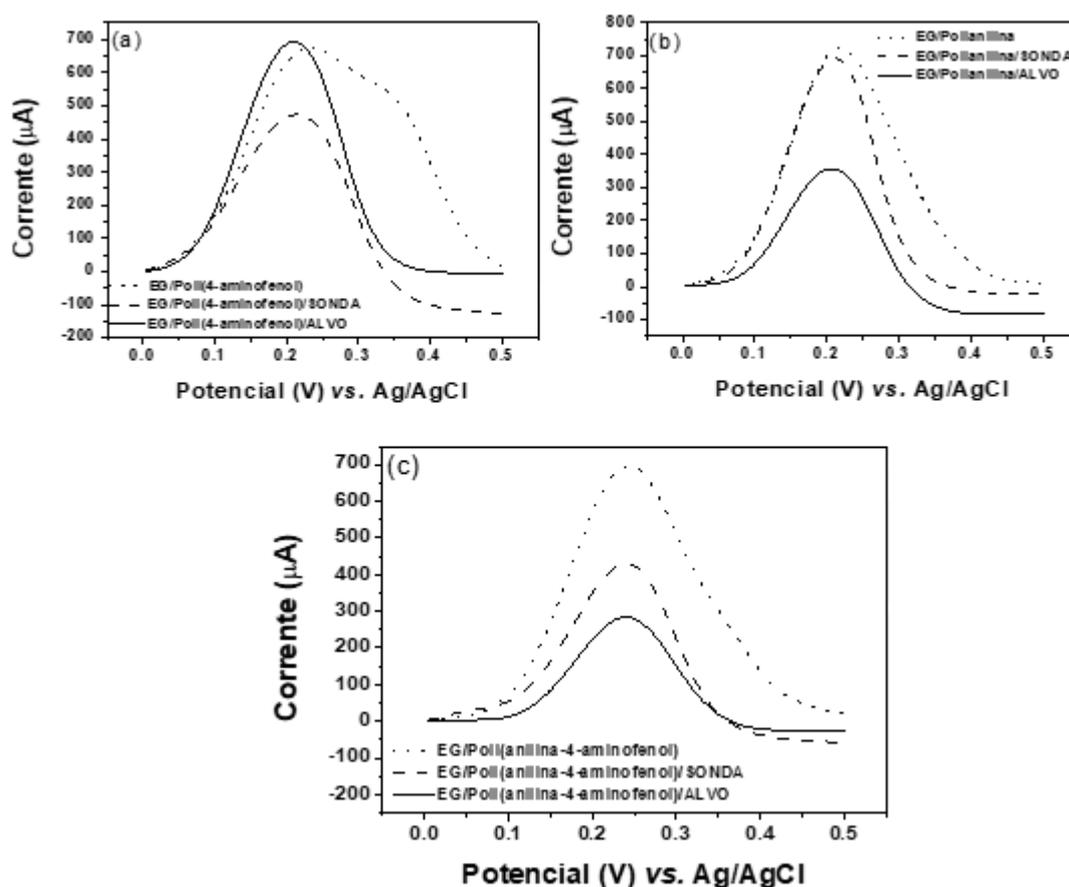
A imagem de EG/poli(anilina-4-aminofenol), Figura 30(c), apresenta um recobrimento com estruturas interligadas umas nas outras na forma de cadeia, mostrando assim que no processo de eletropolimerização do copolímero, a anilina e o 4-aminofenol se ligam, possivelmente, por interações de van der Waals e ligação de hidrogênio, devido aos grupos funcionais presentes em ambos os monômeros, formando consequentemente um filme com uma morfologia altamente compacta, resistente e com uma alta área superficial.

Dessa forma, de uma maneira geral, o copolímero apresentou características interessantes para a aplicação no desenvolvimento de imunossensores, como, elevada quantidade de grupos funcionais expostos e grande superfície de contato.

#### 4.5. Caracterização eletroquímica do imunossensor

As curvas referentes aos testes de imobilização da sonda Anti-T<sub>3</sub> diretamente sobre EG e EG/polianilina, EG/poli(4-aminofenol) e EG/poli(anilina-4-aminofenol) e posterior interação com o alvo-T<sub>3</sub> estão mostradas na Figura 31.

**Figura 31-** Comportamento eletroquímico de EG/poli(4-aminofenol) (a), EG/polianilina (b) e EG/poli(anilina-4-aminofenol) (c) frente as etapas de imobilização da sonda e interação sonda-alvo, obtidos por VPD em solução de K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 5,0 mmol L<sup>-1</sup> em meio de KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, com velocidade de varredura de 20 mV s<sup>-1</sup>.



Pelos resultados obtidos na Figura 31 é perceptível que o filme poli(4-aminofenol) [Figura 31(a)] apresenta boa resposta para a imobilização da sonda, devido a maior diminuição do sinal de corrente de pico, porém deve levar a uma imobilização aleatória dos anticorpos, possivelmente dificultando o acesso aos sítios ativos, o que não gera uma boa interação sonda-alvo, observado pelo valor maior de corrente, sendo que o esperado era a

diminuição da mesma, já que na superfície do eletrodo estaria presentes grandes quantidades de grupos funcionais expostos.

Já a polianilina [Figura 31(b)] apresentou melhores resultados, apesar sugerirem que a incorporação das biomoléculas sonda não foi adequada, observado pela pouca diferença entre os sinais filme-sonda, podendo ser explicada pela presença de poucas biomoléculas expostas presentes na camada na interface eletrodo-solução, acarretando uma menor dificuldade à transferência eletrônica com relação ao EG/polianilina sem sonda. Assim, é esperado que a interação entre os dois monômeros para a formação do copolímero, leva a combinação de ambas as propriedades para melhora da resposta eletroquímica.

É observado também para o copolímero [Figura 31(c)] que a resposta eletroquímica utilizando o mesmo foi melhor quando comparada a dos outros filmes isolados, devido a redução significativa da corrente, tanto na adição da sonda quanto na do alvo, significando uma boa incorporação das biomoléculas.

Visando potencializar os resultados obtidos com o copolímero, foi utilizado EDC-NHS, de suma importância para imobilização do anticorpo Anti-T<sub>3</sub>, para ativação da superfície de EG/poli(anilina-4-aminofenol).

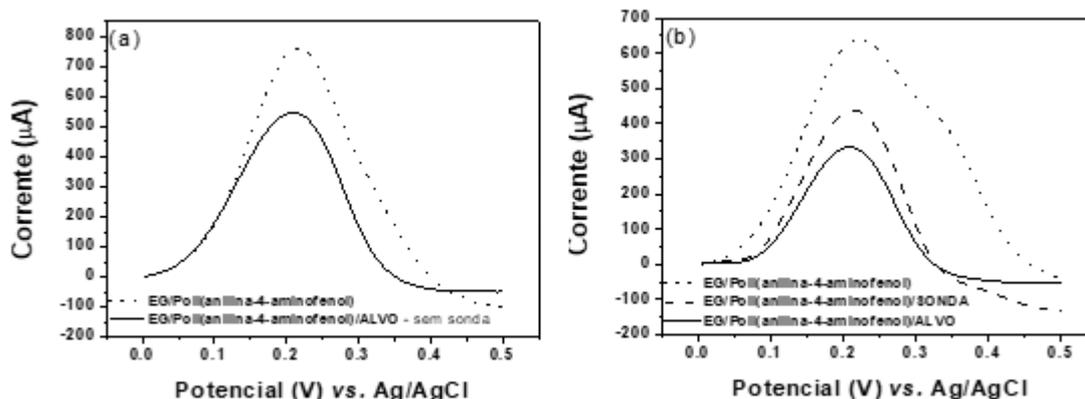
Essa imobilização do anticorpo Anti-T<sub>3</sub>, na presença de EDC-NHS, tem por objetivo evitar uma adsorção aleatória ou a aglomeração das moléculas do anticorpo sobre o eletrodo, que pode ocasionar repulsões eletrostáticas entre grupos expostos e, conseqüentemente, enfraquecer a interação, comprometendo assim, os resultados ao longo da realização dos ensaios.

Outra etapa indispensável, quando utiliza-se a imobilização do anticorpo Anti-T<sub>3</sub>, na presença de EDC-NHS, é a etapa de lavagem com solução de etilenodiamina, que tem como finalidade, desativar os grupos funcionais ativados inicialmente e que não se ligaram a nenhum anticorpo.

E por fim, com o objetivo de bloquear a superfície do eletrodo, para evitar a ocorrência de reações não específicas ou não desejáveis é utilizado a imobilização da molécula de glicina sobre a superfície do eletrodo.

A Figura 33 mostra os voltamogramas obtidos por VPD em K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 5,0 mmol L<sup>-1</sup> em meio de KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, do copolímero submetido a interação com alvo T<sub>3</sub> presente no soro sem a molécula sonda e do mesmo, submetido a imobilização da sonda utilizando EDC-NHS, com o intuito de verificar a possível melhora na resposta eletroquímica durante a detecção do alvo, o que é esperado.

**Figura 32-** Voltamogramas obtidos por VPD em  $K_4Fe(CN)_6$   $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em meio de  $KCl$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , de EG/poli(anilina-4-aminofenol) submetido a interação com alvo  $T_3$  presente em soro na ausência da molécula sonda (a) e de EG/poli(anilina-4-aminofenol) submetido a imobilização da sonda utilizando solução equimolar de EDC-NHS ( $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) (b).



É observada na Figura 32, que a detecção do alvo, sem a imobilização da biomolécula com sonda, ocorre a interação de outras espécies presentes no soro na superfície do copolímero, devido a diminuição significativa do sinal de resposta, ficando assim evidente que a imobilização da sonda Anti- $T_3$  é crucial para a interação específica com o alvo  $T_3$ , evitando a ocorrência de reações inespecíficas na superfície do eletrodo.

Na Figura 32(b), a etapa de imobilização do anticorpo Anti- $T_3$ , na presença de EDC-NHS, não apresentou diferenças significativas nos sinais quando comparados a imobilização sem a utilização de EDC-NHS [Figura 32(a)]. Porém é perceptível uma melhora nos desvios-padrão (de  $\pm 17,8$  para  $\pm 9,4$ ), o que indica que a utilização de EDC-NHS para a imobilização promove uma orientação das biomoléculas sonda, deixando o sítio de ligação do antígeno mais exposto e disponível para interação com o alvo.

Esta pequena diminuição da intensidade de corrente, quando é empregado o EDC-NHS para a imobilização do anticorpo Anti- $T_3$ , pode ser explicado pela presença das biomoléculas que causam um impedimento da superfície polimérica do eletrodo, dificultando a chegada das espécies eletroativas em solução. Outra possível explicação é que as biomoléculas podem estar causando alguma modificação nos grupos funcionais dos filmes poliméricos, seja uma oxidação ou redução, que dificulta o processo de transferência de carga no eletrodo.

A interação sonda-alvo foi mais pronunciada sobre o copolímero poli(anilina-4-aminofenol), como é mostrado na Figura 32, que apresentou a maior redução de corrente de pico, quando comparado aos demais: polianilina e poli(4-aminofenol) sugerindo que foi

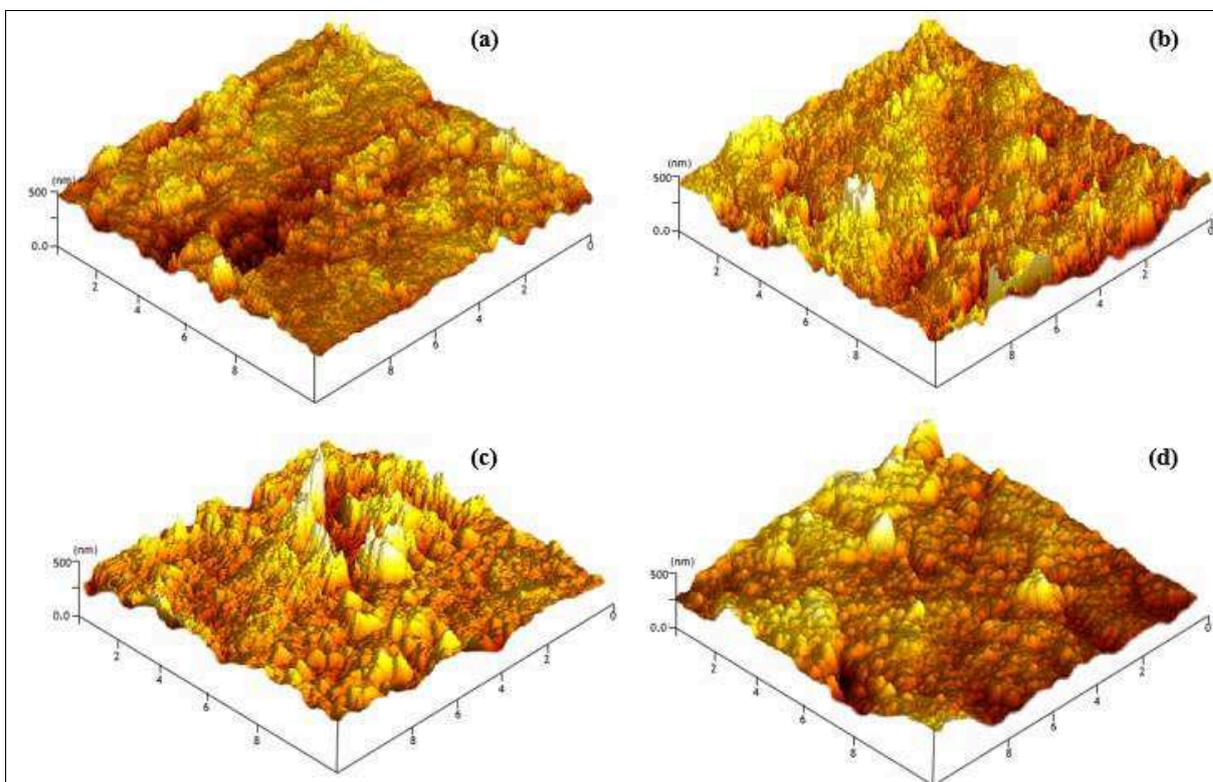
imobilizado uma maior quantidade de anti-T<sub>3</sub> na superfície do eletrodo de poli(anilina-4-aminofenol).

Dessa forma, pode-se dizer que esta diferença foi decorrente do efeito sinérgico dos dois monômeros utilizados e se mostra bastante promissor para aplicação do material na interação imunológica com o alvo T<sub>3</sub>, visto que a imobilização de maior quantidade de biomolécula sonda aumenta a quantidade de sítios de ligação do antígeno.

#### 4.6. Microscopia de Força Atômica (AFM) das etapas de construção do imunossensor

A Figura 33 mostra as imagens obtidas por AFM para EG modificados a cada etapa de construção do imunossensor. A Tabela 5 mostra os valores de altura média (Rz), rugosidade média (Ra) e rugosidade média quadrática (Rq) das medidas de AFM.

**Figura 33-** Imagens de AFM para EG/copolímero (a), EG/ EG/copolímero/sonda (b), EG/copolímero/sonda/glicina (c), EG/copolímero/alvo (com bloqueio) (d).



FONTE: AUTORA, 2018

**Tabela 5-** Valores de altura média (Rz), rugosidade média (Ra) e rugosidade média quadrática (Rq), obtidos por AFM dos eletrodos analisados em cada etapa de construção do imunossensor.

Modificações	Rz (nm)	Ra (nm)	Rq (nm)
EG/copolímero	1007	90	120
EG/copolímero/sonda	853	51	69
EG/copolímero/sonda/glicina	902	53	73
EG/copolímero/sonda/glicina/alvo	503	43	55

FONTE: AUTORA, 2018

É possível visualizar que o EG/copolímero, Figura 33(a), cuja morfologia já foi discutida no item 4.2, em conjunto com a análise de MEV, é o material com o maior valor de altura média (Rz), rugosidade média (Ra) e rugosidade média quadrática (Rq), comparado com os demais.

Na adição de sonda Anti-T<sub>3</sub>, Figura 33(b), percebe-se uma diminuição na rugosidade da superfície, quando comparado ao EG/copolímero, Tabela 5, sugerindo que o Anti-T<sub>3</sub> age no preenchimento de espaços entre o grafite e a superfície polimérica, encobrindo alguns grupos expostos. Já na adição da glicina, Figura 33(c), houve um aumento de todos os parâmetros avaliados, em relação a adição da sonda, fato esse que é evidenciado pela formação de picos mais pontiagudos e maiores.

Por fim, após interação com moléculas alvo T<sub>3</sub>, Figura 33(d), é possível visualizar que os vales pontiagudos antes observados, agora apresentam uma morfologia mais globular, com uma superfície mais uniforme, sugerindo a formação de imunocomplexos. A diminuição da rugosidade observada, também evidencia a presença de ligações fortes e um acoplamento orientado do alvo à superfície modificada do eletrodo.

## 5. CONCLUSÕES

As análises obtidas por espectroscopia vibracional na região do Infravermelho, para o copolímero poli(anilina-4-aminofenol) e para os filmes polianilina e poli(4-aminofenol), serviram para evidenciar a formação do filme proveniente da junção dos dois monômeros, bem como observar um aumento em quantidade dos grupos funcionais na superfície dos eletrodos de grafite.

Por meio dos estudos eletroquímicos dos filmes polianilina, poli(4-aminofenol) e poli(anilina-4-aminofenol) utilizando as técnicas de voltametria cíclica, foi possível conhecer o perfil eletroquímico dos mesmos em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ , bem como verificar a eficiência da modificação dos eletrodos de grafite com a união dos monômeros anilina e 4-aminofenol, comparativamente aos eletrodos com a presença dos outros filmes, bem como conhecer o perfil eletroquímico dos mesmos em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ .

A eficiência da modificação dos eletrodos de grafite com o copolímero, observada ao longo dos experimentos, se deve a formação de uma maior quantidade de filme, cujas propriedades eletroquímicas são superiores às dos polímeros polianilina e poli(4-aminofenol) isolados, aumentando consequentemente, a possibilidade de que mais material biológico seja imobilizado sobre a superfície do imunossensor, devido ao aumento de grupos funcionais do filme. Além de evidenciar um aumento na resistência elétrica, quando comparado ao poli(4-aminofenol) e uma melhora na transferência eletrônica quando comparado a polianilina, resultando assim, em um estado intermediário de resistência aos dois filmes isolados.

Quanto as caracterizações eletroquímicas do imunossensor, foi possível notar o sucesso na imobilização da biomolécula, por meio da utilização do EDC-NHS sobre a superfície do copolímero, quando comparado aos outros filmes (polianilina e poli(4-aminofenol)), evidenciado pela diminuição na intensidade da corrente de pico de oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  quando comparado ao seu respectivo filme na ausência da sonda.

Foi observado também que o copolímero se mostrou bastante promissor para aplicação do material na interação imunológica com o alvo  $\text{T}_3$ , visto que a imobilização de maior quantidade de biomolécula sonda aumentou a quantidade de sítios de ligação do antígeno, diminuindo a intensidade da corrente de pico de oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  e melhorando a sensibilidade de imunossensor.

Por fim, 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.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUGUSTO, T. **Introdução a Polímeros Condutores: Síntese e Caracterização Eletroquímica da Polianilina**. 2009, 2p. Trabalho de conclusão - Universidade de São Paulo - Instituto de Química, São Paulo.
- CARRAZZA, Leonardo Gomes. **Hormônios tireoidianos, TSH, desempenho e qualidade de carcaça e carne em suínos imunocastrados alojados em diferentes sistemas de criação**. 2012. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.
- CASTILLO, J., et al., **Biosensors for life quality - Design, development and applications**. Sensors and Actuators B-Chemical, 2004. 102(2): p. 179-194.
- CASTRO, A. C. H.; FRANCA, E. G.; DE PAULA, L. F.; SOARES, M. M. C. N.; GOULART, L. R.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G. **Preparation of genosensor for detection of specific DNA sequence of the hepatitis B virus**. Applied Surface Science, v. 314, p. 273-279, 2014.
- CECCHETTO, J. **Desenvolvimento de biossensor eletroquímico para diagnóstico de dengue**. 2014. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.
- CHEN, J. C.; CHUNG, H. H.; HSU, C.T.; TSAI, D. M.; KUMAR, A. S.; ZEN, J. M. A disposable single-use electrochemical sensor for the detection of uric acid in human whole blood, Sensors and Actuators B: Chemical 110:364-369, 2005.
- COSNIER, S., **Biosensors based on electropolymerized films: new trends**. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2003. 377(3): p. 507-520.
- DEEPSHIKHA, T. **A Review on Synthesis and Characterization of Nanostructured Conducting Polymers (NSCP) and Application in Biosensors**. Analytical Letters, 2011. 44(6): p. 1126-1171.
- FERREIRA, D. C.; RODRIGUES, L. P.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, Ana Graci; OLIVEIRA JR., R. T. S.; ABRAHAO JUNIOR, O.. **Graphite Electrodes Modified with poly(3hydroxybenzoic acid) for Oligonucleotides Sensors**. International Journal of Electrochemical Science (Online), v. 9, p. 6246-6257, 2014.
- GOUVEIA, S.; LEITÃO, F.; RIBEIRO, C.; CARRILHO, F. **Fatores de Interferência no estudo da função tireoideia**. Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, n. 11, 2016. p. 277-286.
- HAWLEY, D.; ADAMS, R. N.; J. **Measurement of chemical reaction rates following electron transfer. An empirical approach using ring-disk electrodes**. Electroanal. Chem. 1965, 10, 376.

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.

LEE, Jeong-O et al. **Aptamers as Molecular Recognition Elements for Electrical Nanobiosensors**. *Anal Bioanal Chem*, v.390, p.1023-1032, 2008.

LI, G.; MA, N. Z.; WANG, Y. **A new handheld biosensor for monitoring blood ketones**, *Sens. Actuators, B*. 109:285-290, 2005.

LUNARDELLI, E. A. R.; **Efeito dos modelos experimentais de hipertireoidismo e hipotireoidismo sobre aspectos bioquímicos e comportamentais em ratos adultos**. 2007. 129 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

MARQUES, R. C. B. **Imunossensores Eletroquímicos para o Diagnóstico Precoce e Descentralizado do Cancro da Mama**. 2013. 86 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Computação e Instrumentação Médica, Departamento de Física, Instituto Superior de Engenharia do Porto, Porto, Portugal, 2013.

MATTOSO, L. H. C. **Polianilinas: síntese, estruturas e propriedades**. *Química Nova*, v. 19(4), p. 388-399, 1996.

MAURANO, C. H. F.; GALLAND, G. B.; MAULER, R. S.. **Influência da Estrutura de Diferentes Copolímeros de Etileno e  $\alpha \alpha \alpha \alpha \alpha$ -Olefinas na Funcionalização com Anidrido Maleico**. 1998. 10 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

MEHRVAR, M., M. Abdi, **Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors**. *Analytical Sciences*, 2004. 20(8): p. 1113.

MESSIAS, E. R. R.; CARMONA, M. J. C.; AULER, J. O. C.; **Hormônios Tireóideos A Cirurgia Cardíaca**. *Rev Bras Anesthesiol*, 49:403-410, 1999.

MORILLO, A. C. V. **Eletrodo quimicamente modificado com nanopartículas de prata estabilizadas em heparina aplicado na determinação de ácido clorogênico**. 2017. 52 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2017.

NASCIMENTO, V. B., ANGNES, L. **Eletrodos fabricados por "silkscreen"**, *Química Nova*, 21: p.614-629, 1998.

OLIVEIRA, J. C. V. **Desenvolvimento de imunossensor baseado na imobilização de anticorpo monoclonal em fibroína da seda para diagnóstico rápido da cisticercose bovina**. 2014. 132 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Instituto de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

PATHAK, P.; KATIYAR, V. K.; GIRI, S. **Cancer Research - Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer**. *Research. AZojono Journal of Nanotechnology Online*, v.3, set 2007.

- PAULI, G. E. N.; **Desenvolvimento de um biossensor imunocromatográfico e o uso de feofitina-B em sensores eletroquímicos.** 2014. 166 f. Tese (Doutorado) - Curso de Física, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.
- PRON, A. RONNOU, P. **Processible conjugated polymers: from organic semiconductors to organic metals and superconductors.** Progress in Polymers Science, v. 27, p. 135-190, 2002.
- PUTZBACH, W.; RONKAINEN, N. **Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review.** Sensors, n. 13, 2013. p. 4811-4840.
- RATES, S. C. B. **Síntese e caracterização do copolímero Poli(anilina-co-melanina).** 2006. 86 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Mecânica, Departamento de Pesquisa e Pós-graduação, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- REZENDE, R. F. M. C., MARTIN, I. M., DE PAOLI, M. A. **Polímeros Condutores Intrínsecos e Seu Potencial em Blindagem de Radiação Eletromagnéticas.** Polímeros:Ciência e Tecnologia.São Paulo, Brasil. v.10, n.3, p.130-137, 2000.
- RIBOVSK, L.; **Biossensores eletroquímicos para fins ambientais e medicinais.** 2015. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Física, Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.
- RICCARDI, C. S.; COSTA, Paulo, I.; YAMANAKA, H. (Ed.). **Imunossensor amperométrico.** Química Nova, Araraquara, v. 25, n. 2, p.316-320, 17 out. 2001.
- ROCHA, C. G., **Desenvolvimento de imunossensor impedimétrico para detecção do corante disperso Red 1.** 2014. 111 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.
- ROCHA, F, C, R. **Polímeros condutores: Descoberta e aplicações,** 2000. Química Nova na Escola. n. 12, p. 11 -12, 2000. Disponível em: <http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc12/v12a03.pdf> acesso em: 17.out. 2018.
- RODRIGUES, P. C. **Síntese, caracterização e correlações / estrutura/ propriedades de redes mistas de polianilina/poliuretano com arquitetura molecular pré desenhada.** 2004. 115 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.
- SANTANA, L. K. L. **Desenvolvimento de imunossensor para detecção de fator de necrose tumoral alfa humano (tnf-  $\alpha$ ).** 2016. 55 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.
- SANTOS, Wilney J. R. et al. **Synthesis, Characterization and Kinetics of Catalytically Active Molecularly Imprinted Polymers for the Selective Recognition of 4-Aminophenol.** Campinas, v. 20, n. 5, p.820-825, jan. 2009.
- SEGATTO, M. S.; **Desenvolvimento da plataforma de grafite funcionalizada com poli(ácido 4-hidroxifenilacético) sobre óxido de grafeno reduzido-nanopartículas de ouro, para detecção do hormônio triiodotironina.** 2017. 114 f. Dissertação (Mestrado) -

Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

SILVA, L. M. C.; **Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para fenol e uréia com foco na aplicação ambiental.** 2011. 154 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Programa de Pós-graduação Tecnologia de Processos Químicos e Biológicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

SYED, A. A., DINESON, M. K.. **Polyaniline: a novel polymeric material.** Talanta, v. 38, p. 815837, 1991.

TYMECKI, L.; KONCKI, R. **Thick-film potentiometric biosensor for bloodless monitoring of hemodialysis, Sens. and Actuators .B** 113:782-786, 2006.

VIEIRA, S. N.; FERREIRA, L. F.; FRANCO, D. L.; AFONSO, A. S.; GONÇALVES, R. A.; MADURRO, A. G. B.; MADURRO, J. M. **Electrochemical Investigation of Oligonucleotide-DNA Hybridization on Poly(4-Methoxyphenethylamine).** Macromol. Symp, 2006. 236-242.

WAJNER, S. M.; WAGNER, M. S.; FERNANDES, N. S.; MAIA, A. L.; **O papel dos hormônios tireoidianos na função testicular.** Hospital de clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, v. 28, n. 1, p.8-41, jan. 2008.

WANG, J. From DNA **Biosensors to Gene Chips.** *Nucleic Acids Research*, v.28, n.16, p.30113016, 2000.

YOKOYAMA, M., **Development and Characterization of Controlled Drug Delivery Using Nanoparticles.** *Crit. Rev. Drug Carr. Sys.*, 1992, 9 213.

ZARAGOSA, C. E. A.; HERNÁNDEZ, E. C. A.; ESTRADA, M. A.; KOBAYASHI, T. **Synthetic Metal.** 204, 2016. 5-13.