



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química
Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia



MÔNICA SILVA SEGATTO

**Eletrossíntese orgânica e caracterização do copolímero poli(anilina-co-4-aminofenol)
para aplicação em imunossensor de biomarcador de distúrbios da tireoide**

Uberlândia

2021

MÔNICA SILVA SEGATTO

**ELETROSSÍNTESE ORGÂNICA E CARACTERIZAÇÃO DO COPOLÍMERO
POLI(ANILINA-CO-4-AMINOFENOL) PARA APLICAÇÃO EM IMUNOSSENSOR
DE BIOMARCADOR DE DISTÚRBIOS DA TIREOIDE**

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

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

Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

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

UBERLÂNDIA

2021

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S454 2021	<p>Segatto, Mônica Silva, 1992- Eletrossíntese orgânica e caracterização do copolímero poli(anilina-co-4-aminofenol) [recurso eletrônico] : para aplicação em imunossensor de biomarcador de distúrbios da tireoide / Mônica Silva Segatto. - 2021.</p> <p>Orientador: João Marcos Madurro. Coorientadora: Ana Graci Brito Madurro. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Química. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2021.432 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Química. I. Madurro, João Marcos, 1961-, (Orient.). II. Madurro, Ana Graci Brito, 1967-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Química. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 54</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química
 Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 5I - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3239-4385 - www.cpgquimica.iq.ufu.br - cpgquimica@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico, 117, PPGQUI				
Data:	Vinte e nove de julho de dois mil e vinte e um	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	18:40
Matrícula do Discente:	11723QMI003				
Nome do Discente:	Mônica Silva Segatto				
Título do Trabalho:	Eletrossíntese orgânica e caracterização do copolímero poli(anilina-co-4-aminofenol) para aplicação em imunossensor de biomarcador de distúrbios da tireoide				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Eletroquímica Aplicada				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Desenvolvimento de biossensores para detecção de doenças				

Reuniu-se por meio de webconferência, Plataforma Microsoft Teams, link <https://teams.microsoft.com/l/meetup-join/19:a7c4aec42830464eaef91d865e5a1f5d@thread.tacv2/1627596071421?context=%7B%22Tid%22:%22cd5e6d23-cb99-4189-88ab-1a9021a0c451%22,%22Oid%22:%229a9fd718-8aa7-47c2-bdbe-937502e4d21e%22%7D>, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: Marcelo Mulato, da Universidade de São Paulo; Lívia Flório Sgobbi, da Universidade Federal de Goiás; Edmar Isaías de Melo e Bruno Henrique Sacoman Torquato da Silva, da Universidade Federal de Uberlândia e João Marcos Madurro, orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. João Marcos Madurro, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **João Marcos Madurro, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/07/2021, às 19:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Henrique Sacoman Torquato da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/07/2021, às 19:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Edmar Isaias de Melo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/07/2021, às 19:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Livia Flório Sgobbi, Usuário Externo**, em 02/08/2021, às 18:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Mulato, Usuário Externo**, em 11/08/2021, às 20:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2889295** e o código CRC **B225083D**.

Dedico esta Tese aos meus amados pais, José Ricardo e Liliane, fontes inesgotáveis de apoio, amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao Autor de todas as obras, Deus, por enviar seu Santo Espírito para me dar coragem, força e sabedoria para concluir este trabalho.

Aos familiares de casa, mamãe, papai e Danilo, por serem portos-seguro, amor incondicional e resiliência, suportando todos momentos de ausência e estresse.

Ao meu noivo, Gustavo Henrique, que com muito amor e paciência ofereceu conforto em dias difíceis, incentivo em dias de desânimos, e carinho, amor e alegria em todos os dias.

A toda a minha família muito unida, avós, tios, primos, afilhado, cunhadas e sogros por orações e momentos de descontração.

Aos amigos de laboratório que compartilham comigo de mesmo ideal, trabalhando juntos e dividindo dores e alegrias, sendo um o alicerce do outro, tornando a missão mais leve.

Aos colegas de trabalho da Fazenda Glória, pelos incentivos, por compreenderem e colaborarem com algumas ausências para desenvolvimento de atividades acadêmicas.

Aos professores João Marcos e Ana Graci por confiarem em mim para o desenvolvimento deste trabalho, sempre proporcionando discussões e ensinamentos que contribuíram para aprofundar meu aprendizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química e todos envolvidos que sempre me ajudaram com situações levantadas, sempre com muita disposição.

Aos membros da banca pelo aceite, pelo cuidado com que leram este trabalho e pelas questões levantadas que auxiliaram em uma melhor explanação e fechamento do trabalho.

Aos órgãos de Fomento pelo financiamento da pesquisa, em especial, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*Devo cumprir, ó Deus, os votos que vos fiz e vos
oferto um sacrificio de louvor, porque da morte
arrancastes minha vida e não deixastes os meus
pés escorregarem, para que eu ande na
presença do Senhor, na presença do Senhor na
luz da vida*

Salmo Responsorial 56: 12-13

RESUMO

Biossensores eletroquímicos são ferramentas versáteis para o diagnóstico clínico, pois dentre tantas vantagens, apresentam boa sensibilidade e seletividade, e baixos tempos de respostas. O emprego de polímeros condutores como matriz para imobilização de biomoléculas contribui para a biocompatibilidade de biossensores, pois há exposição de grupos funcionais que propiciam um microambiente favorável. O objetivo deste trabalho foi a preparação e caracterização de um novo material polimérico para aplicação em biossensores, o copolímero derivado dos monômeros 4-aminofenol e anilina, nomeado como poli(anilina-co-4-aminofenol) – 4-PANAP. O copolímero foi eletropolimerizado na superfície de eletrodos de grafite, aplicando-se varreduras cíclicas de potenciais em meio ácido contendo a mistura comonomérica. Os resultados de caracterização eletroquímica, morfológica e estrutural indicaram a formação de um novo material com características híbridas entre o poli(4-aminofenol) (P4AP) e a polianilina (PANI). O 4-PANAP apresentou picos redox na região de P4AP com densidade de carga similar a PANI, com comportamento intermediário entre os dois frente a transferência eletrônica. A morfologia de 4-PANAP resultou em formas de fibras interconectadas, diferente da globular PANI e fibras estiradas de P4AP. Espectros de infravermelho revelam que ambos grupos funcionais característicos de P4AP e PANI permanecem em 4-PANAP. A aplicação em biossensores foi avaliada frente ao desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico para detecção do hormônio tireoidiano 3,5,3'-triodotironina (T3). O estudo do imunossensor para T3 permitiu a avaliação das melhores condições de eletrossíntese do copolímero frente a detecção de T3, que foi a eletropolimerização com uma mistura monomérica equimolar (1:1), na faixa de potencial de $-0,1$ a $+1,2$ V em 50 mV s⁻¹. A partir da construção da curva analítica, foi alcançada relação linear entre a corrente anódica e a faixa de concentração de T3, na faixa de trabalho de $0,2$ a $8,8$ $\mu\text{g mL}^{-1}$, com um limite de detecção de $0,60$ $\mu\text{g mL}^{-1}$ e um limite de quantificação de $1,80$ $\mu\text{g mL}^{-1}$. A plataforma proposta manteve 90 % do sinal analítico após um período de 60 dias, cujos resultados se mostraram promissores para aplicações reais, obtendo-se sucesso na performance da plataforma.

Palavras-chave: Copolímero. 4-aminofenol. Anilina. Eletropolimerização. Imunossensor eletroquímico.

ABSTRACT

Electrochemical biosensors are versatile tools for clinical diagnosis, because among so many advantages, they have good sensitivity and selectivity and low response times. The use of conducting polymers as a matrix for immobilization of biomolecules contributes to the biocompatibility of biosensors, as there is exposure of functional groups that provide a favorable microenvironment. The objective of this work was the preparation and characterization of a new polymeric material for application in biosensors, the copolymer derived from the monomers 4-aminophenol and aniline, named as poly(aniline-co-4-aminophenol) – 4-PANAP. The copolymer was electropolymerized on the surface of graphite electrodes, applying cyclical potential scans in an acid medium containing the comonomer mixture. The results of electrochemical, morphological and structural characterization indicated the formation of a new material with hybrid characteristics between poly(4-aminophenol) (P4AP) and polyaniline (PANI). 4-PANAP showed redox peaks in the P4AP region with charge density similar to PANI, with an intermediate behavior between the two against electron transfer. The morphology of 4-PANAP resulted in forms of interconnected fibers, different from the globular PANI and stretched fibers of P4AP. Infrared spectra reveal that both characteristic functional groups of P4AP and PANI remain in 4-PANAP. The application in biosensors was evaluated against the development of an electrochemical immunosensor to detect the thyroid hormone 3,5,3'-triiodothyronine (T3). The study of the immunosensor for T3 allowed the evaluation of the best conditions for electrosynthesis of the copolymer against the detection of T3, which was the electropolymerization with an equimolar monomeric mixture (1:1), in the potential range of -0.1 to $+1, 2$ V at 50 mV s⁻¹. From the construction of the analytical curve, a linear relationship between the anodic current and the T3 concentration range was reached, in the working range of 0.2 to 8.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$, with a detection limit of 0.60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and a limit of quantification of 1.80 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The proposed platform kept 90% of the analytical signal after a period of 60 days, whose results were promising for real applications, achieving success in the performance of the platform.

Keywords: Copolymer. 4-aminophenol. Aniline. Electropolymerization. Electrochemical immunosensor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Representação ilustrativa do biossensor proposto por Clark e Lyons em 1962. O eletrodo consiste de um (A) eletrodo de referência e (B) um eletrodo de trabalho no interior de um (C) cilindro, que é revestido ao fundo por uma membrana múltipla. No interior da célula contém um (D) eletrólito com composição variada, de acordo com a aplicação particular. Há uma (F) camada concentrada de enzima entre as (E) e (G) membranas semipermeáveis.....	23
Figura 2	– Representação ilustrativa dos componentes básicos de funcionamento do eletrodo comercial YSI 23A lançado em 1975.....	24
Figura 3	– Representação ilustrativa dos componentes básicos de um biossensor aplicados a diversos analitos.....	25
Figura 4	– Representações gráficas dos resultados obtidos por EIS nos seguintes modos: (a) Diagrama de Nyquist; (b) Diagrama de Bode, na forma $ Z $ vs. $\log(f/\text{Hz})$; e (c) Diagrama de Bode na forma φ vs. $\log(f/\text{Hz})$	28
Figura 5	– Sinais de excitação de potencial <i>versus</i> tempo; e respostas de corrente <i>versus</i> potencial empregados nas voltametrias de (a) pulso diferencial; (b) onda quadrada; e (c) cíclica.....	29
Figura 6	– Representação de término de crescimento de cadeia polimérica por (a) combinação de dois centros radicais; (b) desproporcionamento; (c) transferência de cadeia; e (d) transferência para o solvente.....	34
Figura 7	– Representação esquemática de cadeias poliméricas (a) lineares; (b) ramificadas; e (c) com ligação cruzada, onde os pontos de intercruzamento, denotados com um x , são constituídos por ligações covalentes intramoleculares.....	35
Figura 8	– Representação esquemática de cadeias poliméricas ramificadas do tipo (a) aleatória; (b) estrelada; e (c) pente.....	36
Figura 9	– Representações estruturais de alguns polímeros condutores.....	39
Figura 10	– Representações estruturais de (a) poláron; (b) bipolaron; e (c) sóliton...	40
Figura 11	– Representação estrutural (a) do monômero anilina; e (b) da polianilina.	41
Figura 12	– Mecanismo de eletropolimerização da PANI, ocorrendo a formação de (a) um cátion radical; (b) um dímero; e (c) um trímero.....	43
Figura 13	– Figuras ilustrativas de forma de nucleação do processo de eletropolimerização da PANI (a) de forma linear; e (b) na forma de precipitados.....	44

Figura 14	– Estruturas de conversão dos três estados de oxidação da PANI e suas formas dopadas.....	45
Figura 15	– Representação estrutural do monômero 4-aminofenol.....	47
Figura 16	– Representação do processo de oxidação do 4-aminofenol.....	47
Figura 17	– Representação estrutural da formação cátion-radical do 4-aminofenol pelo grupo amino e pelo grupo hidroxila e suas estruturas de ressonância.....	48
Figura 18	– Representação estrutural do (a) mecanismo proposto para a eletropolimerização da P4AP; e dos dímeros na forma (b) amina benzenóide; e (c) imina quinoide.....	49
Figura 19	– Caracterização do copolímero poli(anilina- <i>p</i> -aminofenol) do grupo de Gao e colaboradores, sendo: (a) voltamograma cíclico do poli(anilina- <i>p</i> -aminofenol) em H ₂ SO ₄ 0,5 mol L ⁻¹ ; velocidade de varredura: 100 mV s ⁻¹ ; (b) espectro do infravermelho do poli(anilina- <i>p</i> -aminofenol); e (c) imagem de microscopia eletrônica de varredura do poli(anilina- <i>p</i> -aminofenol).....	50
Figura 20	– Esquema ilustrativo para diagnóstico do hipertireoidismo.....	52
Figura 21	– Imagens ilustrativas de (a) uma célula eletroquímica de três eletrodos; dos eletrodos (b) auxiliar de platina; (c) de referência de Ag/AgCl/Cl ⁻ (KCl 3 mol L ⁻¹); (d) de trabalho de discos de grafite; (e) rosqueados em base condutora.....	56
Figura 22	– (a) Ilustração representativa da elaboração do imunossensor Anti-T3; e (b) Imunossensor após interação com alvo T3.....	63
Figura 23	– Voltamogramas cíclicos dos EG em solução do H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ para (a) condicionamento eletroquímico em diferentes velocidades de varredura; (b) último ciclo em 50 mV s ⁻¹	67
Figura 24	– Primeiros ciclos obtidos por VC na eletropolimerização da PANI 1,0 mmol L ⁻¹ e P4AP 1,0 mmol L ⁻¹ em meio de H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ na superfície de EG.....	69
Figura 25	– Voltamogramas cíclicos consecutivos da eletropolimerização de (a) PANI 1,0 mmol L ⁻¹ e (b) P4AP 1,0 mmol L ⁻¹ ; com 10 ciclos em meio de H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ , 50 mV s ⁻¹ , na superfície de EG.....	70
Figura 26	– Voltamogramas cíclicos obtidos em (a) H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ ; e em (b) KCl 0,1 mol L ⁻¹ contendo o par aniônico [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 5,0 mmol L ⁻¹ dos EG modificados com P4AP e PANI; velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹	71
Figura 27	– Espectros de infravermelho para (a) PANI e (b) P4AP.....	72

Figura 28	– Proposta de mecanismo de polimerização do P4AP.....	73
Figura 29	– Imagens de MEV com ampliação de 20.000 Kx para (a) PANI e (b) P4AP.....	74
Figura 30	– Imagens de AFM em três dimensões para (a) PANI e (b) P4AP.....	75
Figura 31	– Primeiro ciclo obtido por VC na eletropolimerização de 4-PANAP 1,0 mmol L ⁻¹ em meio de H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ na superfície de EG, velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹	76
Figura 32	– Voltamograma cíclico consecutivo da eletropolimerização de 4-PANAP 1,0 mmol L ⁻¹ ; com 10 ciclos em meio de H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ , 50 mV s ⁻¹ , na superfície de EG.....	76
Figura 33	– Voltamograma cíclico obtido em (a) H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ para 4-PANAP, 50 mV s ⁻¹	77
Figura 34	– Voltamogramas cíclicos comparativos entre 4-PANAP e seus homopolímeros.....	78
Figura 35	– Quantidade de Carga envolvida para cada filme polimérico.....	78
Figura 36	– Imagens de MEV para 4-PANAP com ampliação de (a) 1.000 Kx; (b) 20.000 Kx e (c) dados de sua espessura.....	80
Figura 37	– Imagens de AFM em três dimensões para 4-PANAP.....	81
Figura 38	– Espectros de infravermelho para (a) 4-PANAP; e (b) comparativo com P4AP e PANI.....	82
Figura 39	– Proposta de mecanismo para a formação de dímeros do 4-PANAP proposto por Lacerda.....	83
Figura 40	– Proposta de mecanismo de início de processo de eletropolimerização de 4-PANAP por via cinética, evidenciando a formação de um (a) dímero; e um (b) tetrâmero.....	85
Figura 41	– Primeiros voltamogramas cíclicos comparativos para o processo de eletropolimerização dos filmes 4-PANAP e (a) PANI e (b) P4AP.....	86
Figura 42	– Proposta de mecanismo de eletropolimerização de 4-PANAP.....	87
Figura 43	– Voltamogramas cíclicos obtido em H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ para 4-PANAP em diferentes condições de eletropolimerização utilizando a faixa de potencial de (a) -0,1 a +1,2 V; e (b) 0,0 a +0,8 V.....	90

Figura 44	– Voltamogramas de pulso diferencial com pico de oxidação do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$ 5,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ para os copolímeros 4-PANAP eletropolimerizados em diferentes condições: (a) grupo 1; (b) grupo 2; (c) grupo 3; (d) grupo 4; (e) grupo 5; (f) grupo 6; (g) grupo 7; e (h) grupo 8.....	92
Figura 45	– Gráfico de barras obtido do pico de oxidação do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$ 5,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ versus a superfície eletródica para os copolímeros eletropolimerizados em diferentes condições.....	93
Figura 46	– (a) Voltamogramas cíclicos em H ₂ SO ₄ 0,1 mmol L ⁻¹ para diferentes polímeros eletrossintetizados; e (b) quantidade de carga envolvida para cada filme polimérico.....	96
Figura 47	– Voltamogramas de pulso diferencial com pico de oxidação do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$ 5,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ para os polímeros: (a) 4-PANAP; (b) PANI; (c) P4AP; (d) P4AP+; (e) 4-PANAP+; e (f) gráfico de barras dos valores de I _{pa} versus superfícies copoliméricas biofuncionalizadas.....	97
Figura 48	– (a) Diagrama de Nyquist (Z'' vs. Z') dos eletrodos de grafite modificados com 4-PANAP e Anti-T3 antes e após contato com alvo T3; (b) Gráfico de Bode para a superfície 4-PANAP/SONDA; e (c) Gráfico de Bode para a superfície 4-PANAP/SONDA/ALVO, obtidos por EIS em K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe(CN) ₆ 1 mmol L ⁻¹ em meio de KCl 0,1 mol L ⁻¹ . Amplitude 10 mV; Intervalo de frequência: 10 000 a 0,01 Hz.	100
Figura 49	– Circuitos elétricos propostos para a interface (a) FILME-SONDA SOLUÇÃO; e (b) FILME-SONDA-ALVO SOLUÇÃO.....	101
Figura 50	– Imagens de AFM para eletrodos de grafite modificados com 4-PANAP contendo a biomolécula Anti-T3 imobilizada em sua superfície (a) antes; e (b) após contato com o alvo T3.....	103
Figura 51	– (a) Voltamogramas de pulso diferencial dos EG modificados com 4-PANAP contendo Anti-T3 imobilizado após a interação com diferentes concentrações do alvo T3 (0,2, 1,92, 3,64, 5,36, 7,08, e 8,8 µg mL ⁻¹). Eletrólito: solução de KCl (0,1 mol L ⁻¹) contendo K ₃ [Fe(CN) ₆] (5,0 mmol L ⁻¹). Módulo de amplitude: 50 mV. Intervalo de pulso: 0.2 s; 20 mV s ⁻¹ ; (b) Curva analítica da corrente de pico anódica vs. diferentes concentrações de T3 alvo na faixa de µg mL ⁻¹	104
Figura 52	– Estabilidade do imunossensor proposto utilizando a plataforma 4-PANAP.....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Representação da distribuição monomérica de copolímeros.....	37
Tabela 2	–	Valores de condutividade e cores das formas de PANI.....	46
Tabela 3	–	Descrição dos experimentos com relação as variáveis observadas.....	89
Tabela 4	–	Diferenças entre sinais de detecção obtidos a partir do pico de oxidação do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$ 5,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ para os 8 diferentes grupos de eletropolimerização.....	94
Tabela 5	–	Diferenças entre sinais de detecção obtidos a partir do pico de oxidação do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$ 5,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ para os diferentes filmes poliméricos.....	99
Tabela 6	–	Valores de I _{pa} de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$ 5,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ com seus respectivos desvios-padrão para superfícies imunossensoras com e sem a ativação com EDC-NHS.....	99
Tabela 7	–	Parâmetros elétricos para as etapas de biofuncionalização do copolímero 4-PANAP.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-AP - 4-aminofenol

4-PANAP - Poli(anilina-co-4-aminofenol)

AC - corrente alternada

AFM - microscopia de força atômica (*Atomic Force Microscopy*)

ANI - Anilina

Anti-T3 - anti-3,5,3'-triodotironina

ATR - reflectância total atenuada (*Attenuated Total Reflectance*)

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

EIS - espectroscopia de impedância eletroquímica (*Electrochemical Impedance Spectroscopy*)

ES - Esmeraldina

FT - Faixa de Trabalho

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

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LAFIP - Laboratório de Filmes Poliméricos

LAFOT-CM - Laboratório de Fotoquímica e Ciência dos Materiais

LE - Leucoesmeraldina

LOD - limite de detecção (*Limit of Detection*)

LOQ - limite de quantificação (*Limit of quantification*)

LR - Limites de Referência

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MIP - polímeros molecularmente impressos (*Molecularly Imprinted Polymer*)

NHS - N-hidroxisuccinimida

P4AP - Poli(4-aminofenol) ou poli-p-aminofenol

PANI - Polianilina

PG - Pernigranilina

pH - Potencial de Hidrogênio

TBG - globulina ligadora de tiroxina (*Thyroxine-Binding Globulin*)

TSH - hormônio estimulante da tireoide (*Thyroid Stimulating Hormone*)

VC - Voltametria Cíclica

VOQ - Voltametria de Onda Quadrada

VPD - Voltametria de Pulso Diferencial

YSI - *Yellow Springs Instruments Company*

LISTA DE SÍMBOLOS

T3 - 3,5,3'-triodotironina

T4 - L-tiroxina

Z' - impedância real

Z'' - impedância imaginária

φ - ângulo de fase

f - frequência

k_{ij} - constante de reatividade

v - velocidade da reação

r - razão de reatividade

Rz - altura média

Ra - rugosidade média

Rq - rugosidade média quadrática

Q - carga

I - corrente

I_p - corrente de pico

I_{pa} - corrente de pico anódica

t - tempo

E_p - potencial de pico

n - número de variáveis

R_s - resistência da solução eletrolítica

Qdl - elemento de fase constante

R_{ct} - resistência à transferência de carga

W - impedância de Warburg

S_b - desvio padrão do branco

b - coeficiente angular da curva de calibração

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	Biossensores Eletroquímicos.....	23
1.1.1	<i>Biossensores Impedimétricos.....</i>	26
<i>1.1.1.1</i>	<i>Espectroscopia de impedância eletroquímica.....</i>	<i>27</i>
1.1.2	<i>Biossensores Potenciométricos.....</i>	28
1.1.3	<i>Biossensores Voltamétricos.....</i>	28
<i>1.1.3.1</i>	<i>Voltametria de Pulso Diferencial.....</i>	<i>30</i>
<i>1.1.3.2</i>	<i>Voltametria de Onda Quadrada.....</i>	<i>31</i>
<i>1.1.3.3</i>	<i>Voltametria Cíclica.....</i>	<i>31</i>
1.2	Eletropolimerização.....	32
1.3	Polímeros.....	34
1.3.1	<i>Copolímeros.....</i>	36
1.3.2	<i>Polímeros condutores.....</i>	38
1.3.3	<i>Polianilina.....</i>	41
1.3.4	<i>Poli(4-aminofenol)</i>	46
1.3.5	<i>Poli(anilina-co-4-aminofenol)</i>	49
1.4	Hipertireoidismo.....	51
2.	OBJETIVO GERAL.....	54
2.1	Objetivos Específicos.....	54
3.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	55
3.1	Reagentes e soluções.....	55
3.2	Instrumentação.....	55
3.3	Seleção dos eletrodos de grafite.....	58
3.4	Armazenamento dos monômeros.....	59

3.5	Eletropolimerização dos polímeros polianilina e poli(4-aminofenol)..	59
3.6	Eletropolimerização do copolímero poli(anilina-co-4-aminofenol).....	59
3.7	Caracterização eletroquímica do copolímero 4-PANAP.....	61
3.8	Caracterização morfológica e estrutural do copolímero 4-PANAP.....	62
3.9	Construção de um biossensor para obtenção da melhor resposta do filme 4-PANAP.....	62
3.10	Avaliação eletroquímica do copolímero 4-PANAP frente ao biossensor.....	64
3.11	Construção da curva analítica.....	65
3.12	Estudo de estabilidade.....	66
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	67
4.1	Seleção dos eletrodos de grafite.....	67
4.2	Análise do perfil característico de PANI e P4AP.....	68
4.3	Eletropolimerização e caracterização eletroquímica do copolímero 4-PANAP.....	75
4.4	Caracterização morfológica e estrutural do copolímero 4-PANAP.....	79
4.5	Estudo das melhores condições de eletropolimerização de 4-PANAP frente ao imunossensor para T3.....	88
4.6	Estudo comparativo da resposta eletroquímica do imunossensor para T3 em outras superfícies.....	95
4.7	Caracterização eletroquímica do imunossensor proposto por EIS.....	100
4.8	Caracterização do imunossensor proposto por AFM.....	102
4.9	Construção da curva analítica.....	104
4.10	Estabilidade.....	106
5.	CONCLUSÃO.....	108
	REFERÊNCIAS.....	110

1. INTRODUÇÃO

Biossensores eletroquímicos têm recebido grande atenção em diagnósticos clínicos de vários analitos biológicos, pois apresentam boa sensibilidade, fácil fabricação e baixos tempos de respostas (NAWAZ *et al.*, 2018). Imunossensores eletroquímicos monitoram o sinal elétrico de um evento imunológico na interface eletrodo-solução. A combinação de características de dispositivos eletroquímicos, incluindo consumo mínimo de amostra, alta velocidade de detecção e potencial para sua miniaturização, tornam os biossensores eletroquímicos ferramentas poderosas em bioanálise e diagnóstico clínico (GUO *et al.*, 2015).

A imobilização de biomoléculas na superfície do eletrodo é o ponto-chave para o sucesso dos biossensores, uma vez que eles devem fornecer um arranjo de sítios ligantes disponíveis para interação com o alvo (GONZÁLEZ-TECHERA *et al.*, 2015). Polímeros condutores ou semicondutores são conhecidos por conter numerosas propriedades, permitindo atuar como excelentes materiais na imobilização de biomoléculas (SOGANCI *et al.*, 2014). O desenvolvimento de copolímeros pode fornecer estruturas diferentes daquelas de seus polímeros de origem, aumentando o número de grupos funcionais ou adicionando grupos diferentes em uma única estrutura (TURAN *et al.*, 2014).

O Laboratório de Filmes Poliméricos (LAFIP) tem investigado o polímero poli(4-aminofenol) como parte do desenvolvimento de biossensores eletroquímicos. Os trabalhos já concluídos indicam que a presença dos grupos hidroxila e amino em sua estrutura fornecem boa compatibilidade para imobilização de biomoléculas (ALVES-BALVEDI *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2016; PARAÍSO *et al.*, 2014; FRANCO *et al.*, 2008). Outro polímero bastante empregado em biossensores eletroquímicos é a polianilina, que contém funções amino na cadeia polimérica, mostrando boa estabilidade e fácil síntese (YUKIRD *et al.*, 2017).

A polianilina tem sido combinada com vários nanomateriais e nanopartículas para fabricação de compósitos, visando a melhoria das propriedades físico-químicas do material, que refletem no desempenho de biossensores, como a melhora na sensibilidade, diminuição de limites de detecção e/ou quantificação (PIGUILLEM *et al.*, 2018). A sensibilidade de um biossensor está relacionada com a capacidade de detectar alterações mínimas no sinal analítico. Os limites de detecção estão relacionados com as concentrações mínimas que podem ser relacionadas ao analito em uma amostra, que o diferencia de sinal de qualquer outra espécie

existente. Já os limites de quantificação da análise se relacionam com a quantidade mínima que pode ser quantificada com um certo grau de confiança (VIAL e JARDY, 1999).

Em um contexto geral, a busca por limites de detecção e quantificação cada vez menores é visado quando se deseja simplificar o método de coleta de amostra ou quando se trabalha com amostras que já possuem concentrações baixas do analito, como é o caso da determinação dos níveis de hormônios da tireoide. Os hormônios da tireoide existem em duas estruturas principais, L-tiroxina (T4) e 3,5,3'-triiodotironina (T3). Os níveis séricos considerados como normais para o T3(Livre) são de 2,00 a 4,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (SABIN, 2019). Qualquer desequilíbrio nos níveis de T3 pode levar à aparição de diversos sintomas e, conseqüente desencadeamento de distúrbios da tireoide.

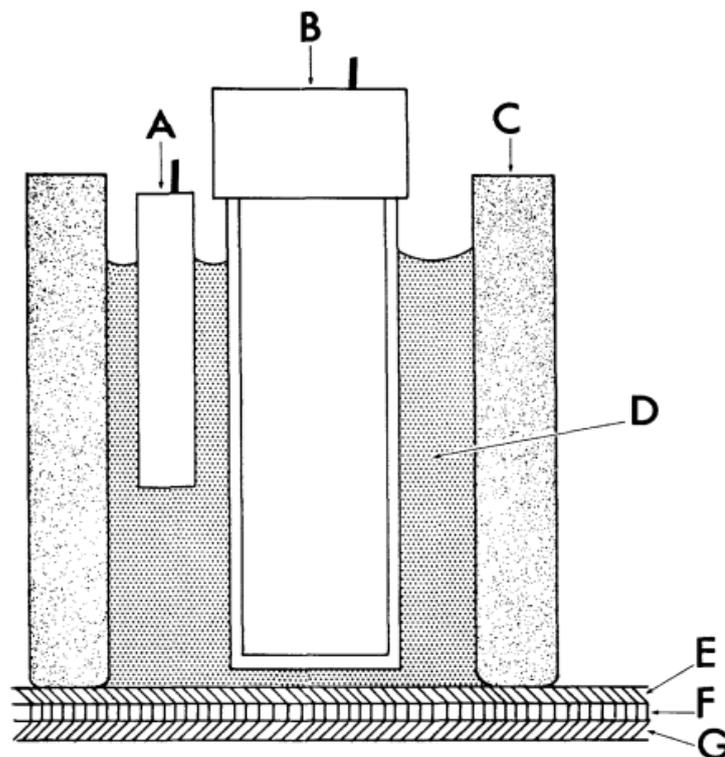
Os dois distúrbios primários das glândulas tireoides são o hipotireoidismo e o hipertireoidismo, que são relacionados aos estados de hipofuncionamento e hiperfuncionamento da glândula tireoide, respectivamente. A quantificação dos níveis hormonais da tireoide é considerada o protocolo padrão para diagnóstico de distúrbios da glândula, sendo a quantificação de T3 mais indicada em casos de hipertireoidismo (LIVINGSTON *et al.*, 2015), que é o quadro hipermetabólico, onde os níveis hormonais circulantes estão aumentados, causado pelo aumento na função da glândula tireoide (OLIVEIRA e MALDONADO, 2014).

Este trabalho descreve a preparação e caracterização de um novo material polimérico para aplicação em biossensores. Esse material polimérico foi proposto a partir da combinação de dois monômeros diferentes, 4-aminofenol e anilina, para síntese de um copolímero, nomeado como poli(anilina-co-4-aminofenol) (4-PANAP). A metodologia empregada para síntese foi a via eletroquímica sobre eletrodos de discos de grafite. Esse material copolimérico serviu como matriz para a imobilização do anticorpo específico anti-3,5,3'-triiodotironina (anti-T3), para aplicação em um imunossensor de T3.

1.1 Biossensores Eletroquímicos

A área de pesquisa em biossensores é uma área em ascensão, que vem ganhando seu espaço e reconhecimento frente a outras áreas de pesquisas, devido as principais vantagens, como alta seletividade, respostas rápidas, praticidade operacional de equipamentos de análise, simplicidade na preparação de amostras, alta sensibilidade, possibilidade de detecção em tempo real e baixos custos de produção (FATONI *et al.*, 2020). Os Biossensores são definidos pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*) como “um dispositivo que usa reações bioquímicas específicas mediadas por enzimas isoladas, imunossistemas, tecidos, organelas ou células inteiras para detectar compostos químicos usualmente por sinais elétricos, térmicos ou ópticos” (IUPAC, 1997).

Figura 1 – Representação ilustrativa do biossensor proposto por Clark e Lyons em 1962. O eletrodo consiste de um (A) eletrodo de referência e (B) um eletrodo de trabalho no interior de um (C) cilindro, que é revestido ao fundo por uma membrana múltipla. No interior da célula contém um (D) eletrólito com composição variada, de acordo com a aplicação particular. Há uma (F) camada concentrada de enzima entre as (E) e (G) membranas semipermeáveis

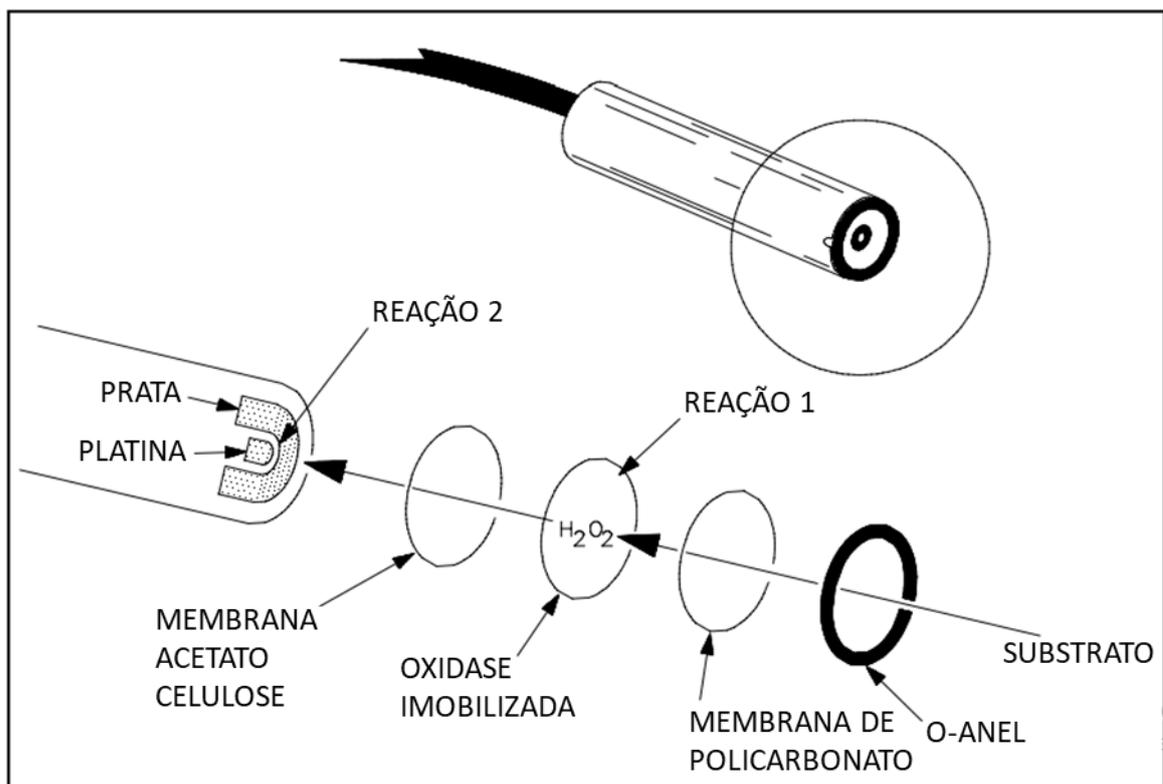


FONTE: CLARK JR e LYONS, 1962, p. 40.

Baseado nesta definição, a essência de um biossensor está no uso de biomoléculas para geração de um sinal detectável, quando conectado a um sistema de transdução. O primeiro modelo de biossensor foi produzido em 1962, com a proposta de usar uma fina camada da enzima glicose oxidase entre camadas de membranas semipermeáveis, acopladas em uma célula eletrolítica com um eletrodo de vidro de potencial de hidrogênio (pH), como pode ser visualizado na Figura 1. Nesse sistema, a glicose difundida entre as membranas era convertida em ácido glucônico, que provocava uma queda nos valores de pH, cuja magnitude estava relacionada com a concentração de glicose (CLARK JR e LYONS, 1962).

Apresentando características como rápido tempo de resposta, fácil uso e fabricação, além de capacidade de autoclavagem, tamanho pequeno e alta especificidade, o sucesso da proposta de biossensor foi tanto que, em 1975, foi lançado o primeiro biossensor comercial vendido pela *Yellow Springs Instruments Company* (YSI; Yellow Springs, Ohio, USA). Esse biossensor foi baseado na determinação da glicose a partir da detecção amperométrica de peróxido de hidrogênio (SETFORD e NEWMAN, 2005), cujo princípio básico pode ser visto na Figura 2.

Figura 2 – Representação ilustrativa dos componentes básicos de funcionamento do eletrodo comercial YSI 23A lançado em 1975

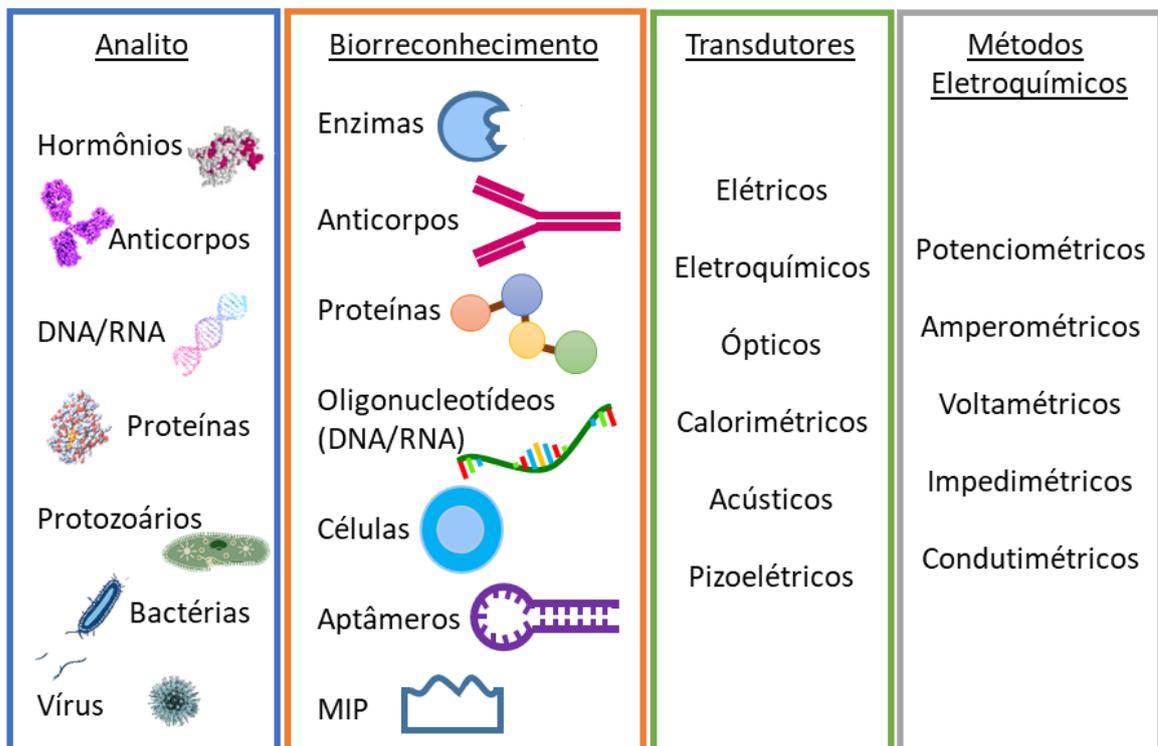


FONTE: adaptada de YSI LIFE SCIENCES, 2009.

Atualmente há uma série de biomoléculas que são usadas na etapa de bioreconhecimento, que é o evento de interação entre biomoléculas para promoção de um sinal, como é o exemplo da etapa ‘REAÇÃO 1’ na Figura 2, assim como há uma série de transdutores disponíveis para promover a transdução do sinal bioquímico em um sinal analítico útil.

Uma visão geral de biossensores disponíveis para variadas detecções é mostrado na Figura 3. A partir dos elementos de bioreconhecimento, é possível a visualização de duas categorias principais: biocatalíticos e biocomplexantes. Elementos biocatalíticos fornecem uma resposta baseada na reação catalisada por macromoléculas, como enzimas, células e tecidos, que geralmente levam a geração de uma molécula eletroativa (MOON *et al.*, 2018). Já nos elementos biocomplexantes, a resposta do biossensor é baseada na interação de analitos com macromoléculas, como anticorpos com antígenos, peptídeos e a interação com polímeros molecularmente impressos (MIP, do inglês *Molecularly Imprinted Polymer*) (CESEWSKI e JOHNSON, 2020).

Figura 3 – Representação ilustrativa dos componentes básicos de um biossensor aplicados a diversos analitos



FONTE: elaborada pela autora, 2021.

O evento de bioreconhecimento é uma das etapas a ser analisada para a escolha do sistema de transdução, pois a energia envolvida ou as propriedades físico-químicas existentes

nesse sistema influenciará na escolha analítica, que incluem métodos de detecção eletroquímicos, ópticos, foto-eletroquímicos, calorimétricos, etc (MOZHGANI *et al.*, 2020). Como os biossensores geralmente envolvem detecções de analitos em concentrações baixas ou o evento de bioreconhecimento produz um sinal baixo, os transdutores eletroquímicos são muito utilizados por serem sensíveis a pequenas mudanças na eletroatividade do eletrodo (DENG *et al.*, 2020). Outras vantagens de biossensores eletroquímicos incluem: rápidos tempos de resposta; facilidade na aplicação e leitura dos dados; baixo custo e possibilidade de miniaturização (BLAIR e CORRIGAN, 2020).

Os biossensores eletroquímicos tem como base o monitoramento das mudanças que ocorrem no fluxo de elétrons na interface eletrodo-solução. Essas mudanças são monitoradas na superfície do eletrodo através de parâmetros como resistência eletrolítica, transferência de carga ou transporte de massa. Nesse sentido, os biossensores eletroquímicos podem ser subdivididos em: impedimétricos, potenciométricos, amperométricos e condutimétricos (KHANMOHAMMADI *et al.*, 2020).

1.1.1 Biossensores Impedimétricos

Os biossensores impedimétricos monitoram a mudança na impedância da interface eletrodo-solução. A impedância é basicamente o oposto do fluxo de elétrons em um circuito elétrico. Ela não consiste na resistência comum, pois a resistência obedece a Lei de Ohm¹ e ocorre com corrente que não depende da frequência, onde não apresenta diferença de fase entre a voltagem aplicada e a corrente gerada. A impedância ocorre com corrente que apresenta uma diferença no ângulo de fase entre voltagem e corrente, devido ao surgimento dos efeitos capacitivos, resistivos e indutivos. Assim, a impedância consiste de uma parte resistiva e uma parte capacitiva, resultado da interação complexa de um sinal de voltagem de pequena amplitude com uma função de frequência (LEVA-BUENO *et al.*, 2020).

¹ A Lei de Ohm é a medida da resistência à passagem de corrente elétrica, sendo a fórmula matemática $R = \frac{V}{I}$

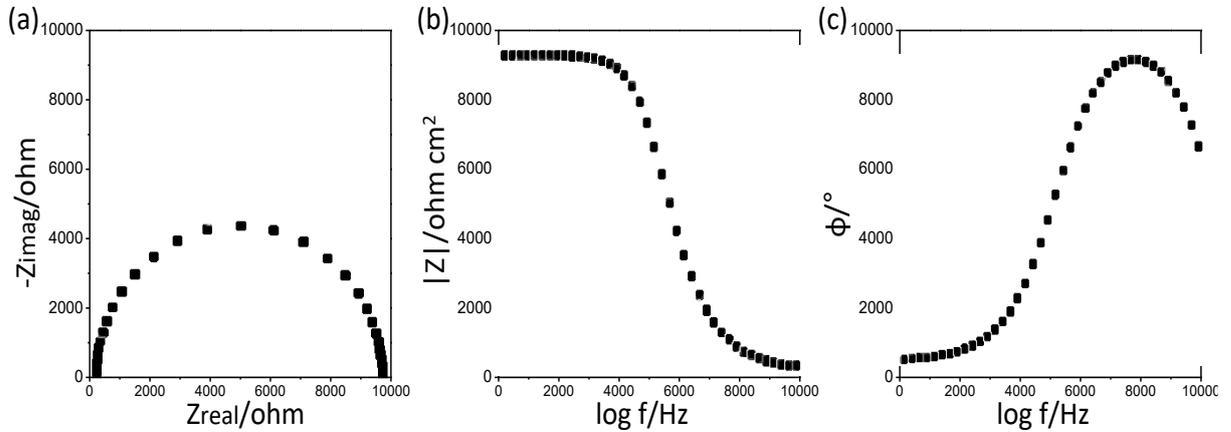
1.1.1.1 Espectroscopia de impedância eletroquímica

A técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS, do inglês *Electrochemical Impedance Spectroscopy*) tem como princípio a introdução de uma baixa perturbação de natureza senoidal ao potencial de trabalho do sistema eletroquímico. A perturbação de baixa tensão tende a gerar um sistema eletroquímico pseudo-linear. Em um sistema pseudo-linear, a resposta de corrente também terá forma senoidal de mesma frequência, porém em fase e/ou amplitude diferente (INSTRUMENTS, 2007). A medição dessa diferença de fase e/ou amplitude, ou seja, da impedância, permite avaliar a natureza da interface eletroquímica no estado estacionário (LASIA, 2014), com relação às contribuições de difusão, dupla camada, cinética, reações acopladas e etc (BRETT e BRETT, 1996). O comportamento impedimétrico é avaliado por dois tipos de diagramas principais:

a) Diagrama de Nyquist: nessa representação gráfica, Figura 4(a), os dados de impedância imaginária (Z'') versus a impedância real (Z') são plotados para várias frequências. Por interpretação do diagrama de Nyquist, tem-se que o lado direito representa regiões de altas frequências, enquanto o lado esquerdo representa regiões de baixas frequências, sendo cada ponto a impedância do sistema em cada frequência (INSTRUMENTS, 2007). A forma gráfica de resposta revela o comportamento da superfície em diversos aspectos. A origem da curva em regiões de alta frequência no eixo Z' informa a existência de uma resistência da solução eletrolítica. A origem da curva no eixo Z'' informa a ausência da resistência da solução eletrolítica. A forma da curva indica se há predominância de um comportamento capacitivo, quando se observa uma linha perpendicular ao eixo real, ou resistivo quando da presença de um semicírculo, ou ainda indutivo, quando da extrapolação para valores negativos (RIBEIRO, 2020).

b) Diagrama de Bode: neste diagrama é muito comum a representação do módulo da impedância *versus* o logaritmo da frequência (f/Hz), Figura 4(b), ou o ângulo de fase (ϕ) *versus* o logaritmo da frequência (f/Hz), Figura 4(c). Para o primeiro, são obtidas informações sobre magnitudes de resistência da solução e magnitude da impedância total do sistema. Para o segundo, informações são obtidas a respeito das diferentes constantes de tempo e como elas são relacionadas com a frequência, possibilitando a elaboração de um circuito equivalente mais apropriado para o sistema (RIBEIRO, 2020).

Figura 4 – Representações gráficas dos resultados obtidos por EIS nos seguintes modos: (a) Diagrama de Nyquist; (b) Diagrama de Bode, na forma $|Z|$ vs. $\log(f/\text{Hz})$; e (c) Diagrama de Bode na forma ϕ vs. $\log(f/\text{Hz})$



FONTE: elaborada pela autora, 2021.

1.1.2 Biossensores Potenciométricos

Os biossensores potenciométricos monitoram a mudança de potencial gerada no eletrodo de trabalho com relação a um eletrodo de referência, a um valor de corrente que tende a zero. Ou seja, quando nenhuma corrente flui sobre o eletrodo, o potencial é medido em uma condição de equilíbrio, permitindo associá-lo a concentração dos íons analitos. Essa relação entre concentração e potencial é estabelecida pela equação de Nersnt², sendo que esses biossensores são geralmente empregados quando se trabalha com enzimas (TANISELASS *et al.*, 2019) (LEVA-BUENO *et al.*, 2020).

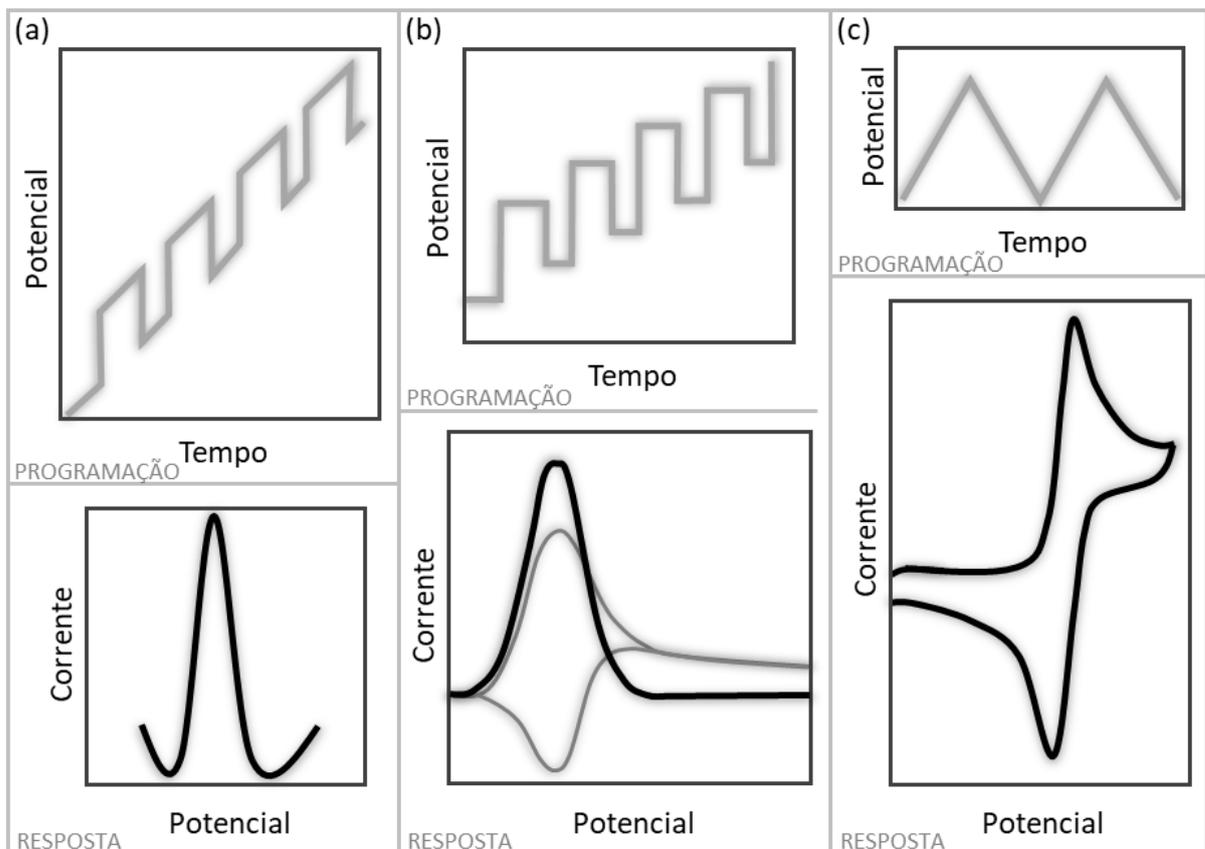
1.1.3 Biossensores Voltamétricos

Métodos amperométricos monitoram a mudança nos valores de corrente quando o potencial se mantém constante. Em geral, um biossensor amperométrico necessita de uma

² A equação de Nernst permite calcular o potencial de uma reação química, sendo sua fórmula matemática dada por $E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln Q$

camada enzimática, semelhante aos biossensores potenciométricos, a qual proporciona a geração da corrente na superfície do eletrodo, proporcional a concentração do analito. Essa relação de corrente e concentração é dada pela Lei de Faraday³. Os biossensores amperométricos apresentam melhor sensibilidade do que os biossensores potenciométricos (TANISELASS *et al.*, 2019) (LEVA-BUENO *et al.*, 2020).

Figura 5 – Sinais de excitação de potencial *versus* tempo; e respostas de corrente *versus* potencial empregados nas voltametrias de (a) pulso diferencial; (b) onda quadrada; e (c) cíclica



FONTE: elaborada pela autora, 2021.

Quando o potencial é variado ao longo do tempo e a corrente gerada na superfície do eletrodo de trabalho é medida com relação a um eletrodo de referência, o método passa a ser o Voltamétrico. Ao variar o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho, várias funções voltagem/tempo podem ser aplicadas e, a partir dessa variação, é possível realizar uma leitura simultânea da corrente. As funções voltagem/tempo são chamadas de sinais de excitação. O sinal de excitação clássico da voltametria é o de varredura linear, que corresponde a um

³ A Lei de Faraday estabelece a existência de uma força eletromotriz quando ocorrer variações no campo magnético, sendo sua fórmula matemática dada por: $E = \frac{|\Delta\phi|}{|\Delta t|}$

potencial linearmente variado em função do tempo. A medida que o potencial é aplicado, a corrente gerada na célula é medida (SKOOG *et al.*, 2006). Os três principais sinais de excitação que são empregados em biossensores voltamétricos, bem como seus sinais de resposta são mostrados na Figura 5, que caracterizam as três técnicas mais utilizadas para os biossensores voltamétricos: Voltametria de Pulso Diferencial (VPD), Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) e Voltametria Cíclica (VC).

1.1.3.1 Voltametria de Pulso Diferencial

Na técnica de VPD, pulsos de potencial são aplicados em função do tempo. Os pulsos podem ser aplicados pela sobreposição periódica em uma varredura linear, como é mostrado na programação da Figura 5(a), ou podem combinar a aplicação de um pulso sobre uma varredura em forma de escada. Nessa técnica a corrente é amostrada em dois momentos, o primeiro, antes da aplicação do pulso e o segundo, imediatamente após o final do pulso, porém, antes que o pico tenha decaído completamente. Fazendo-se a diferença desses dois valores de corrente para cada pulso, a resposta é registrada em uma forma de curva diferencial, como é mostrado na resposta da Figura 5(a) (BRETT e BRETT, 1996).

A concentração da espécie que oxida/reduz é diretamente proporcional à altura do pico. As vantagens na utilização dessa técnica estão na boa resolução de picos diferentes, podendo ser observados naqueles com potenciais de meia-onda que se diferem entre 0,04 V e 0,05 V, bem como na maior sensibilidade e limites de detecção significativamente baixos, geralmente na ordem de 10^{-7} e 10^{-8} mol L⁻¹ (SKOOG *et al.*, 2006). Tais vantagens podem ser atribuídas a uma melhora na corrente faradaica⁴, obtida pela amostragem de corrente antes e após a aplicação do pulso de potencial, ou seja, como a corrente é medida quando está ocorrendo apenas o carregamento da dupla camada elétrica na superfície do eletrodo, ou seja, a corrente capacitiva, e posteriormente ocorre a subtração dessa corrente, pode-se dizer que houve uma subtração da corrente capacitiva (BRETT e BRETT, 1996).

⁴ Corrente faradaica é a corrente gerada por processos óxi-redutivos na superfície do eletrodo.

1.1.3.2 Voltametria de Onda Quadrada

A técnica de VOQ é bastante similar à VPD, mas oferece vantagens tais como melhora na sensibilidade e alta velocidade, podendo ser obtidos voltamogramas em menos de 10 milissegundos. Os pulsos de potencial são sobrepostos sequencialmente em forma de escada, como mostrado na programação da Figura 5(b). Pode-se notar que as larguras de cada degrau são idênticas, assim como a altura de cada degrau. A corrente também é medida em dois momentos: milissegundos antes a aplicação do pulso e antes o término do pulso (BRETT e BRETT, 1996).

Quando o processo eletroquímico se tratar de uma reação reversível, o tamanho do pulso permite tanto a ocorrência da reação direta, como da reação inversa do produto imediatamente formado. Portanto, o sentido direto produz uma corrente do processo oxidativo/reduutivo, enquanto o sentido inverso produz uma corrente redutiva/oxidativa do produto formado. É a diferença entre essas correntes que é mostrada no gráfico de resposta da Figura 5(b) (curva em preto), sendo a mesma diretamente proporcional a concentração da espécie. Assim como na VPD, os limites de detecção estão em torno de 10^{-12} mol L⁻¹ (SKOOG *et al.*, 2006).

1.1.3.3 Voltametria Cíclica

A VC é uma técnica muito útil, por oferecer informações no estudo de reações reversíveis ou semireversíveis, além de produtos formados na superfície do eletrodo. Diferentemente das técnicas de pulso, o potencial é linearmente varrido em uma direção e, posteriormente, varrido na direção contrária, como mostrado na programação da Figura 5(c), sendo a leitura de corrente simultânea a varredura. Assim, podem ser aplicados um ciclo inteiro, um ciclo parcial ou uma sucessão de ciclos. Como a resposta da Figura 5(c) mostra, é registrado tanto o pico de corrente do processo direto, quanto do processo inverso. Como a corrente é

amostrada simultaneamente à aplicação do potencial, ela será composta pela corrente capacitiva⁵ e pela corrente faradaica. (BRETT e BRETT, 1996).

A corrente advinda do processo oxidativo é chamada de anódica, enquanto a corrente do processo redutivo é chamada de catódica. Alguns parâmetros importantes avaliados em VC são: os potenciais de pico anódico e catódico, e as correntes de pico anódico e catódico, pois a partir deles podem ser aplicados alguns diagnósticos para definir a reversibilidade de reações. Apesar de não ser muito utilizado em análise quantitativa, a VC é muito útil e muito utilizada nas etapas de fabricação de biossensores eletroquímicos, principalmente na etapa de deposições de camadas poliméricas, processo conhecido como eletropolimerização.

1.2 Eletropolimerização

As reações de oxidação/redução que ocorrem na superfície de um eletrodo podem levar a deposição de produtos sólidos. Esse processo é conhecido como eletrodeposição ou deposição eletroquímica. É amplamente empregado na eletrocatalise, onde ocorre a deposição de filmes/óxidos metálicos, a partir da redução de um íon metálico na superfície eletródica. A polimerização eletroquímica ou eletropolimerização é um processo similar à deposição eletroquímica de filmes metálicos, porém com uso de substâncias não-metálicas, cujo processo pode ser atingido tanto pela oxidação, quanto pela redução de espécies, dependendo do monômero precursor (LEITE, 2018).

Um dos processos pioneiros de eletropolimerização conhecido e controlado de materiais orgânicos sobre a superfície de eletrodos, foi o trabalho de Diaz e Kanazawa, no qual relataram a polimerização eletroquímica do pirrol (DIAZ e KANAZAWA, 1979). A síntese eletroquímica ocorreu em uma superfície de platina em um sistema de dois eletrodos, com solventes apróticos. Foi obtido um material com condutividade elétrica melhorada e com boa estabilidade frente ao tratamento eletroquímico. Em seguida, o grupo relatou que essa condutividade elétrica pode ser alternada entre os estados condutor e isolante, controlando o estado de oxidação do material (DIAZ e CASTILLO, 1980).

⁵ A corrente capacitiva é a corrente gerada somente pelo carregamento da dupla camada elétrica do eletrodo

A partir de então, uma série de filmes poliméricos tem sido sintetizados eletroquimicamente. Os motivos que fazem essa técnica ser amplamente empregada em diversas áreas podem ser resumidos em: controle da espessura do filme formado, onde é possível a obtenção de filmes muito finos; alta adesão a superfície (SAIKRITHIKA *et al.*, 2020); possibilidade de recobrimentos de diferentes geometrias, como por exemplo, sobre nanotubos de carbono (DI VONA e KNAUTH, 2020); obtenção de materiais flexíveis; além de ser um processo rápido, simples e econômico (CHAI *et al.*, 2019).

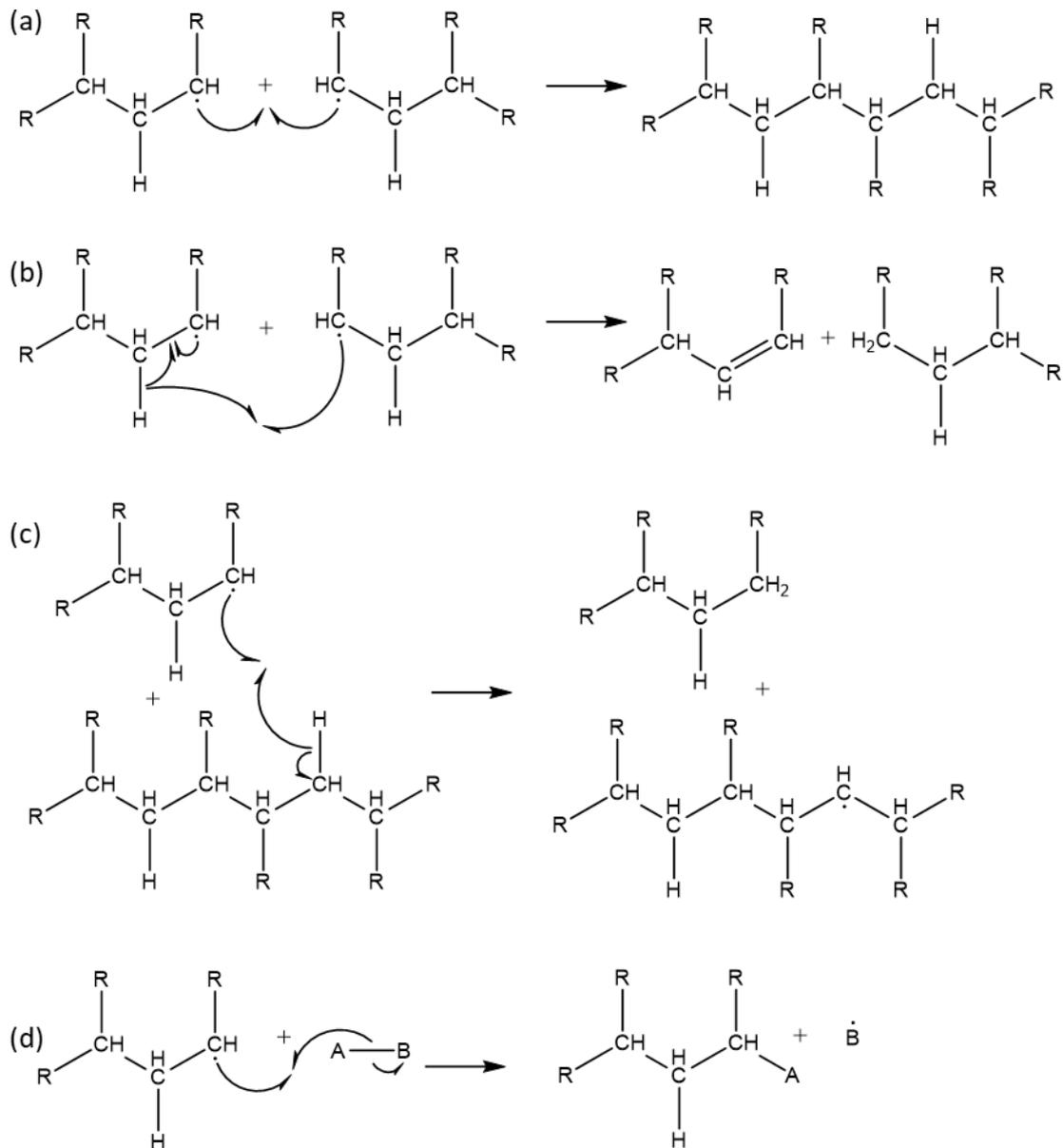
Na eletropolimerização há a oxidação/redução de monômeros dissolvidos na solução eletrolítica para a formação de um produto polimérico ou um oligômero, que geralmente é insolúvel e depositado na superfície do eletrodo. O processo de eletropolimerização via oxidação, se inicia com a formação de um cátion radical em potenciais mais anódicos. O cátion radical ataca então a funcionalidade⁶ do segundo monômero, que pode estar também oxidado ou não, dando início à polimerização e levando a geração de um dímero. A nova oxidação do dímero, leva ao ataque de uma terceira molécula para a formação de um trímero, e assim sucessivamente, levando ao crescimento da cadeia polimérica (EVTUGYN e HIANIK, 2016).

A interrupção do crescimento da cadeia pode se dar de várias maneiras, como ilustra a Figura 6: combinando dois centros radicais, Figura 6(a); por desproporcionamento, onde um hidrogênio do carbono cauda é transferido intermolecularmente para o carbono cabeça da ponta ativada de outra cadeia, Figura 6(b); por transferência de cadeia, onde o centro radical abstrai um hidrogênio de um ponto qualquer de outra cadeia, Figura 6(c); e por transferência para o solvente, onde o próprio solvente transfere átomos para o centro radical, Figura 6(d) (CANEVAROLO JR, 2002).

Algumas propriedades do filme a ser formado podem ser controladas por alteração de variáveis, como a velocidade de varredura, o intervalo de potencial, a quantidade de ciclos voltamétricos, eletrólito suporte utilizado e etc, quando se utiliza a voltametria cíclica. Utilizando velocidades de varredura baixas (na ordem de 25 mV s^{-1}) e intervalos de varredura limitados, filmes poliméricos mais uniformes são obtidos, ao passo que um aumento na quantidade de varreduras tende a levar a formação de filmes mais espessos (PADILHA *et al.*, 2017).

⁶ Funcionalidade é o número de pontos reativos por molécula

Figura 6 – Representação de término de crescimento de cadeia polimérica por (a) combinação de dois centros radicais; (b) desproporcionamento; (c) transferência de cadeia; e (d) transferência para o solvente



FONTE: elaborada pela autora, 2021.

1.3 Polímeros

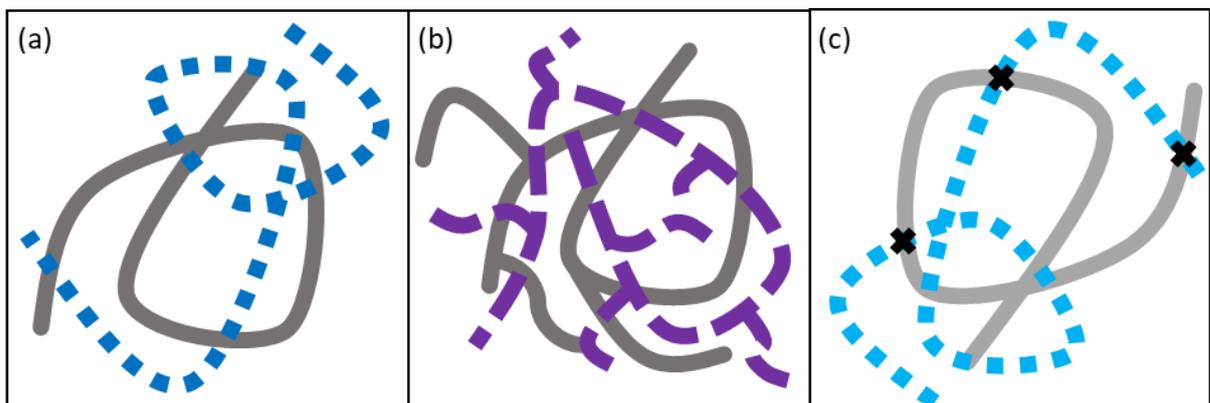
Um polímero pode ser conceituado como uma macromolécula que apresenta milhares de unidades ligadas, que se repetem ao longo da cadeia. Essas unidades de repetição são denominadas meros ou monômeros (um único tipo de mero) (CANEVAROLO JR, 2002).

Para que uma cadeia polimérica seja formada a partir de moléculas pequenas, é necessário que essa molécula apresente no mínimo dois pontos reativos em sua estrutura, para permitir que ela se ligue a duas outras moléculas vizinhas. Esses pontos reativos podem ser derivados de grupos funcionais reativos, como as funções ácido, álcool, amina, e/ou duplas ligações.

As unidades monoméricas estão unidas intramolecularmente por ligações que podem ser: covalentes, iônicas ou até mesmo metálicas, quando há a incorporação de metais na estrutura do polímero. Essas ligações irão determinar a estrutura química e o tipo de cadeia, podendo influenciar na rigidez/flexibilidade e estabilidade do material. Já os segmentos das cadeias poliméricas podem interagir entre si por forças de Van der Waals ou ligações de hidrogênio. Essas forças intermoleculares são as determinantes para a maioria das propriedades físicas do polímero, como temperatura de fusão, solubilidade, cristalinidade, permeabilidade, entre outras (CANEVAROLO JR, 2002).

Uma estrutura polimérica pode variar sua forma, dependendo do tipo de cadeia que a constitui, como: as cadeias lineares, cuja cadeia polimérica apresenta apenas uma cadeia principal, Figura 7(a); as cadeias ramificadas, onde da cadeia principal propagam-se outras cadeias, que podem ser curtas ou longas, Figura 7(b); e as cadeias com ligação cruzada, na qual diferentes cadeias ligam entre si por ligações intramoleculares, através de segmentos de cadeia, Figura 7(c).

Figura 7 – Representação esquemática de cadeias poliméricas (a) lineares; (b) ramificadas; e (c) com ligação cruzada, onde os pontos de inter cruzamento, denotados com um x, são constituídos por ligações covalentes intramoleculares

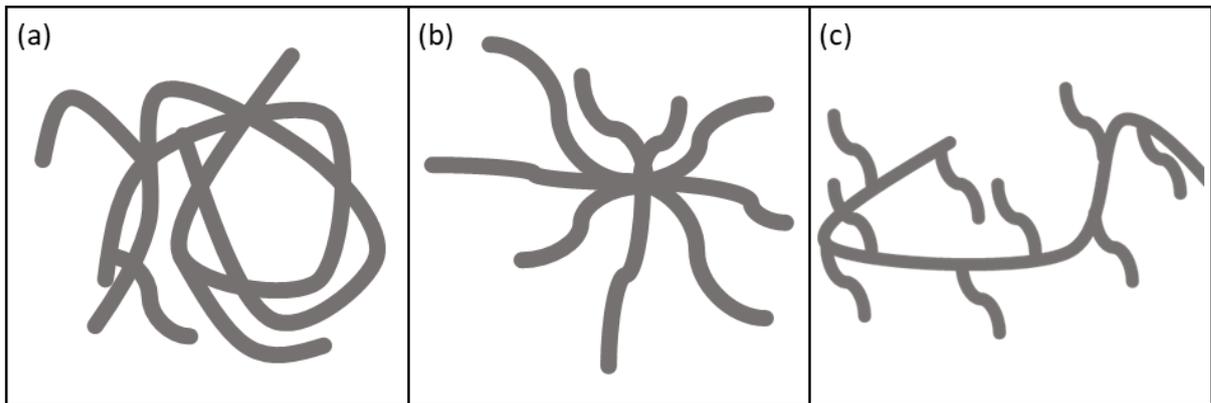


FONTE: elaborada pela autora, 2021.

As cadeias ramificadas podem, ainda, serem subdivididas em três classes: aleatória, onde as ramificações são de tamanhos variados e formados com o mesmo monômero da cadeia

principal, Figura 8(a); estrelada, onde a cadeia polimérica pode ter vários segmentos partindo de um mesmo ponto central, Figura 8(b); e pente, onde da cadeia principal pendem cadeias com tamanhos semelhantes e distribuídas homogeneamente, Figura 8(c) (CAROLINO, 2017).

Figura 8 – Representação esquemática de cadeias poliméricas ramificadas do tipo (a) aleatória; (b) estrelada; e (c) pente



FONTE: elaborada pela autora, 2021.

As cadeias principais podem apresentar unidades de repetição diferentes e, neste caso, passam a ser chamadas de copolímeros, quando formadas por dois meros diferentes, ou terpolímero, quando a cadeia principal apresenta três meros diferentes.

1.3.1 Copolímeros

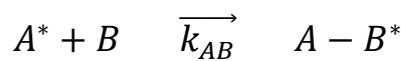
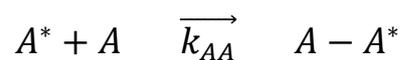
Copolímero é a classe de filmes poliméricos que apresenta mais de um mero diferente na cadeia. Eles podem ser divididos de acordo com a distribuição dos diferentes meros dentro da cadeia em: aleatório, onde não há uma sequência definida de distribuição dos diferentes meros; alternado, onde os diferentes meros estão distribuídos alternadamente; em bloco, onde blocos de um mesmo monômero se formam, alternando com blocos do outro monômero; e enxertado, quando forma-se uma cadeia de cada monômero e elas se ligam uma sobre a outra (CANEVAROLO JR, 2002). Na Tabela 1 são representadas as formas de distribuição de meros em copolímeros, assumindo-se que A é um monômero e B é um outro monômero diferente.

Tabela 1 – Representação da distribuição monomérica de copolímeros

Tipo de distribuição	Representação
ALEATÓRIO	-A-A-B-A-B-B-B-A-B-A-A-
ALTERNADO	-A-B-A-B-A-B-A-B-A-B-A-
EM BLOCO	-AAA-BBB-AAA-BBB-AAA-
ENXERTADO	-A-A-A-A-A-A-A- \ B-B-B-B-B-

FONTE: elaborada pela autora, 2021.

Por apresentarem dois meros diferentes na cadeia principal, os copolímeros tendem a ter dificuldade de empacotamento e, portanto, apresentam baixa ou nenhuma cristalinidade. Durante a copolimerização de dois monômeros diferentes, a tendência para a geração de copolímeros diferentes irá depender da reatividade de cada um, seja entre mesmos monômeros ou entre monômeros diferentes (CANEVAROLO JR, 2002). Nesse sentido, durante o crescimento da cadeia polimérica, é possível qualquer distribuição dos monômeros, alternado, aleatório, em bloco ou enxertado; e, sendo possível qualquer uma das reações abaixo, existirá uma constante de reatividade k_{ij} associada a cada reação:



Assumindo-se que a concentração das espécies presentes seja constante, o valor de k_{ij} irá determinar a velocidade da reação, v , pois

$$v = k_{ij}[A][B] \quad \text{eq. 1}$$

A partir dos valores de k_{ij} é possível definir a razão de reatividade r como:

$$r_A = \frac{k_{AA}}{k_{AB}} \quad \text{e} \quad r_B = \frac{k_{BB}}{k_{BA}} \quad \text{eq. 2}$$

Quando as razões de reatividade apresentarem um valor pequeno, menor que 1,0, significa que a constante de reatividade de um monômero consigo mesmo (k_{AA} e k_{BB}) deve ser menor que com o outro (k_{AB} e k_{BA}). Nesse caso, a reação de monômeros iguais é dificultada, e o copolímero tende a apresentar uma distribuição alternada. Quando as razões de reatividade apresentarem valores altos, maiores que 1,0, a preferência será da reação de um monômero com ele mesmo, gerando copolímeros em bloco. Já quando as razões de reatividade apresentarem valores intermediários, não há preferência definida, gerando copolímeros com distribuição aleatória (CANEVAROLO JR, 2002).

A química dos copolímeros pode ter sido iniciada por volta de 1930, quando a borracha sintética foi inventada e desenvolvida partindo-se dos comonômeros butadieno e estireno (HUANG e TURNER, 2017). Os copolímeros, desde então, tem chamado atenção de pesquisadores por apresentarem propriedades significativamente diferentes daquelas observadas em seus respectivos homopolímeros (HOLZE 2011), sendo a copolimerização um dos métodos mais viáveis e amplamente utilizados para alterar as propriedades de seus polímeros de origem (SOYLEMEZ *et al.*, 2013). Para aplicação em biossensores, além de proporcionarem um microambiente biofavorável para biomoléculas, os polímeros também devem apresentar a característica de condução elétrica.

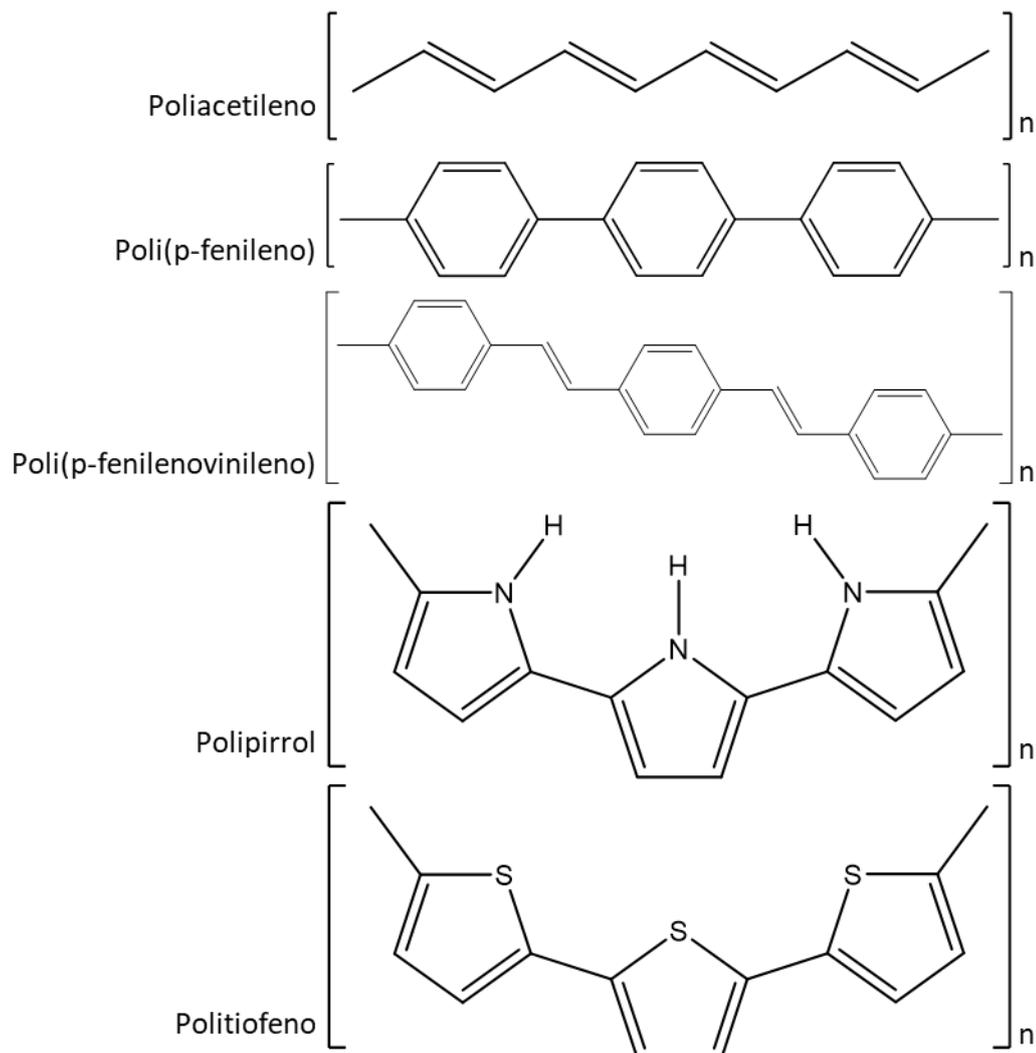
1.3.2 Polímeros condutores

Polímeros condutores pertencem a classe de materiais que combinam as propriedades típicas de um polímero com aquelas de materiais eletricamente condutores, porém essa classe de polímeros não apresenta propriedades mecânicas similares aos polímeros comercialmente disponíveis (AWUZIE, 2017). Segundo Macdiarmid, o termo “polímeros condutores” se refere a uma mistura física de polímeros não-condutores com materiais condutores, como partículas metálicas, pó de carbono ou dopantes condutores, enquanto o termo “polímeros intrinsecamente condutores” se refere àqueles polímeros que possuem propriedades elétricas, magnéticas e ópticas de metais, mantendo suas propriedades

convencionais de polímeros (MACDIARMID, 2001). Contudo, neste trabalho, o termo polímeros condutores será utilizado de forma geral para tratar dos materiais poliméricos que apresentam condutividade elétrica.

Os polímeros condutores geralmente apresentam ligações duplas e simples alternadas ao longo de sua cadeia, o que proporciona a deslocalização de elétrons que agem como carregadores de carga (DAKSHAYINI *et al.*, 2019). Na Figura 9 são representados alguns dos polímeros condutores mais empregados, que contém duplas ligações alternadas. Apesar da presença da conjugação eletrônica, esses polímeros apresentam baixa condução em sua forma neutra. Este fenômeno é devido à ausência de portadores de carga livres, que podem ser formados na cadeia polimérica por processos de oxidação ou redução, que são chamados de processos de dopagem (SANTOS, 2019).

Figura 9 – Representações estruturais de alguns polímeros condutores

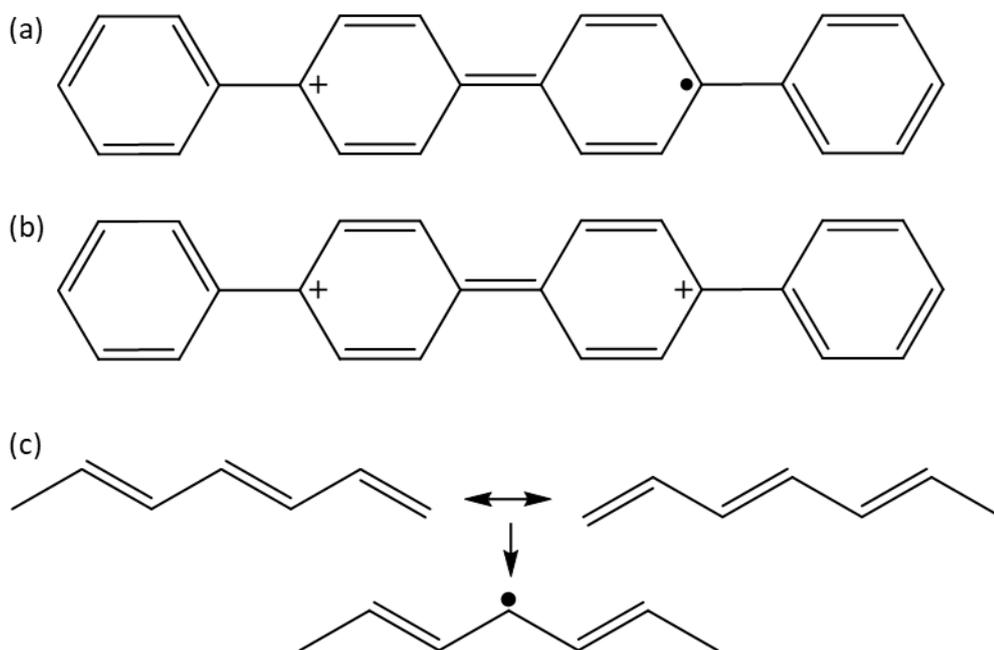


FONTE: elaborada pela autora, 2021.

O processo de dopagem leva a geração de cargas deslocalizadas na cadeia polimérica, que provocam um tipo de relaxação na geometria do polímero, levando a uma conformação energeticamente mais favorável. A oxidação seria um processo análogo a dopantes tipo-p de semicondutores inorgânicos, gerando um polímero carregado positivamente, enquanto a redução, análoga a dopantes tipo-n, gerando um polímero carregado negativamente (MZENDA, 2006).

Os efeitos dopantes são analisados em termos de níveis de energia, como a teoria de bandas de energia, que explica a condução de condutores e semicondutores inorgânicos. Contudo, em polímeros condutores, a condução é promovida por defeitos na estrutura da cadeia polimérica. Esses defeitos são caracterizados como o surgimento de níveis de energia intermediários entre os orbitais ligantes e antiligantes, que promovem a movimentação das cargas (PADILLA, 2011; DEKKER, 1998), chamados de sólitons, polárons e/ou bipolarons (MZENDA, 2006).

Figura 10 – Representações estruturais de (a) poláron; (b) bipolaron; e (c) sóliton



FONTE: elaborada pela autora, 2021.

De forma simplista, a remoção de um único elétron por meio de dopagem leva a formação de um poláron positivo, como o ilustrado na Figura 10(a), ao passo que a adição de um único elétron leva a formação de um poláron negativo. Com a movimentação de apenas uma única carga, o nível inferior do poláron está meio ocupado e, as espécies possuiriam *spin*. A remoção/adção de um segundo elétron resulta na formação de um bipolaron, como mostra a

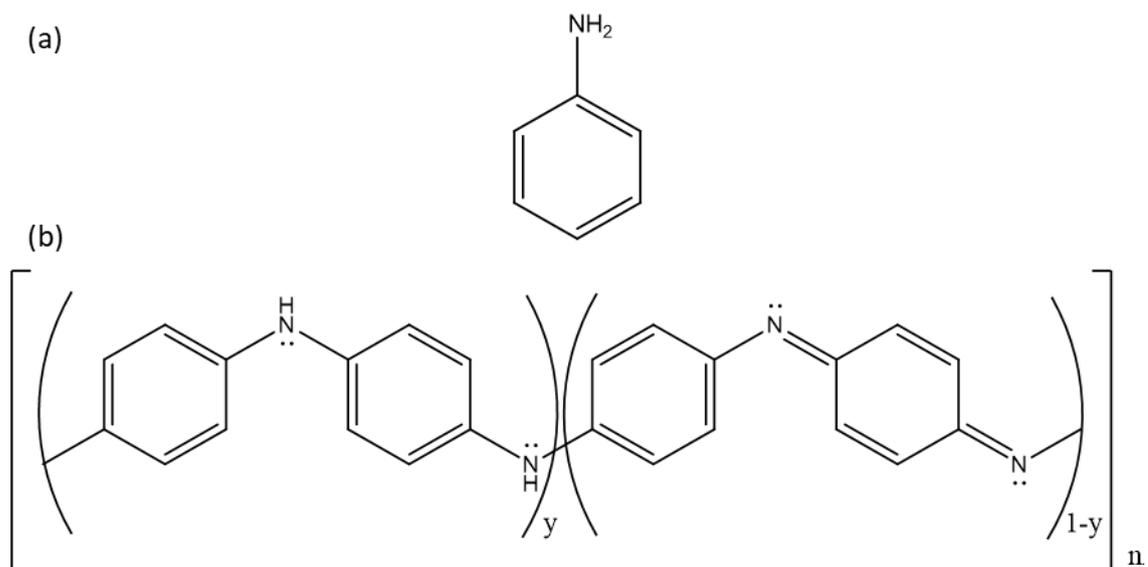
Figura 10(b), que é uma espécie estável, apesar da repulsão eletrônica, que não apresentaria *spin*. Já um sóliton, Figura 10(c), é relacionado com a lacuna de energia reduzida entre duas regiões da cadeia polimérica, que apresenta sentidos de deslocalização opostos (MZENDA, 2006).

Complementando, a promoção de dopagens na cadeia polimérica, como a oxidação ou redução de polímeros conjugados também pode promover os portadores de carga, o que provoca um aumento na condutividade observada. Podendo-se, então, alterar o nível de dopagem, alternando entre os estados isolante, semicondutor ou condutor, para determinados polímeros, como é o caso da polianilina.

1.3.3 Polianilina

Polianilina (PANI), derivada do monômero anilina (Figura 11a), tem atraído a atenção de pesquisadores em várias áreas, por apresentar características como: fácil preparação, boa estabilidade, boa condutividade, atividade óptica (HUANG e MACDIARMID, 1993), reversibilidade redox e custo relativamente baixo.

Figura 11 – Representação estrutural (a) do monômero anilina; e (b) da polianilina



FONTE: elaborada pela autora, 2021.

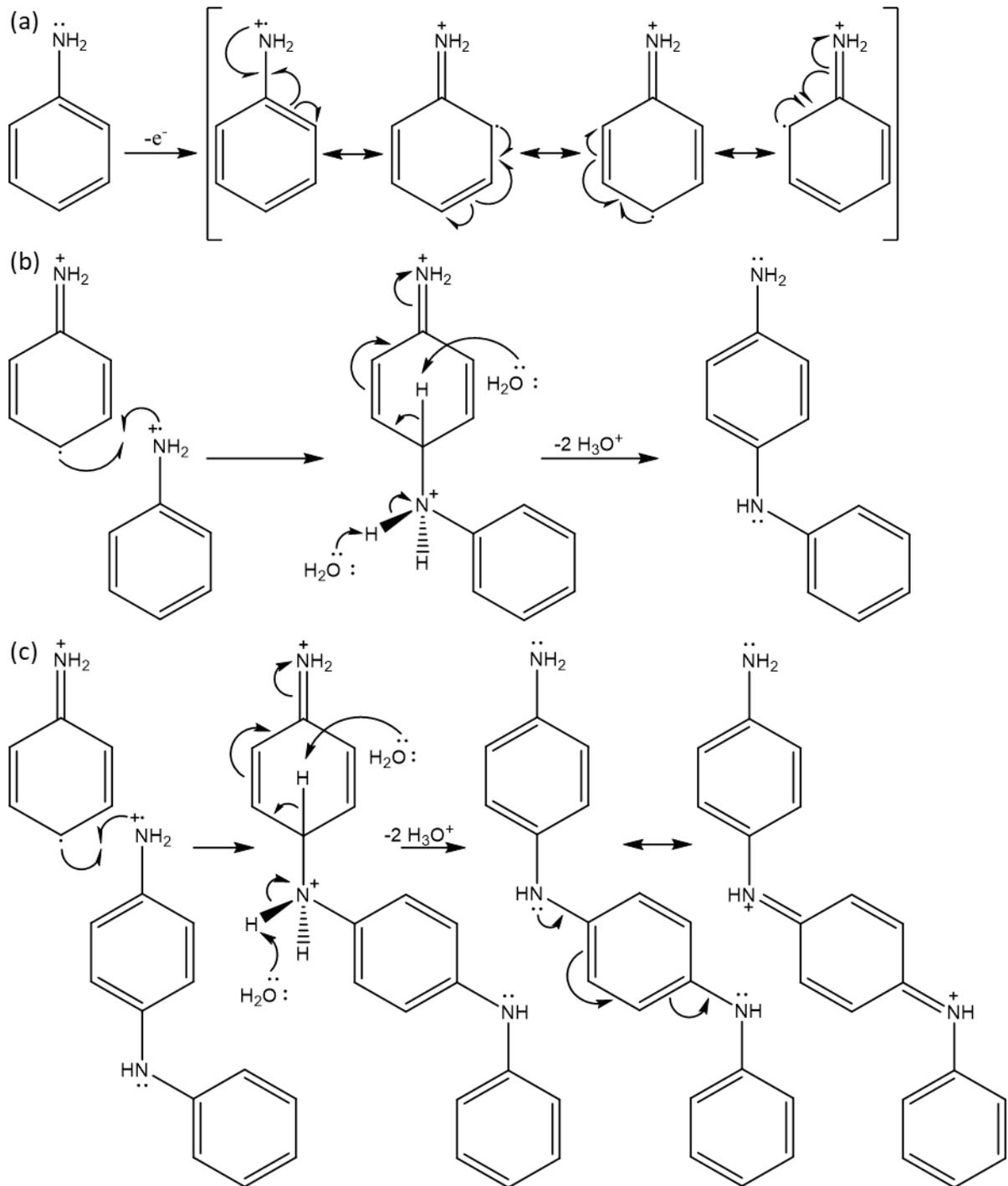
Outro ponto de interesse é sua alta reatividade, além da capacidade de sofrer protonação e desprotonação. Porém, a PANI (Figura 11b) apresenta pobres propriedades mecânicas, é insolúvel em solventes comuns e se decompõe antes de fundir (CHAUHAN e MOZAFARI, 2019).

O trabalho pioneiro de Letheby descreve a primeira síntese eletroquímica da PANI (LETHEBY, 1862), sendo constatado a síntese de um pigmento azul pela oxidação eletrolítica de uma solução de anilina em ácido sulfúrico, apesar de, a princípio, não saberem que se tratava de um polímero. Desde então, vários pesquisadores dedicaram seus estudos ao entendimento do comportamento eletroquímico da PANI, devido a presença de uma variedade de estados de oxidação e condutividade elétrica controlável, associadas ao átomo de nitrogênio.

A síntese eletroquímica da PANI geralmente é realizada em meio ácido, onde o ácido utilizado e a sua concentração, além do método eletroquímico, podem afetar as propriedades do filme formado na superfície eletródica. Para manter as características condutoras e eletrocromáticas, o pH do meio reacional deve ser inferior a 2, evitando estruturas superoxidadas e de menores tamanhos de cadeia, que são obtidas em meios mais alcalinos (LU *et al.*, 2011). Ácidos inorgânicos, como o clorídrico ou sulfúrico levam a uma agregação da morfologia, enquanto ácidos orgânicos podem alterar sua propriedade e morfologia (MELLO, MULATO, 2018). Como também já estudado, o tamanho do ânion ácido influencia na PANI formada, devido ao processo de eletroneutralização de intermediários formados. Ânions grandes resultam em filmes largos e abertos, enquanto a utilização de ânions pequenos, resultam em filmes mais compactos (YAZDANPANAHI *et al.*, 2019).

O mecanismo de eletropolimerização da PANI ainda é amplamente estudado. A fase inicial, em via ácida, envolve a geração de um cátion radical pela oxidação irreversível da anilina, Figura 12(a). Sabendo-se que pode ocorrer diferentes estruturas de ressonância, a forma radical na posição *para* é a mais reativa, por ser estabilizada pelo efeito indutivo e possuir menor impedimento estérico (LACERDA, 2020). Ao combinar dois cátions radicais de anilina, e simultânea remoção de dois prótons, há o retorno da aromaticidade e a ocorrência de um dímero, Figura 12(b). Esse dímero formado próximo a superfície eletródica é suscetível a uma nova oxidação e a reagir com um novo monômero oxidado na superfície do eletrodo, o que leva à propagação da cadeia polimérica, Figura 12(c). No meio reacional, os contra-ânions originados do ácido eletrolítico estabilizam a carga elétrica dos intermediários de reação, promovendo a eletroneutralidade do polímero formado (YAZDANPANAHI *et al.*, 2019).

Figura 12 – Mecanismo de eletropolimerização da PANI ocorrendo a formação de (a) um cátion radical; (b) um dímero; e (c) um trímero

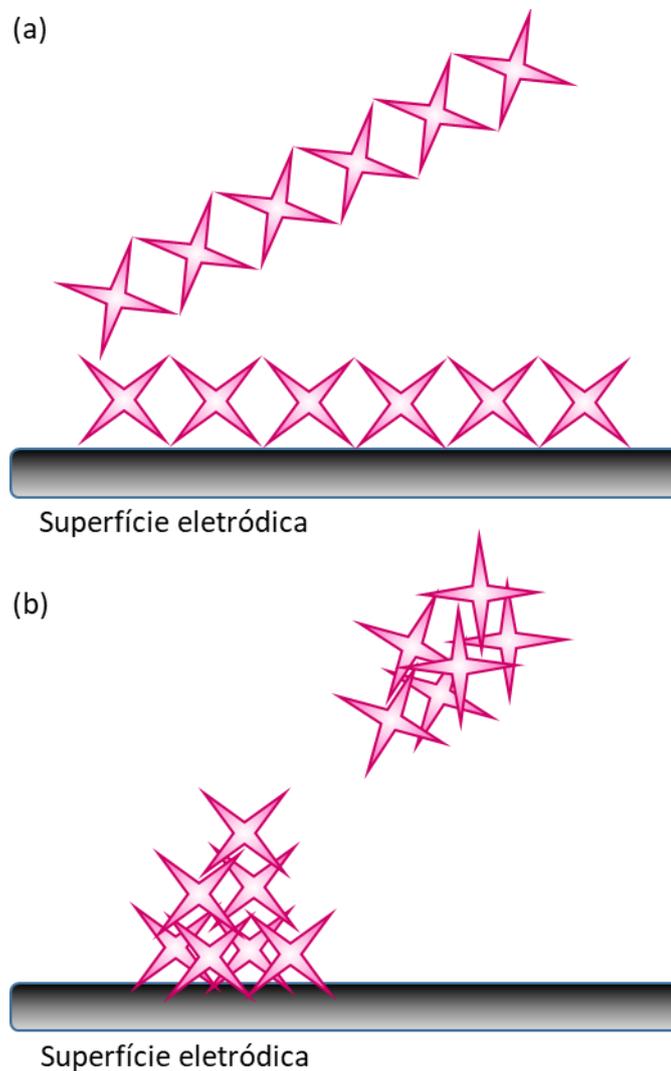


FONTE: adaptada de GENIES e TSINTAVIS, 1985, p. 111.

No processo de iniciação da cadeia, ou seja, na geração de cátions radicais e formação de oligômeros, esses são praticamente insolúveis e tendem a se adsorver na superfície do eletrodo na forma oxidada, para produção de filmes finos, Figura 13(a). Porém, sabe-se que os oligômeros são resultados do acoplamento de duas moléculas que pode ter ocorrido via

posição *-orto* ou *-para*. Quando da posição *-orto*, o oligômero formado é a fenazina, uma molécula planar que é propensa a interagir com outras moléculas planares por interações π - π , gerando aglomerações como precipitados, Figura 13(b). Esses precipitados de oligômeros fenazinas existentes no meio reacional podem se dar de forma planar ou não-planar, essa última resulta na morfologia granular característica da PANI. Esses núcleos de fenazina são formados apenas durante as primeiras fases de eletropolimerização (YAZDANPANAHA *et al.*, 2019).

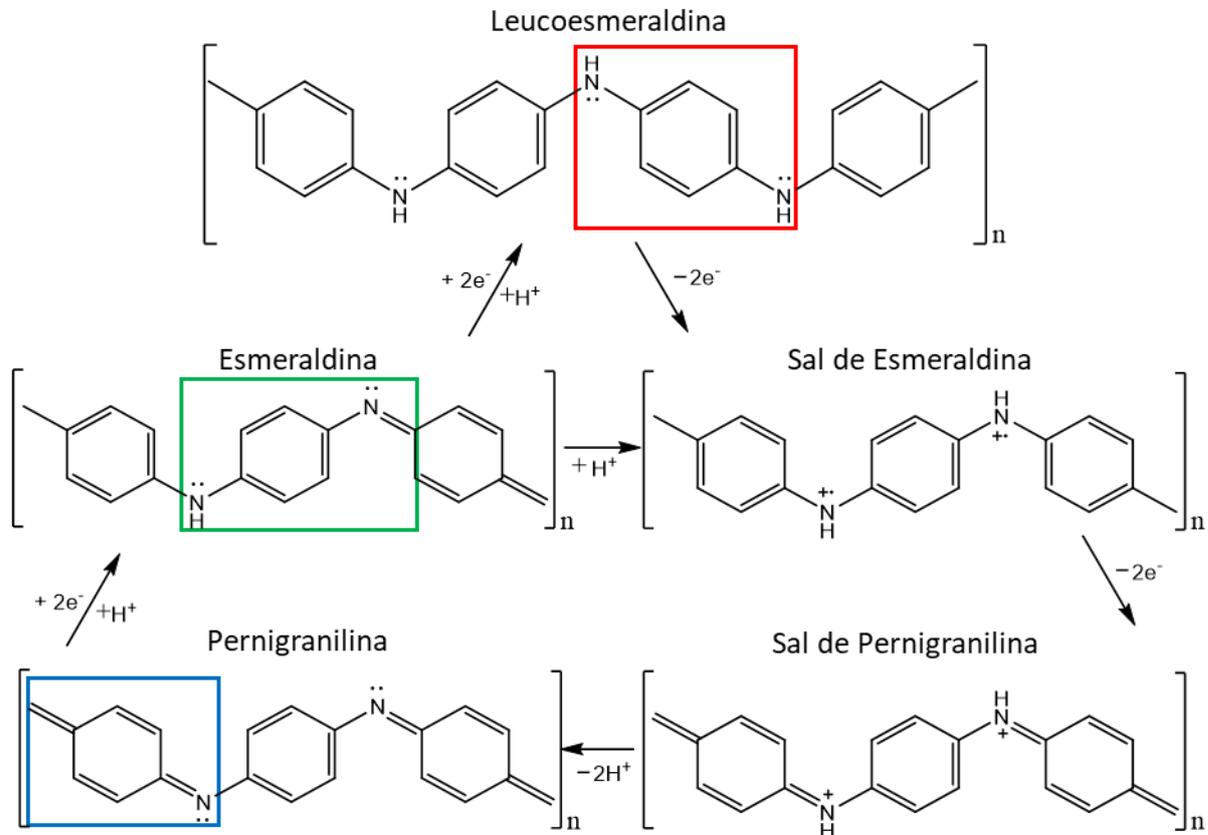
Figura 13 – Figuras ilustrativas de forma de nucleação do processo de eletropolimerização da PANI (a) de forma linear; e (b) na forma de precipitados



FONTE: adaptada de YAZDANPANAHA *et al.*, 2019, p. 112.

O processo de polimerização da PANI, promove a ligação dos átomos de nitrogênio de formas diferentes, podendo apresentar estruturas oxidadas e reduzidas, representadas na Figura 14 com suas formas de conversão.

Figura 14 – Estruturas de conversão dos três estados de oxidação da PANI e suas formas dopadas



FONTE: adaptada de YAZDANPANAHA *et al.*, 2019, p. 107.

Quando o polímero encontra-se completamente reduzido ($y = 1$), ele é chamado de leucoesmeraldina (LE), apresentando estruturas reduzidas do tipo *p*-difetilamina (destaque em vermelho da Figura 14); quando está semioxidado ($y = 0,5$) é chamado de esmeraldina (ES) e apresenta estruturas semioxidadas do tipo *p*-fenileno-iminoamina (destaque em verde da Figura 14); e quando completamente oxidado ($y = 0$) ele é chamado de pernigranilina (PG) e apresenta estruturas oxidadas do tipo *p*-quinonadiimina (destaque em azul da Figura 14) (SILVA, 2013). A forma dopada de ES (ou sal de esmeraldina) é a configuração de mais alta condutividade da PANI, podendo ser considerada como um semiconductor na forma não-dopada (AHMADI *et al.*, 2019), como pode ser visto pelos valores de condutividade na Tabela 2.

A PANI também apresenta a característica intrínseca de eletrocromicidade⁷ em seus diferentes estados de oxidação (Tabela 2). Quando dopadas, os estados leucoesmeraldina, esmeraldina e pernigranilina assumem a coloração: amarelo-claro, verde e azul-escuro/violeta, respectivamente. Já quando não-dopados, a leucoesmeraldina é incolor, enquanto esmeraldina

⁷ Fenômeno em que os materiais apresentam diferentes cores em seus diferentes estados de oxidação

e pernigranilina apresentam coloração azul-escuro e marrom escuro, respectivamente (SILVA, 2013).

Tabela 2 – Valores de condutividade e cores das formas de PANI

Tipo	Nome	Cor	Condutividade (S cm ⁻¹)
Forma reduzida	Leucoesmeraldina	Incolor	$< 10^{-8}$
	Protoesmeraldina	Incolor	$10^{-7} - 10^{-6}$
	Esmeraldina	Azul	$< 10^{-5}$
	Pernigranilina	Violeta	$< 10^{-5}$
Forma oxidada	Sal de esmeraldina	Verde	$10^{-2} - 10^1$

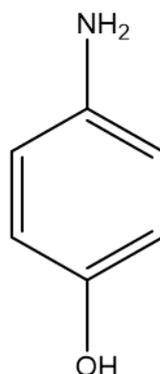
FONTE: YAZDANPANAHA *et al.*, 2019; ROSLAN *et al.*, 2020.

O monômero anilina apresenta apenas um substituinte funcional que, durante o processo de polimerização, se constitui em um heteroátomo dentro da cadeia, não possibilitando a exposição de grupos funcionais para interação com biomoléculas, diferentemente do que pode ocorrer caso a molécula apresente 2 ou mais substituintes funcionais, no caso de anilinas substituídas, como aminofenóis.

1.3.4 Poli(4-aminofenol)

Poli(4-aminofenol) ou poli-*p*-aminofenol (P4AP) é um polímero bastante estudado como protetor de corrosão (RENGAMINI *et al.*, 1994; GUENBOUR *et al.*, 2000), cuja unidade monomérica, a molécula de 4-aminofenol, contém 2 grupos funcionais oxidáveis em sua estrutura: o grupo hidroxila –OH, e o grupo amino –NH₂, como mostra a Figura 15. Este polímero também vem sendo amplamente empregado em sensores e biossensores, devido a facilidade de preparação e fornecimento de grupos funcionais expostos (MELO, 2011; CAETANO, 2014; WANG, 2017; DE CASTRO, 2018; KARABIBEROGLU, 2019).

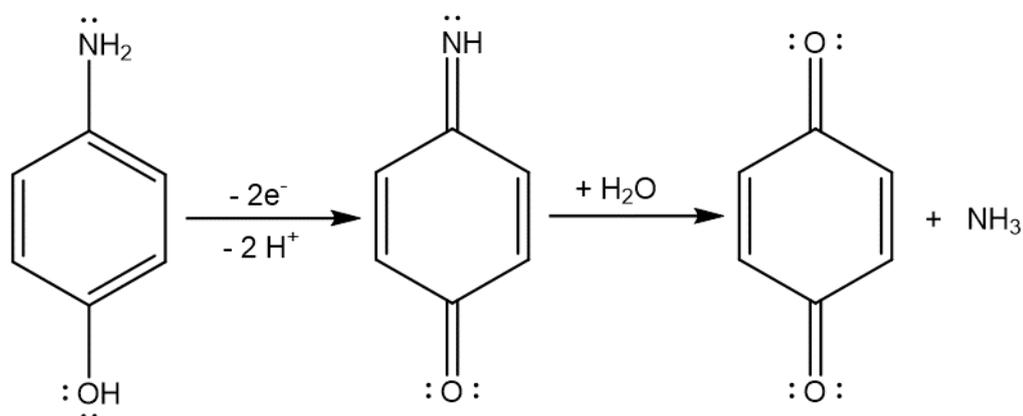
Figura 15 – Representação estrutural do monômero 4-aminofenol



FONTE: elaborada pela autora, 2021.

A eletro-oxidação do 4-aminofenol é um processo estudado desde 1965, com a presunção da formação de quinoneimina pela remoção de 2 prótons e 2 elétrons, seguido da hidrólise para formação da espécie *p*-benzoquinona, como mostra a Figura 16 (HAWLEY e ADAMS, 1965). Estudos posteriores constataram que a eletro-oxidação do 4-aminofenol é um processo reversível (HERAS *et al.*, 1984) e que, possivelmente, são formados intermediários insolúveis que se precipitam na superfície do eletrodo durante a ciclagem reversa. Apesar da reversibilidade constatada, a formação de um filme adsorvido sobre a superfície pode ser experimentada por estudos com microbalança de cristal de quartzo, onde seria possível observar que a presença do monômero 4-aminofenol oxidado é o ponto-chave para o crescimento do filme, ou seja, para reação com os produtos hidrolisados anteriormente formados (MENEZES e MAIA, 2006).

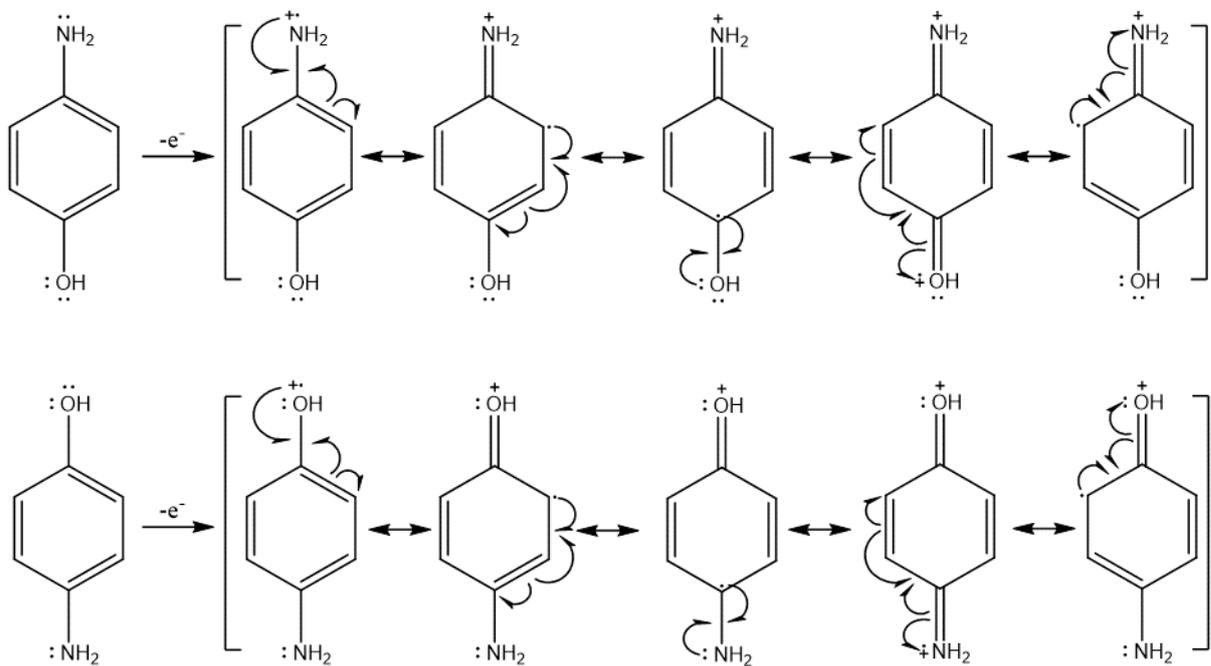
Figura 16 – Representação do processo de oxidação do 4-aminofenol



FONTE: adaptada de HERAS *et al.*, 1984, p. 544.

O mecanismo de polimerização do P4AP não é claramente estabelecido. Contudo, segue a mesma premissa de oxidação inicial do monômero 4-aminofenol para formação de um cátion radical. Assim como na anilina, o cátion radical permite estruturas de ressonância, porém com duas possibilidades de origem: grupo amino e grupo hidroxila, como mostra a Figura 17. A forma radical no grupo amino, provavelmente é a forma mais estável devido a menor eletronegatividade do nitrogênio, frente ao oxigênio (SILVA, 2015).

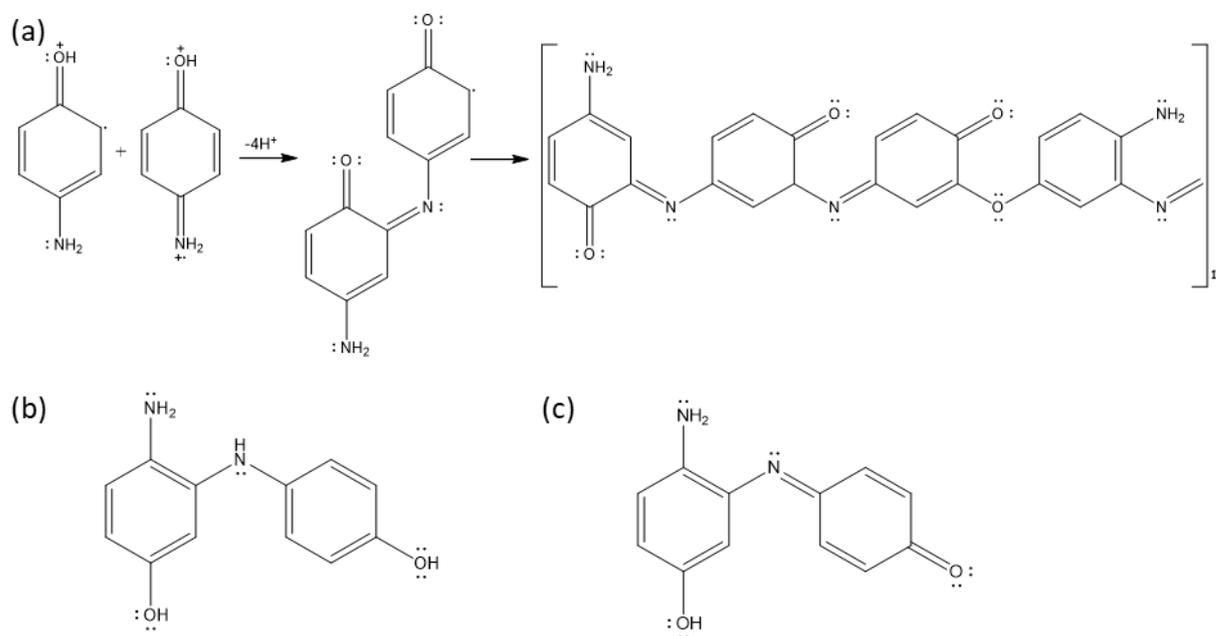
Figura 17 – Representação estrutural da formação cátion-radical do 4-aminofenol pelo grupo amino e pelo grupo hidroxila e suas estruturas de ressonância



FONTE: elaborada pela autora, 2021.

Ambos grupos substituintes são caracterizados como grupos ativantes para substituições eletrofílicas em aromáticos, o que significa dizer que eles direcionam os ataques de nucleófilos na posição *orto* ou *para*. No 4-aminofenol, estando a posição *para* já ocupada em ambos sítios, o ataque ao cátion radical ocorrerá predominantemente na posição *orto*, levando a formação de um dímero, como pode ser visto na Figura 18(a). Thenmozhi e colaboradores propõe que a formação do dímero, pode ocorrer pelos heteroátomos oxigênio ou nitrogênio, na forma quinoide, deixando grupos carbonila ou grupos amino expostos (THENMOZHI *et al.*, 2014). Já Silva, propõe que as unidades de repetição contém grupos aminas benzenóides (Figura 18b) e aminas quinoides (Figura 18c) como predominante na estrutura (SILVA, 2015).

Figura 18 – Representação estrutural do (a) mecanismo proposto para a eletropolimerização da P4AP; e dos dímeros na forma (b) amina benzenóide; e (c) imina quinoide



FONTE: adaptada de THENMOZHI *et al.*, 2014, p. 4, e SILVA, 2015, p. 28.

A eletropolimerização do P4AP ocorre entre os potenciais de +0,35 e +0,5 V (*vs.* eletrodo de calomelano saturado) em meio ácido (FRANCO *et al.*, 2008), já que a oxidação do monômero 4-aminofenol apresenta um pico de redução nessa mesma região de potencial. O filme eletroativo apresenta picos redox na região de +0,4 V (VIEIRA *et al.*, 2006).

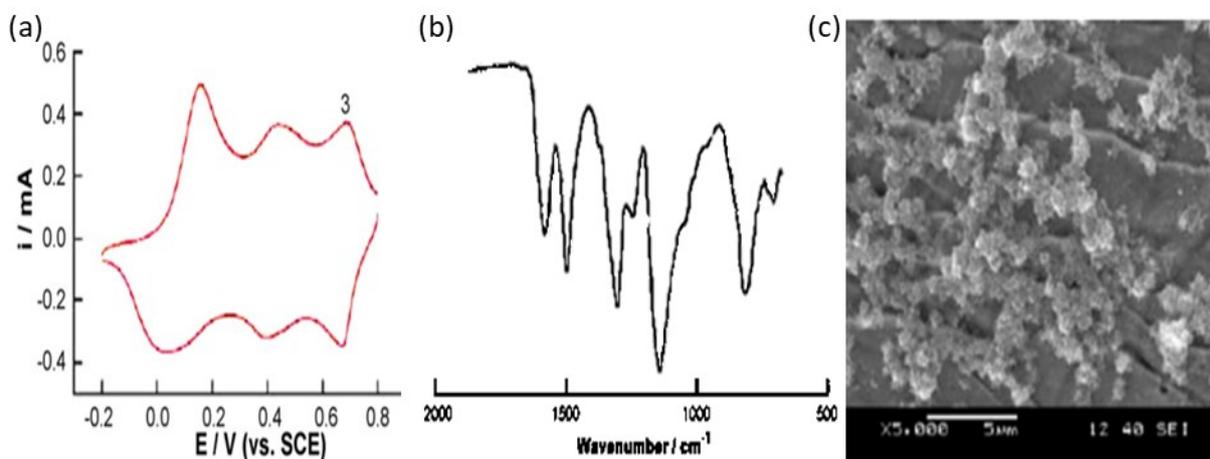
1.3.5 Poli(anilina-co-4-aminofenol)

Copolímeros dos monômeros anilina e aminofenol já são estudados no decorrer dos anos (MU, 2006; LIU, 2006; ZHANG, 2006; KONG, 2012), sendo que o copolímero poli(anilina-co-4-aminofenol) foi estudado pelo grupo de Gao e colaboradores, visando a promoção de melhorias nas propriedades da polianilina, como por exemplo, sua condutividade em $\text{pH} > 4,0$ (CHEN *et al.*, 2008b).

O copolímero foi eletroquimicamente sintetizado sobre eletrodos de platina em meio de ácido sulfúrico, em sistema de três eletrodos, sendo caracterizado eletroquimicamente, estruturalmente e morfologicamente, como mostra a Figura 19. Foi demonstrado nesse estudo

que uma menor concentração de 4-aminofenol no meio reacional favorece a formação do copolímero, ou seja, em maiores concentrações de 4-aminofenol, ele tende a polimerizar consigo mesmo, inibindo a formação do copolímero (CHEN *et al.*, 2008b). Este mesmo efeito foi observado quando se restringe a faixa de potencial para intervalos menores (atingindo apenas o potencial de oxidação do 4-aminofenol).

Figura 19 – Caracterização do copolímero poli(anilina-*p*-aminofenol) do grupo de Gao e colaboradores, sendo: (a) voltamograma cíclico do poli(anilina-*p*-aminofenol) em H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹; velocidade de varredura: 100 mV s⁻¹; (b) espectro do infravermelho do poli(anilina-*p*-aminofenol); e (c) imagem de microscopia eletrônica de varredura do poli(anilina-*p*-aminofenol)



FONTE: Adaptada de CHEN *et al.*, 2008b, p. 3024-3025, 3027.

Esse mesmo grupo fez um estudo da aplicação do copolímero poli(anilina-*p*-aminofenol) para detecção de peróxido de hidrogênio (CHEN *et al.*, 2009a) e de catecol (CHEN *et al.*, 2009b), mostrando que a oxidação dos analitos é catalisada na presença do material copolimérico, devido a melhora na transferência eletrônica pelos grupos hidroxila.

O copolímero poli(anilina-*p*-aminofenol) também foi aplicado sobre eletrodos de grafite na detecção de ácido ascórbico, que também confirmou o comportamento electrocatalítico do filme, melhorando a resolução de pico e sensibilidade da detecção (PARSA e TAJIK, 2017). Por apresentar bons resultados em sensores químicos, o copolímero poli(anilina-co-4-aminofenol) aparece como uma boa proposta para aplicação em biossensores. Uma vez que a anilina já é amplamente empregada, essa derivação pode proporcionar grupos funcionais expostos, promovendo um microambiente biocompatível para imobilização de biomoléculas específicas no diagnóstico ou monitoramento clínico de doenças ou distúrbios.

1.4 Hipertireoidismo

Hipertireoidismo é um dos distúrbios das funções da glândula tireoide, cuja incidência afeta principalmente as mulheres (FRANKLYN, 1994). Um estudo de acompanhamento mostrou uma incidência contínua de 80 casos de hipertireoidismo a cada 100.000 mulheres por ano, durante um período de 20 anos (TAYLOR *et al.*, 2018). Já a prevalência geral de hipertireoidismo ocorre em aproximadamente 1% da população mundial, sendo o distúrbio subclínico atingindo de 0,3 a 1% (STRIEBEL, 2013).

O desencadeamento do hipertireoidismo é devido a elevação dos níveis hormonais tireoidianos, que pode ser causado pelo: surgimento de nódulos produtores autônomos de hormônio; mal funcionamento da glândula tireoide que faz a secreção excessiva de hormônios; presença de anticorpos estimulantes; ou ainda pelo hiperfuncionamento da glândula induzida por iodo (REID e WHEELER, 2005). Os sintomas clínicos mais comuns em pacientes em estados hipertireoidicos são: perda de peso, taquicardia, aumento na frequência de evacuações, ansiedade, etc (RIVAS *et al.*, 2021). Esses múltiplos sintomas podem variar com a idade do paciente, presença de outras doenças, magnitude do excesso hormonal (REID e WHEELER, 2005) e, por isso, o diagnóstico confiável é imprescindível para tratamento correto.

Quando as queixas subclínicas indicam o estado hipertireoidico, exames laboratoriais são solicitados para efetivar o diagnóstico. Para detectar o hipertireoidismo, o protocolo de exames deve ser seguido, conforme detalha a Figura 20. Inicialmente faz-se a dosagem dos hormônios estimulante da tireoide (TSH, do inglês *Thyroid Stimulating Hormone*) e da Tiroxina (T4), que é o principal hormônio da tireoide. Se inconclusivos, é solicitado a dosagem da 3,5,3'-triiidotironina (T3) que é o hormônio ativo da glândula tireoide, e age em todas as células do organismo (HALL e GUYTON, 2011).

A maior parte dos hormônios T3 e T4 circulam pela corrente sanguínea ligados à proteínas transportadoras, dentre as quais podem ser citadas a globulina ligadora de tiroxina (TBG, do inglês *Thyroxine-Binding Globulin*), a transtirretina e a albumina (AZEVEDO *et al.*, 2006). Uma vez que a concentração total destes hormônios é afetada diretamente pela quantidade de proteínas transportadoras, a dosagem da fração livre destes hormônios é mais eficaz para demonstrar o estado metabólico real de pacientes (GOUVEIA *et al.*, 2016).

Figura 20 – Esquema ilustrativo para diagnóstico do hipertireoidismo



FONTE: elaborada pela autora, 2021.

Os tipos de dosagens de T3(Livre) e T4(Livre) podem ser classificados em dois métodos principais: os diretos e os de estimativa (GOUVEIA *et al.*, 2016). Nos métodos diretos há a fase inicial de separação física da fração de hormônios livres da fração dos hormônios ligados. Essa separação física pode ser obtida por ultrafiltração, ultrafiltração em gel ou diálise de equilíbrio. Posteriormente, a quantificação é realizada por imunoenensaio ultrasensível (PIMENTEL e HANSEN, 2005). Os métodos diretos não são automatizados, são tecnicamente exigentes, morosos e dispendiosos. Seus resultados podem sofrer influências do pH e temperatura da análise, diluição da amostra, presença de inibidores da ligação às proteínas

transportadoras e por adsorção dos hormônios aos meios sólidos empregados na técnica (MOROVAT, 2013).

Já os métodos de estimativa, a quantificação é realizada pelo índice dos hormônios T3 e T4 livres, com a utilização de imunoenaios, cuja metodologia é utilizada pela maioria dos laboratórios clínicos (GOUVEIA *et al.*, 2016). Os métodos de estimativa são automatizados e realizados sob condições que minimizam a diluição da amostra, garantindo o equilíbrio da razão fração livre/ligada dos hormônios. Contudo, os resultados podem ter influência da presença de autoanticorpos específicos dos hormônios, assim como das concentrações das proteínas transportadoras, como nos métodos diretos (STOCKIGT, 2001; DUFOUR, 2007).

Em ambos métodos classificados acima, os imunoenaios são utilizados para quantificação dos hormônios. Eles baseiam-se na interação entre anticorpos e antígenos, cuja interação fornecerá um sinal útil para análise. Esse sinal é proveniente de marcadores que são ligados ou no anticorpo ou em antígenos sintéticos adicionados ao meio. Os marcadores mais utilizados no diagnóstico de T3(Livre) são os marcadores radioativos, quimioluminescentes e os enzimáticos (SPENCER, 2013).

Com o diagnóstico conclusivo, o tratamento para hipertireoidismo é realizado com medicação, terapia com iodo radioativo ou cirurgia, visando minimizar os níveis hormonais e a correção do funcionamento glandular. Todavia, o diagnóstico laboratorial comercial é muito suscetível a interferências, principalmente de medicamentos, portanto o avanço em novas metodologias de detecção é fundamental.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um novo material polimérico para aplicação em biossensores, a partir da eletropolimerização da poli(anilina-co-4-aminofenol) sobre eletrodos de grafite.

2.1 Objetivos Específicos

- a) Eletrossintetizar e caracterizar o copolímero poli(anilina-co-4-aminofenol) sobre eletrodos de grafite;
- b) Estudar as melhores condições de eletrossíntese do copolímero poli(anilina-co-4-aminofenol) para aplicação em biossensor;
- c) Construir um imunossensor para T3 sobre a superfície do eletrodo de grafite modificado com o filme copolimérico poli(anilina-co-4-aminofenol);
- d) Caracterizar eletroquimicamente e morfologicamente a superfície do imunossensor construído;
- e) Avaliar a performance analítica do imunossensor proposto.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e soluções

Os seguintes reagentes foram utilizados sem purificação prévia: anilina, ácido sulfúrico, anticorpo anti-3,5,3'-triodotironina, N-etil-N'-(3-(dimetilamino)propil)-carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS) e glicina, obtidos da Sigma Aldrich Chem. (St. Louis, MO, USA, grau P.A.). Ferrocianeto de potássio foi obtido da Fluka Analytical (grau P.A.). Monômero 4-aminofenol e ferricianeto de potássio foram obtidos da Acros Organics (grau P.A.). Tampão fosfato salino foi preparado usando uma mistura das soluções de fosfato monohidrogeno de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), fosfato diidrogeno de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e cloreto de potássio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) obtidos da Neon (grau P.A.).

As soluções foram preparadas medindo-se a quantidade adequada em balança analítica modelo *Shimadzu* AUW220D ou pipetando-se os volumes com (micro)pipetas volumétricas e transferindo-os para balões volumétricos de volume adequado ou microtubos plásticos. O volume final foi obtido pela adição de água deionizada (condutância $0,05 \mu\text{S}$) em sistema Master (Gehaka, Brazil). A solução tampão foi preparada pela autoclavagem da água deionizada em Autoclave modelo Vitali 21L e adição dos reagentes.

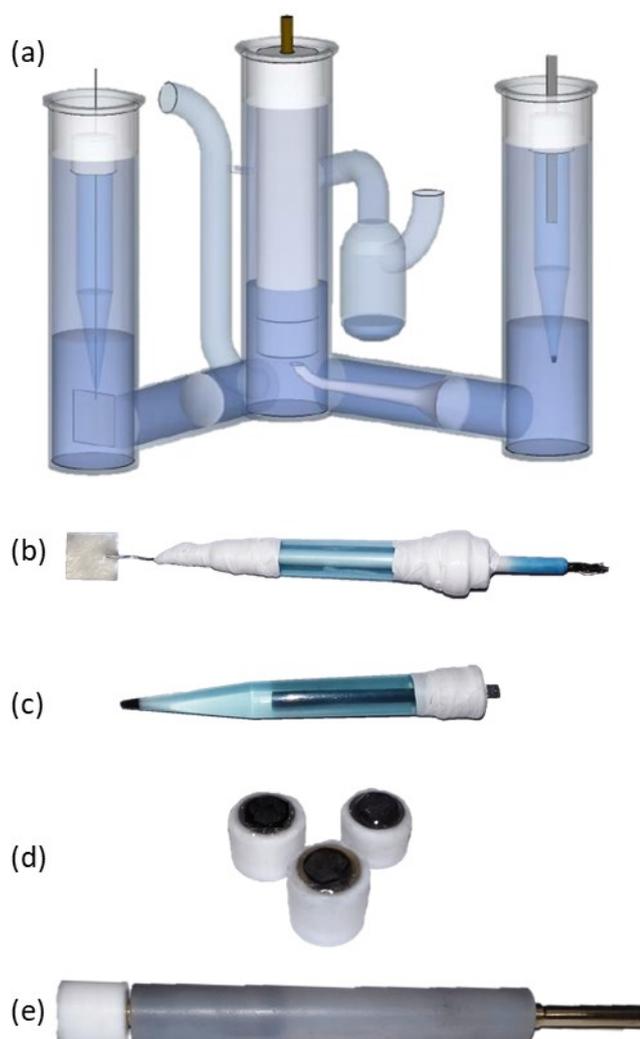
Todas as soluções usadas no sistema eletroquímico, foram preparadas no momento de utilização e purgadas com nitrogênio ultrapuro por 30 minutos antes do seu uso, para remoção do oxigênio dissolvido. As soluções de biomoléculas foram mantidas sob refrigeração em temperatura abaixo de $0 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2 Instrumentação

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em uma célula de três eletrodos com capacidade de 25 mL, Figura 21(a). Os eletrodos consistiram de: uma placa de platina (2 cm^2) como contra-eletrodo, um eletrodo de $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$ ($\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$) como eletrodo de

referência e um eletrodo de disco de grafite como eletrodo de trabalho. Todos esses eletrodos foram produzidos no laboratório, como detalhado em seguida. O contra-eleto-rodo foi construído no interior de um microtubo de 1 mL, onde um fio elétrico de cobre fez o contato da placa de platina com o conector da fonte de potencial, (Figura 21b). Antes da sua utilização, a placa de platina era aquecida ao rubro para remoção de material orgânico.

Figura 21 – Imagens ilustrativas de (a) uma célula eletroquímica de três eletrodos; dos eletrodos (b) auxiliar de platina; (c) de referência de $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$ ($\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$); (d) de trabalho de discos de grafite; (e) rosqueados em base condutora



FONTE: elaborada pela autora, 2021.

O eletrodo de referência também foi construído no interior de um microtubo de 1 mL, que continha uma membrana semipermeável de bateria em sua ponta, e que foi preenchido com uma solução de KCl (3 mol L^{-1}); nessa solução foi imersa uma placa de prata (50 mm^2) revestida com $\text{AgCl}(s)$, exceto no contato com a fonte de potencial (Figura 21c). O AgCl foi

eletrodepositado sobre a placa de prata utilizando a técnica de cronoamperometria em uma célula eletrolítica contendo HCl 0,1 mol L⁻¹, aplicando-se um potencial de +0,7 V por 180 segundos (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

O eletrodo de trabalho é composto por discos de grafite de 6 mm de diâmetro e espessura de cerca de 4 mm, previamente cortados de uma barra de grafite (Alfa Aesar, 99,9999%). Os discos de grafite foram colados sobre peças de latão rosqueáveis no interior de um revestimento de teflon, utilizando para tanto uma cola de prata, também produzida no laboratório. O tempo de cura da cola foi de 24 horas e, após esse tempo, os espaços em torno dos discos de grafite foram preenchidos com cola adesiva epóxi, para garantir o isolamento elétrico (Figura 21d). Por fim esses eletrodos foram rosqueados em uma base condutora de latão (Figura 21e), para contato com a fonte de potencial.

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato (*CHI Instruments* modelo 760C), utilizando o *software* CHI para as técnicas de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial; e um potenciostato/galvanostato Autolab modelo PGSTAT302N e módulo FRA, Eco Chemie, Utecht, utilizando o *software* NOVA, para as medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica.

Espectros de infravermelho foram obtidos com um espectrofotômetro FT-IR Frontier Single Range – MIR (Perkin Elmer, USA) com acessório de reflectância total atenuada (ATR do inglês *Attenuated Total Reflectance*), utilizando cristal de diamante do Laboratório de Fotoquímica e Ciência dos Materiais (LAFOT-CM). Foram obtidos espectros na região de 2000 a 400 cm⁻¹.

Imagens de morfologia da superfície dos eletrodos foram obtidas pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) a partir de um microscópio eletrônico de varredura modelo Vega3 LMU (TESCAN, Czech Republic), operado a 5,00 kV, do Laboratório de Multiusuários do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (IQ-UFU), onde ampliações de até 30.000 vezes foram capturadas. A metalização das amostras foi efetuada por um revestidor de pulverização Quorum 150 R, constituindo um recobrimento de 5 nm com uma corrente de 20 mA.

Imagens de morfologia da superfície dos eletrodos também foram efetuadas utilizando a técnica de microscopia de força atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscope*), a partir de um microscópio de força atômica modelo AFM5100N (Hitachi, Japão).

O microscópio foi operado no modo de contato intermitente, gravadas simultaneamente em temperatura ambiente, utilizando um *cantilever* comercial de silicone, com constante molar de 1,0 N/m e frequência de 0,38 Hz. Dados como altura média (Rz), rugosidade média (Ra) e rugosidade média quadrática (Rq), foram calculados usando o *software SMP Offline – HeightTrace*.

3.3 Seleção dos eletrodos de grafite

Os eletrodos de grafite foram inicialmente polidos em lixas d'água 400 e 2000, de forma manual, e posteriormente polidos em feltro com suspensão de alumina 0,3 μm . Em seguida, os eletrodos passaram por um banho ultrassônico com água deionizada pelo período de 1 minuto, sendo repetido esse procedimento por mais 2 vezes. Por fim, os eletrodos foram secos sob fluxo de nitrogênio ultrapuro, e rosqueados em uma base condutora de latão para tratamento eletroquímico.

Os eletrodos foram condicionados com varreduras cíclicas de potencial, na faixa de potencial de $-0,1\text{ V}$ até $+1,2\text{ V}$ em solução de H_2SO_4 $0,1\text{ mol L}^{-1}$, que foi escolhido como eletrólito suporte. Foram submetidos ciclos de potencial em diferentes velocidades de varredura, visando obter um polimento eletroquímico. Para tanto, foi aplicado em média: 20 ciclos de varredura a 500 mV s^{-1} ; 20 ciclos de varredura a 300 mV s^{-1} ; 10 ciclos de varredura a 100 mV s^{-1} ; e 5 ciclos de varredura a 50 mV s^{-1} . A última velocidade de varredura (50 mV s^{-1}) foi aplicada ao eletrodo de grafite até a estabilização da corrente não-faradaica. Após o condicionamento eletroquímico, os eletrodos foram lavados com água deionizada e secos em fluxo de nitrogênio.

Já é estabelecido no grupo que os valores de corrente entre diferentes eletrodos devem estar próximos de $25\text{ }\mu\text{A}$ para serem considerados aptos para o trabalho eletroquímico. Sendo assim, esse foi o parâmetro base para seleção dos eletrodos para as próximas etapas de preparação. Eletrodos com grande variação nos valores de corrente não-faradaica, ou com a presença de picos óxi-redutivos, foram descartados.

3.4 Armazenamento dos monômeros

O monômero anilina foi destilado em um sistema de destilação fracionada a vácuo antes de ser utilizado. Toda a vidraria utilizada para destilação foi previamente limpa e seca. Após a destilação, o monômero anilina foi estocado em microtubos de ensaio, contendo atmosfera de nitrogênio e mantido em refrigerador para evitar sua oxidação.

O monômero 4-aminofenol foi estocado em recipiente fechado na ausência de luz.

3.5 Eletropolimerização dos polímeros polianilina e poli(4-aminofenol)

Os eletrodos de grafite eletroquimicamente condicionados, foram submetidos a eletropolimerização do polímero PANI ou P4AP. Para tanto, foi utilizada a técnica de voltametria cíclica, com 10 ciclos de potencial, na faixa de potencial de $-0,1$ V a $+1,2$ V quando o monômero era a anilina, e $0,0$ V a $+0,8$ V quando o monômero era o 4-aminofenol. As soluções utilizadas de cada monômero estavam na concentração de 1 mmol L^{-1} em solução de H_2SO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e a velocidade de varredura foi de 50 mV s^{-1} . Todos os processos de eletropolimerização foram realizados em triplicata, onde apenas o perfil voltamétrico que melhor representa o perfil médio de resposta é mostrado neste trabalho.

3.6 Eletropolimerização do copolímero poli(anilina-co-4-aminofenol)

Os eletrodos de grafite eletroquimicamente condicionados, foram submetidos a eletropolimerização do copolímero poli(anilina-co-4-aminofenol), que, neste trabalho, foi nomeado como 4-PANAP. A solução comonomérica em H_2SO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) foi feita a partir da mistura das 2 soluções monoméricas de anilina e 4-aminofenol, com concentração de cada solução comonomérica em $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. A técnica empregada para a eletropolimerização foi

a voltametria cíclica, com aplicação de 10 ciclos de potencial e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

A fim de obter os melhores parâmetros para eletropolimerização do 4-PANAP, algumas variáveis foram estudadas, como:

a) Proporção molar entre os comonômeros:

- As proporções molares entre os monômeros 4-aminofenol (4-AP) e anilina (ANI) estudadas na eletropolimerização do 4-PANAP foram de: 1:1 e 5:1 para 4-AP:ANI, respectivamente.

b) Faixa de potencial utilização para eletropolimerização:

- As faixas de potencial de $-0,1 \text{ V}$ a $+1,2 \text{ V}$ e de $0,0 \text{ V}$ a $+0,8 \text{ V}$ foram aplicadas para estudo da eletropolimerização do 4-PANAP.

c) Velocidade de varredura aplicada:

- A velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} e de 100 mV s^{-1} foram estudadas para a eletropolimerização do 4-PANAP.

Após o processo de eletropolimerização, os eletrodos modificados foram lavados em água deionizada e submetidos a varreduras de potencial, na mesma faixa que foram eletropolimerizados, em solução de H_2SO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) na ausência de monômeros. O intuito de se realizar tal ciclagem é a remoção de monômeros remanescentes na superfície e estabilização da corrente.

Para obtenção do melhor resultado, o critério de seleção foi a melhor resposta eletroquímica na detecção da biomolécula T3. Todos os processos de eletropolimerização foram realizados em triplicata, onde apenas o resultado que melhor representa a média é mostrado neste trabalho.

3.7 Caracterização eletroquímica do copolímero 4-PANAP

Após a eletropolimerização dos filmes PANI, P4AP e 4-PANAP sobre os eletrodos de grafite, os eletrodos foram caracterizados eletroquimicamente em solução de H_2SO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), onde foram efetuados 5 ciclos de potencial, na faixa de potencial inicialmente aplicada em cada eletrodo, até a estabilização da corrente. A partir dessa varredura, foi possível a avaliação do perfil eletroativo do copolímero eletrossintetizado, e comparação com seus polímeros de origem.

Para avaliar o comportamento eletroquímico do filme 4-PANAP frente a transferência eletrônica, os eletrodos modificados foram submetidos a voltametria cíclica em solução de 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 mmol L^{-1} após o processo de eletropolimerização. Para tanto, 5 ciclos de potencial na faixa de $-0,1 \text{ V}$ a $+0,5 \text{ V}$ foram aplicados, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Apenas o último ciclo foi utilizado para o estudo, onde foi possível calcular a carga envolvida, pela equação

$$Q = i t \quad \text{eq. 3}$$

onde Q é a carga (C), i é a corrente (A), cujo valor corresponde ao valor de corrente de pico (I_p) obtido, e t é o tempo (s), obtido ao dividir o valor do potencial de pico (E_p) pela velocidade de varredura. Esses resultados foram utilizados para comparação com os resultados obtidos ao fazer o mesmo procedimento com os eletrodos modificados com PANI e P4AP.

Após a definição de todos os parâmetros da eletropolimerização do filme 4-PANAP, a análise do perfil voltamétrico em H_2SO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) do eletrodo modificado com 4-PANAP, passou a ser o critério de seleção dos eletrodos a serem utilizados nas etapas posteriores, onde eletrodos que apresentaram picos de redução/oxidação fora dos E_p padrão estabelecidos, ou até mesmo aqueles que apresentaram um perfil eletroquímico diferente do perfil definido como padrão, foram descartados.

3.8 Caracterização morfológica e estrutural do copolímero 4-PANAP

Os eletrodos modificados com 4-PANAP foram analisados estruturalmente por espectros de infravermelho e morfológicamente por imagens de AFM e MEV. Os equipamentos e parâmetros utilizados são aqueles descritos no item 3.2. Após a eletrossíntese, os eletrodos modificados foram secos sob fluxo de gás nitrogênio ultrapuro e colocados em dessecador a vácuo, em temperatura ambiente, por 24 horas antes da análise. Durante o deslocamento, os eletrodos foram mantidos em atmosfera de nitrogênio ultrapuro em sistemas fechados. As imagens obtidas foram analisadas e comparadas com seus polímeros de origem.

3.9 Construção de um biossensor para obtenção da melhor resposta do filme 4-PANAP

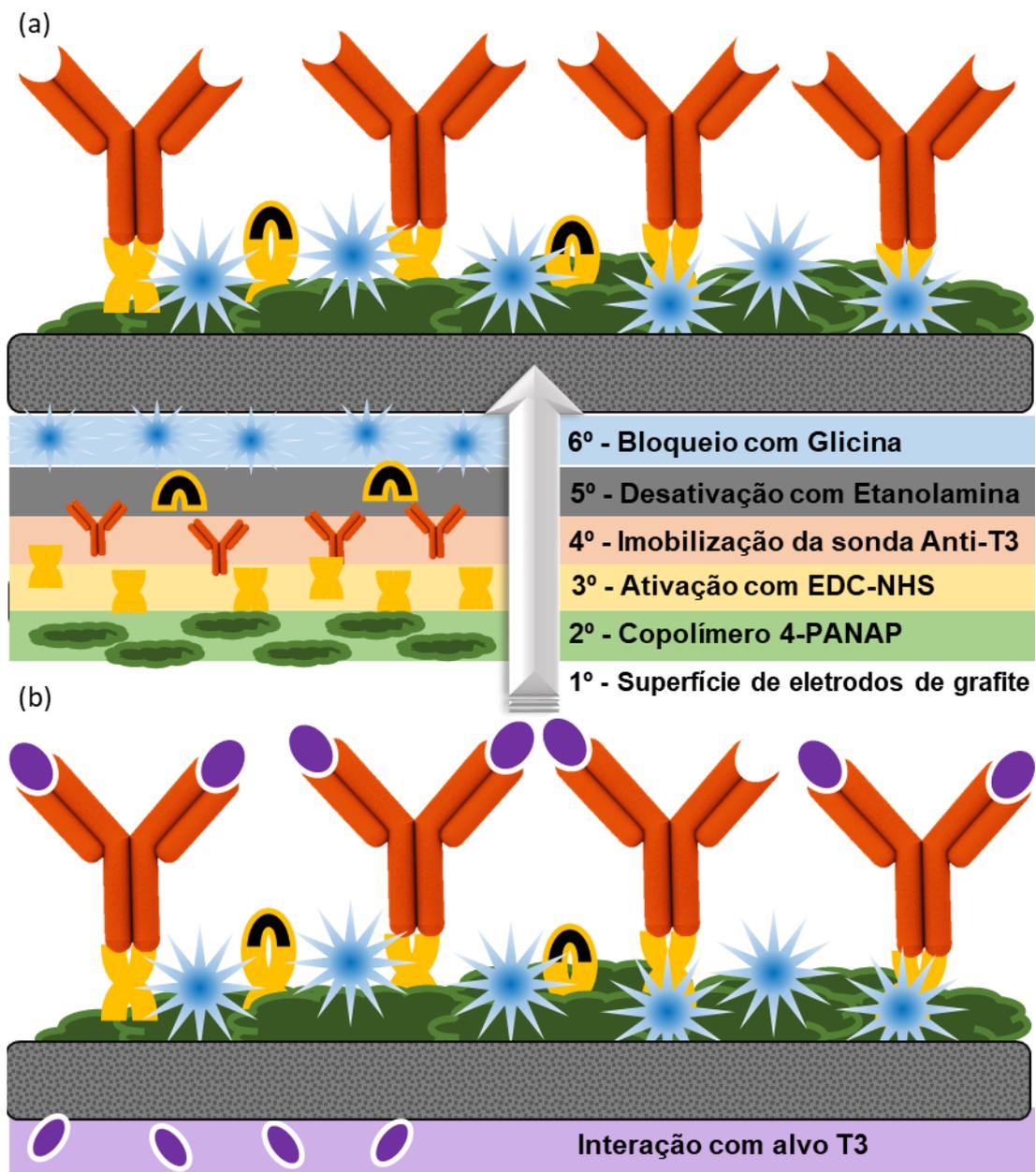
Todo o trabalho de otimização das condições de eletrossíntese do filme 4-PANAP, descrito no item 3.3.4 foi avaliado frente as respostas obtidas na detecção do alvo T3. Assim, foi necessário a construção de um biossensor para avaliação de parâmetros do copolímero. A escolha das biomoléculas Anti-T3 e T3 se baseou em estudos anteriores do grupo (SEGATTO, 2017; SILVA, 2017), que possibilitariam a análise comparativa da performance do material copolimérico, como uma ferramenta de imobilização das biomoléculas.

Para construção do imunossensor eletroquímico foi seguido o seguinte protocolo: uma mistura equimolar das soluções de EDC e NHS 5 mmol L^{-1} foi gotejada sobre a superfície dos eletrodos modificados com 4-PANAP e deixados em reação por 10 minutos. A utilização de EDC-NHS tem como objetivo a ativação da superfície copolimérica (SAM *et al.*, 2010). Essa ativação permite a imobilização do anticorpo anti-T3 de forma mais orientada, minimizando adsorções aleatórias, com enterramento de sítios ligantes ou aglomerações das moléculas do anticorpo. Em seguida, os eletrodos foram lavados com água deionizada e secos sob fluxo de nitrogênio.

Foram gotejados $10 \mu\text{L}$ da solução de anti-T3 na superfície ativada e deixados por 30 minutos para imobilização da sonda, para depois realizar o enxague com solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7.4. Uma solução de etanolamina $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi gotejada sobre essa

superfície e mantida por 5 minutos, para desativação dos grupos EDC-NHS que não se ligaram ao anticorpo. Por fim, foi usada uma solução de glicina 50 mmol L⁻¹ para efetuar o bloqueio da superfície, com o objetivo de minimizar a ocorrência de reações não-específicas ou não desejáveis, a qual ficou em contato por 60 minutos, seguido de enxague com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4. Foi utilizado para toda a biofuncionalização, o gotejamento de 10 µL de cada solução. Um esquema representativo da construção do imunossensor proposto para T3 pode ser observado na Figura 22.

Figura 22 – (a) Ilustração representativa da elaboração do imunossensor Anti-T3; e (b) Imunossensor após interação com alvo T3



O alvo T3 utilizado foi proveniente de amostras de soro, obtidas pelo Laboratório Sabin em Uberlândia/MG e quantificada pelo método comercial de eletroquimioluminescência. Para contato com a plataforma biossensor, o soro sem mais tratamentos foi gotejado na superfície e deixado reagir por 30 minutos. Em seguida foi feito o enxague em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4, e esses eletrodos foram considerados aptos para detecção.

3.10 Avaliação eletroquímica do copolímero 4-PANAP frente ao biossensor

Todas as detecções foram realizadas utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial, na faixa de potencial de $-0,1 \text{ V}$ a $+0,5 \text{ V}$, em solução eletrólito de $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mmol L^{-1} , com 50 mV de amplitude e velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} . Assim, o sinal de detecção observado para toda a análise de resposta foi o pico de oxidação de ferrocianeto de potássio para ferricianeto de potássio.

Para cada parâmetro estudado na eletrossíntese do copolímero 4-PANAP, foram construídos eletrodos em três grupos: o primeiro grupo continha os eletrodos modificados apenas com o copolímero 4-PANAP; o segundo grupo continha a plataforma biossensor dos eletrodos modificados com 4-PANAP até a etapa de bloqueio com a glicina; e o terceiro grupo consistia da plataforma biossensor completa, ou seja, dos eletrodos modificados com 4-PANAP, construída a biofuncionalização até o bloqueio com glicina e feita a interação com o Alvo-T3.

Para esses três grupos, a detecção foi realizada como mencionado acima. A diferença dos sinais obtidos de corrente de pico entre os grupos, foi o critério usado para análise das melhores condições de eletropolimerização do 4-PANAP. Em detalhe, a diferença do valor de corrente de pico entre o grupo contendo só o filme copolimérico e o filme com a biomolécula sonda foi calculada, e essa diferença foi atribuída ao sinal de sonda; a diferença do valor de corrente de pico entre o grupo com a sonda e após a interação com alvo também foi calculada, e essa diferença foi atribuída ao sinal de alvo. Esses valores calculados de sonda e alvo foram usados como comparação quando se alterava os parâmetros da eletropolimerização. Para comparação, a plataforma biossensora também foi construída nas superfícies de PANI e P4AP.

A fim de complementar os resultados obtidos pela técnica voltamétrica, a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica foi empregada nas mesmas superfícies. As medidas de impedância foram realizadas com solução de KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), contendo o par redox $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1 mmol L^{-1}), variando-se a faixa de frequências de 10.000 a 0,01 Hz, com amplitude de 10 mV.

3.11 Construção da curva analítica

Para construção da curva analítica do alvo T3, foi definido a faixa de trabalho (FT) conforme eq. 4, tendo como referência a concentração de T3(Livre) presente no sangue considerada como normal, sendo de 2,00 a 4,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (SABIN, 2019).

$$0,1 \times LR_{\text{mín.}} < FT < 2,0 \times LR_{\text{máx.}} \quad \text{eq. 4}$$

onde LR são os limites de referência mínimo e máximo.

Mediante cálculo, foi estabelecido que a faixa de trabalho para a construção da curva analítica seria de 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 8,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da concentração de T3 nas amostras de soro. Para obtenção de 06 pontos, a faixa de trabalho foi dividida para obtenção de pontos equidistantes, o que resultou nos seguintes pontos de concentração: 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 1,92 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 3,64 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 5,36 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 7,08 $\mu\text{g mL}^{-1}$; e 8,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para preparo das amostras de soro nessas concentrações, a amostra de soro utilizada foi comercialmente quantificada pelo método de eletroquimioluminescência e a partir do resultado obtido, as diluições para concentrações menores foram realizadas com adição de solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH 7,4; enquanto a obtenção de concentrações maiores foi alcançada adicionando quantidades calculadas de T3 sintético.

A elaboração da curva analítica foi feita sob as mesmas condições e mesmos parâmetros utilizados para construção do biossensor. Para tanto, foram preparadas várias superfícies eletródicas contendo o copolímero 4-PANAP com os parâmetros otimizados e a sonda Anti-T3 imobilizada, juntamente com as moléculas de bloqueio, conforme procedimento descrito anteriormente. As superfícies imunossensoras já preparadas foram divididas em 06 grupos distintos de análises, onde cada grupo foi submetido a detecção de uma concentração

definida, ou seja um ponto da curva. Todas as medidas de detecção foram realizadas via monitoramento do valor de I_{pa} do processo oxidativo do Fe^{2+} proveniente de $K_4Fe(CN)_6$ (5 mmol L^{-1}) em meio de solução de KCl ($0,1\text{ mol L}^{-1}$) utilizando a técnica de VPD com amplitude de 50 mV , na faixa de potencial de $0,0$ a $+0,5\text{ V}$ e velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} .

3.12 Estudo de estabilidade

O estudo de estabilidade foi realizado a fim de verificar a manutenção do sinal eletroquímico do imunossensor proposto, ao fazer o armazenamento para posterior utilização, ou seja, da plataforma construída até a imobilização do bloqueio glicina. Para tanto, foram preparadas várias superfícies eletródicas contendo o copolímero 4-PANAP com os parâmetros otimizados e a sonda Anti-T3 imobilizada, juntamente com as moléculas de bloqueio, conforme procedimento descrito anteriormente.

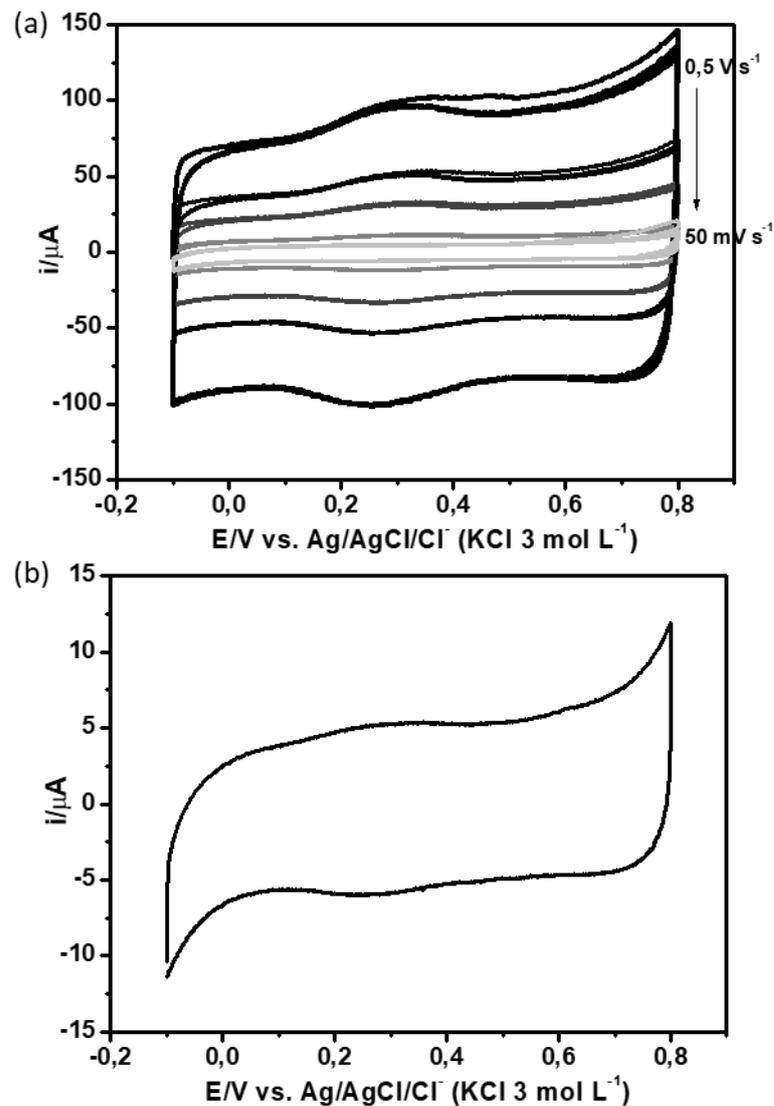
As superfícies imunossensoras já preparadas foram divididas em 05 grupos distintos de análises, que foram submetidos a detecção em intervalos de 10 dias. Detalhadamente o grupo 0 foi submetido a detecção no dia 0, o grupo 1 submetido a detecção no dia 10, o grupo 2 submetido a detecção no dia 20 e, assim sucessivamente até o dia 60. As medidas de detecção foram realizadas em solução eletrólito de KCl $0,1\text{ mol L}^{-1}$ contendo $K_4Fe(CN)_6$ 5 mmol L^{-1} . Os eletrodos foram mantidos em temperatura em torno de 4° C , em sistemas fechados durante todo o período de estocagem.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Seleção dos eletrodos de grafite

A seleção inicial dos eletrodos de grafite foi realizada a partir da análise de voltamogramas obtidos em eletrólito suporte (H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$), como mostra a Figura 23.

Figura 23 – Voltamogramas cíclicos dos EG em solução do H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para (a) condicionamento eletroquímico em diferentes velocidades de varredura; (b) último ciclo em 50 mV s^{-1}



FONTE: elaborada pela autora, 2021.

Como a velocidade de varredura foi variada, esse processo foi denominado de polimento eletroquímico realizado nos eletrodos de grafite, Figura 23(a), para obtenção de um perfil eletroquímico definido como padrão pelo grupo de pesquisa para os eletrodos de grafite, Figura 23(b).

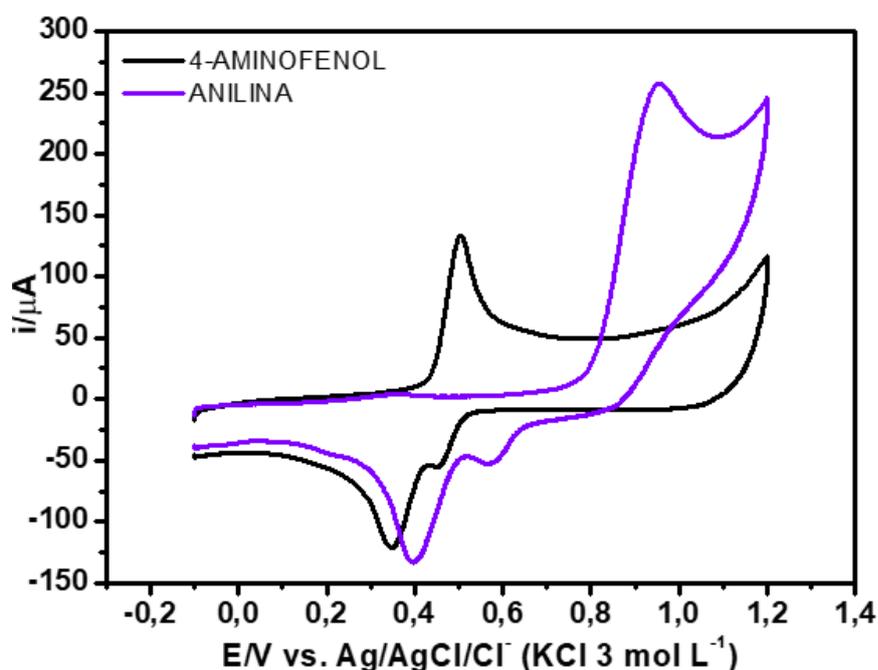
A varredura cíclica em solução do eletrólito suporte visa a remoção de impurezas nesta janela de potencial, que possam estar adsorvidas na superfície do eletrodo após o processo de polimento. A aplicação das diferentes velocidades de varredura visa a melhor estabilização da corrente capacitiva do eletrodo, e é justificado pelas melhores respostas obtidas nas etapas posteriores. O perfil padrão dos eletrodos de grafite apresentou corrente predominantemente capacitiva, cujas magnitudes de valor estavam dentro da faixa de 12 a 30 μA .

4.2 Análise do perfil característico de PANI e P4AP

No sentido de conhecer o perfil dos filmes poliméricos de origem do 4-PANAP, foi feito um estudo do processo de eletropolimerização da PANI e P4AP, bem como sua caracterização estrutural. Esses filmes foram eletrossintetizados nas mesmas condições que 4-PANAP foi. Os voltamogramas apresentados na Figura 24 mostram apenas o primeiro ciclo de eletropolimerização da anilina e do 4-aminofenol, em eletrodos separados.

Ao observar as magnitudes de corrente de pico anódica (I_{pa}) do processo de oxidação de cada monômero na Figura 24, ao traçar a linha de base do pico, ambos monômeros apresentam a mesma intensidade de oxidação, em torno de 129,3 μA . Já ao observar o valor de potencial de pico, é observado que o 4-aminofenol tem maior facilidade frente a oxidação, visto que seu potencial de oxidação ocorre em valores menores (+0,5 V) do que a anilina (+0,95 V). Esse fato é condizente com a presença de um segundo grupo funcional no 4-aminofenol, que proporciona maior quantidade de estruturas de ressonância, propiciando maior estabilidade ao cátion radical formado.

Figura 24 – Primeiros ciclos obtidos por VC na eletropolimerização da PANI 1,0 mmol L⁻¹ e P4AP 1,0 mmol L⁻¹ em meio de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ na superfície de EG

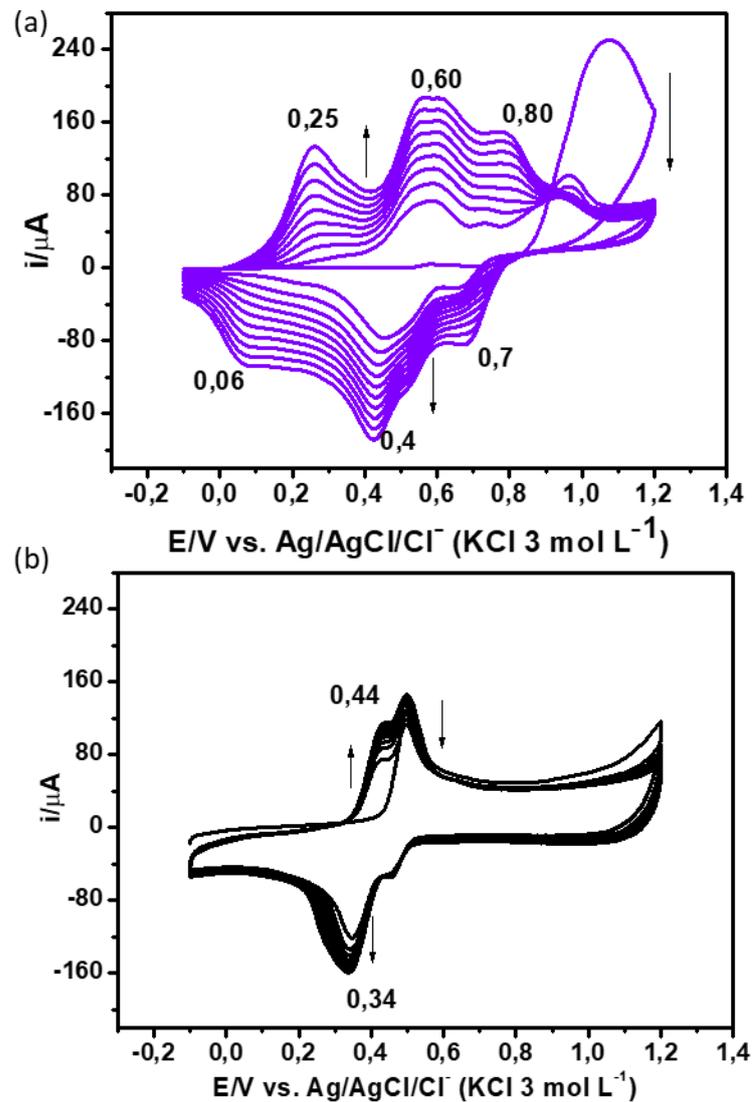


FONTE: elaborada pela autora, 2021.

Os voltamogramas completos dos processos de eletropolimerização de PANI e P4AP são aqueles mostrados na Figura 25. A formação da PANI mostrada na Figura 25(a), seguiu o perfil clássico observado na literatura (IRAM *et al.*, 2012), com a presença de 3 pares redox, nas seguintes faixas de potencial: o par +0,06/0,25 V, atribuído à transformação do estado reduzido leucoesmeraldina (LE) ao estado parcialmente oxidado (esmeraldina – ES); o par redox +0,40/0,60 V, atribuído a oxidação do estado intermediário; e o par em +0,70/0,80 V referente a transição para o estado pernigranilina (PG) completamente oxidado (IRAM *et al.*, 2012).

Já o processo de eletropolimerização da P4AP mostrado na Figura 25(b), mostra o pico catódico do processo oxidativo do monômero 4-AP, relativo a característica reversível desse monômero, diferentemente do que costuma ser observado para outros monômeros. Com o decorrer dos ciclos, percebe-se que houve uma diminuição na intensidade da corrente de oxidação do 4-aminofenol, e um aumento na resposta eletroativa do filme poli(4-aminofenol). Estes fatos são condizentes com o consumo dos monômeros durante o processo e, conseqüentemente aumento da quantidade de material formado sobre a superfície eletródica. O filme eletroativo P4AP apresentou apenas um par redox em cerca de +0,4 V.

Figura 25 – Voltamogramas cíclicos consecutivos da eletropolimerização de (a) PANI 1,0 mmol L⁻¹ e (b) P4AP 1,0 mmol L⁻¹; com 10 ciclos em meio de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹, 50 mV s⁻¹, na superfície de EG

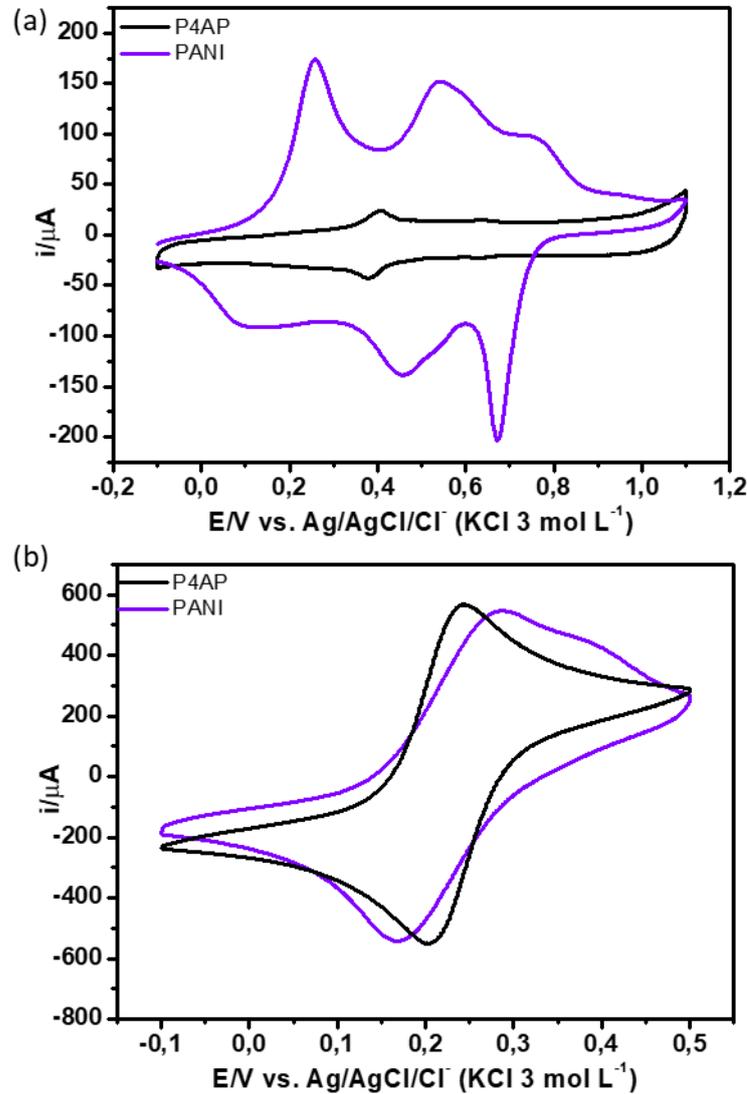


FONTE: elaborada pela autora, 2021.

A figura 26 mostra os perfis característicos dos filmes PANI e P4AP após o processo de eletropolimerização em solução de eletrólito suporte, e frente ao processo de oxidação/redução do ferrocianeto/ferricianeto de potássio.

Ao analisar a Figura 26(a), é possível observar que apesar do monômero 4-aminofenol ter maior facilidade para formação do cátion radical, o polímero PANI tende a formar em maior quantidade do que P4AP na superfície do eletrodo, visto a maior área apresentada no voltamograma, que é diretamente proporcional a área eletroativa do material.

Figura 26 – Voltamogramas cíclicos obtidos em (a) H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; e em (b) KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo o par aniônico $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ dos EG modificados com P4AP e PANI; velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}



FONTE: elaborada pela autora, 2021.

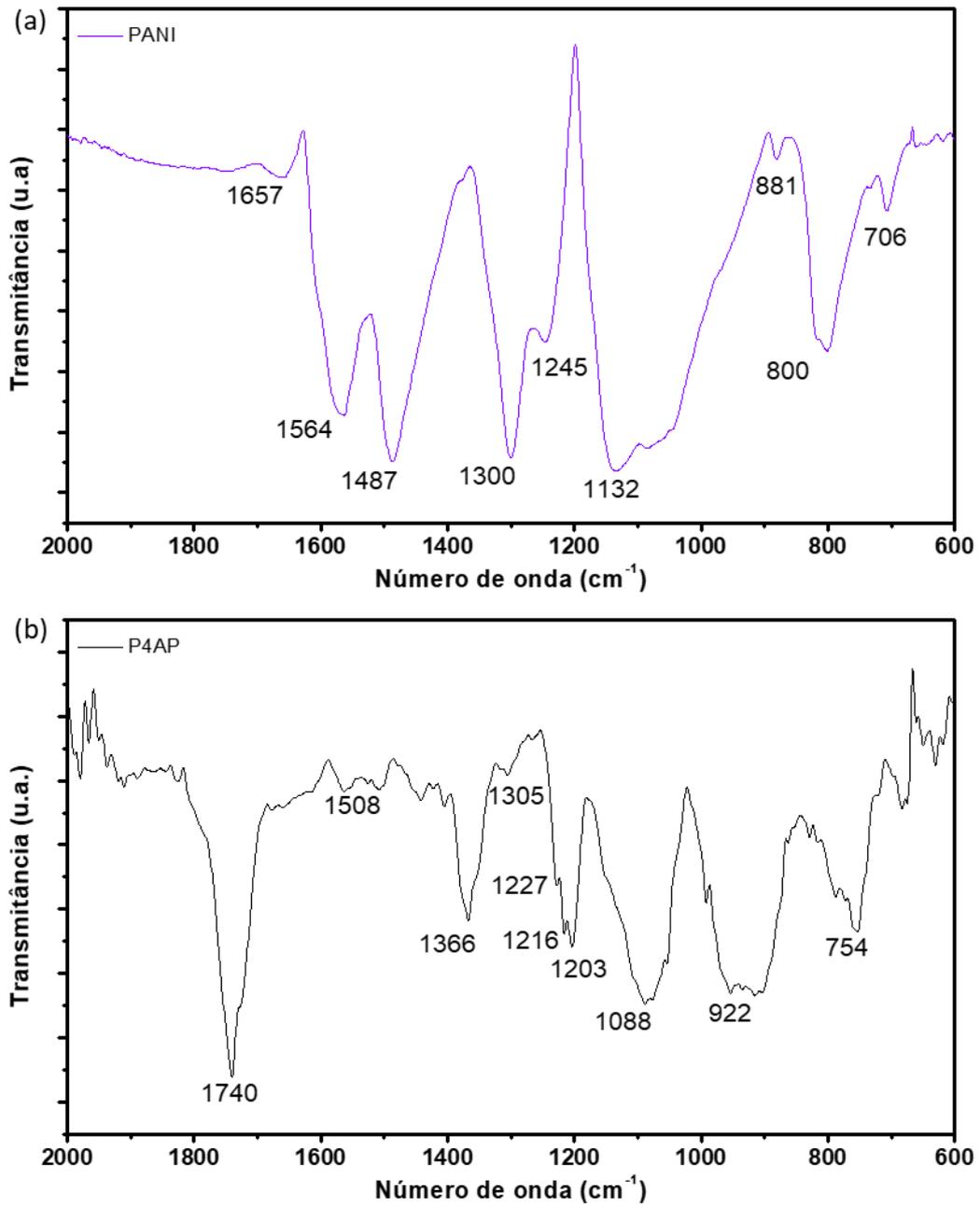
Ao observar os mecanismos de polimerização proposto para os filmes PANI e P4AP na introdução deste trabalho, Figuras 12 e 18 respectivamente, é notável que a unidade de repetição da PANI é uma estrutura pequena, enquanto a unidade de repetição proposta para P4AP é uma estrutura relativamente maior e mais complexa. Talvez, esse seja o motivo para a maior formação da PANI, uma vez que uma unidade pequena de repetição deve facilitar o encadeamento das unidades e o crescimento polimérico.

Na avaliação de transferência eletrônica frente ao par aniônico $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ mostrado na Figura 26 (b), a PANI apresentou um perfil suavemente mais resistivo do que P4AP, observado pelo deslocamento do E_p para valores mais anódicos, $\Delta E_{pa} = 0,045 \text{ mV}$, não

esperado pelo fato da boa condutividade elétrica desse polímero. Porém, esse resultado pode ser atribuído a maior formação de material na superfície do eletrodo, comparado ao P4AP.

Na caracterização estrutural, os espectros de infravermelho para PANI e P4AP são mostrados na Figura 27. O espectro da PANI, Figura 27(a), é bastante similar ao apresentado na literatura (TRCHOVÁ *et al.*, 2004).

Figura 27 – Espectros de infravermelho para (a) PANI e (b) P4AP



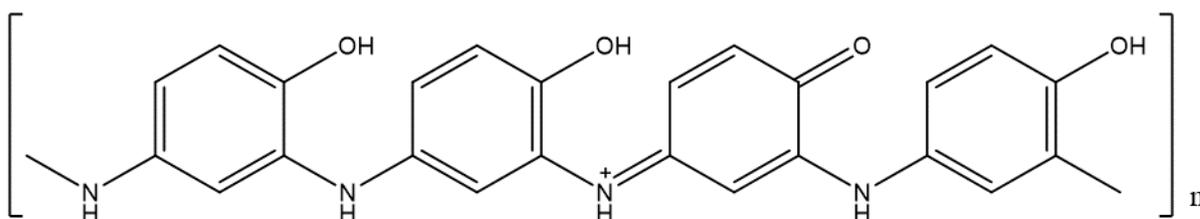
FONTE: elaborada pela autora, 2021.

No espectro de PANI (Figura 27a) é possível observar a presença de bandas bem acentuadas, como em 1564 cm^{-1} que pode ser atribuída a uma mistura dos estiramentos dos grupos C=C e C=N do anel quinóide, enquanto a banda em 1487 cm^{-1} é característico a estiramentos vibracionais de C=C em anéis benzenóides. A banda em 1300 cm^{-1} está relacionado com estiramentos de grupos C–N de aminas secundárias aromáticas, o que indica a formação de estruturas C–N–C, enquanto a banda em 1245 cm^{-1} é atribuído à forma protonada C–N⁺. A banda em 1132 cm^{-1} é atribuída a vibrações de formas protonadas como –NH⁺ e a banda em torno de 800 cm^{-1} é devido a estiramentos C–H fora do plano vibracional (TRCHOVÁ *et al.*, 2004).

Já ao observar o espectro de P4AP, Figura 27(b), a banda mais acentuada está em 1740 cm^{-1} , que pode ser atribuído a vibrações dos estiramentos dos grupos C=O, revelando que, nesse trabalho, grande parte dos grupos –OH foram oxidados. Em seguida, as bandas de pequenas intensidades na região de 1508 cm^{-1} estão relacionados com estiramentos de grupos N–H de aminas secundárias e C=N, o que indica formação de estruturas C–N–C. As bandas em 1217 cm^{-1} são devidas a mistura de vibrações de grupo C–O e O–H, sugerindo a existência de grupos OH– livres (CHEN *et al.*, 2008a).

Essas observações sugerem modificações no mecanismo proposto pelo grupo de Thenmozhi para o P4AP (THENMOZHI *et al.*, 2014), uma vez que foi proposto a existência de apenas grupos carbonílicos (–C=O) ou na função éter (–C–O–C–), cuja banda característica em 1150 cm^{-1} não foi observada neste trabalho. Por outra via, o grupo de Chen (CHEN *et al.*, 2008a) havia proposto que a polimerização do P4AP tem o crescimento da cadeia preferencialmente pelo grupo amino, o que vai ao encontro com a proposta de Silva (SILVA, 2015), como mostra a Figura 28.

Figura 28 – Proposta de mecanismo de polimerização do P4AP

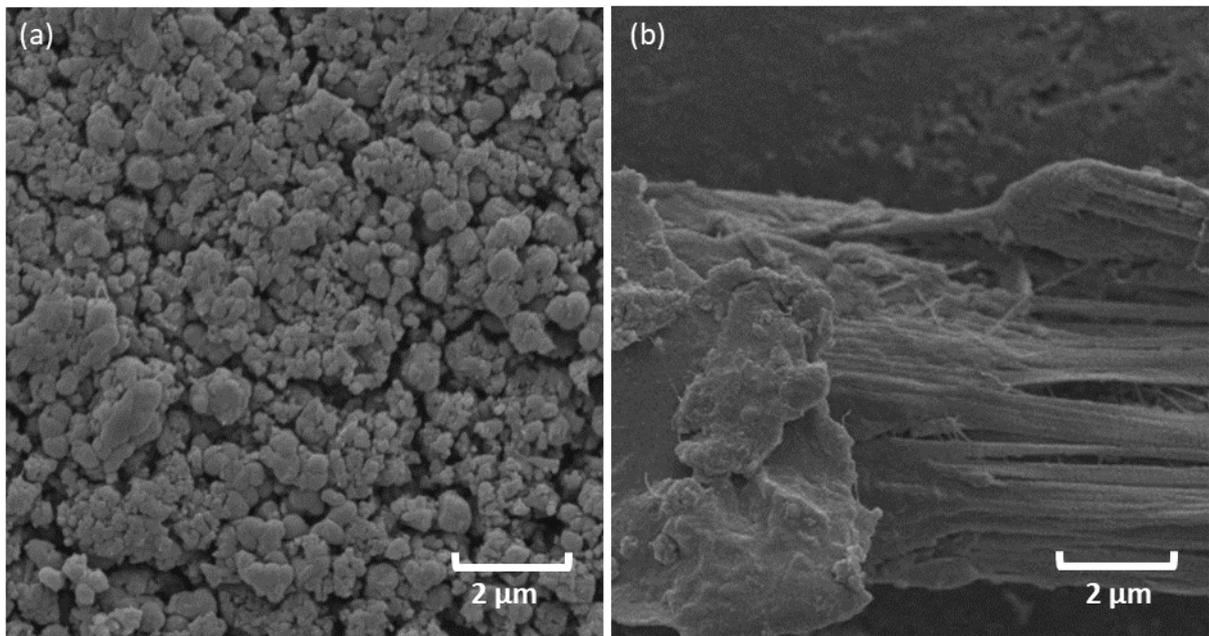


FONTE: adaptada de CHEN *et al.*, 2008a, p. 977.

Na caracterização morfológica mostrada na Figura 29, as imagens de MEV para PANI (Figura 29a), são condizentes com o levantamento da literatura (YAZDANPANAHA *et*

al., 2019), apresentando um ótimo recobrimento de superfície com estruturas globulares. Já as imagens obtidas de P4AP, Figura 29(b), mostram um material com morfologia mais fibrosa, que não recobre totalmente a superfície, deixando exposto partes do eletrodo de grafite. O motivo pode ser devido a pequena quantidade de material formado, como observado nos voltamogramas do filme. Esse perfil também condiz com o observado na literatura (CHEN *et al.*, 2008a), porém com quantidade inferior de material estruturado.

Figura 29 – Imagens de MEV com ampliação de 20.000 Kx para (a) PANI e (b) P4AP

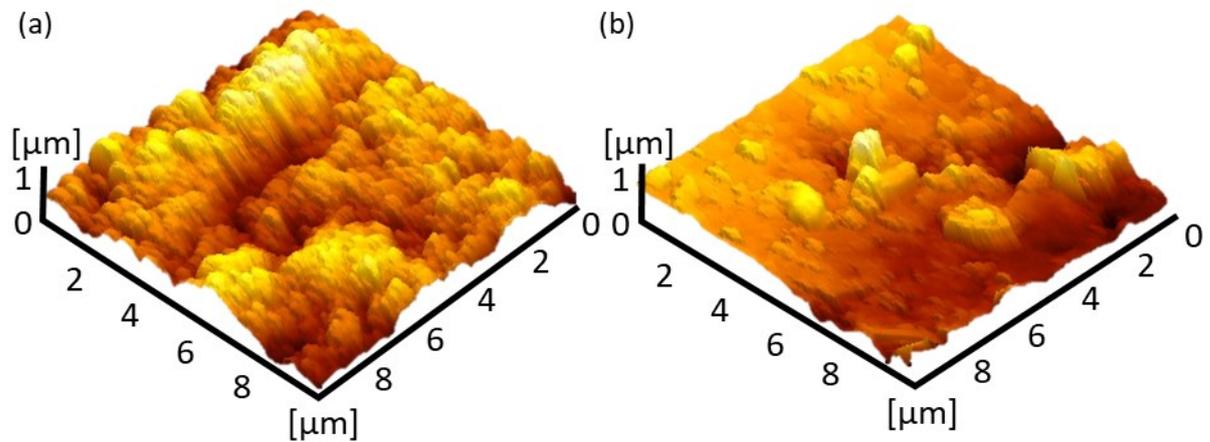


FONTE: elaborada pela autora, 2021.

As imagens de AFM mostradas na Figura 30, corroboram com as imagens obtidas no MEV, com alto recobrimento da PANI. Por outro lado, os valores de R_q da PANI (245 nm) não apresentam diferença significativa daqueles de P4AP (213 nm), apesar do alto recobrimento de superfície, o que sugere que tal recobrimento é bastante uniforme na superfície eletródica.

Todos os resultados obtidos por caracterização eletroquímica, morfológica e estrutural para a PANI e o P4AP mostrados até aqui, foram definidos como padrão de comparação para o copolímero proposto.

Figura 30 – Imagens de AFM em três dimensões para (a) PANI e (b) P4AP

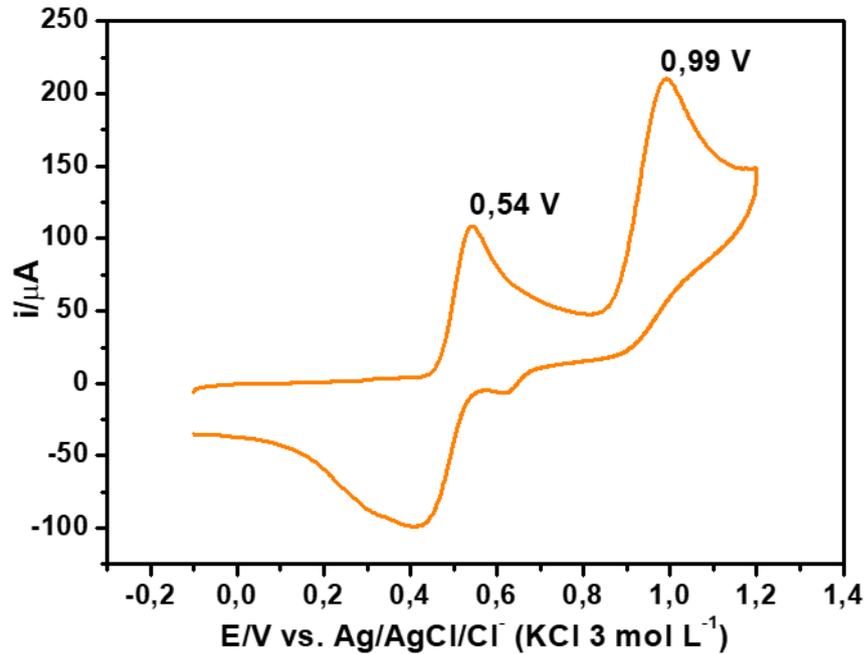


FONTE: elaborada pela autora, 2021.

4.3 Eletropolimerização e caracterização eletroquímica do copolímero 4-PANAP

Com uma solução equimolar dos comonômeros anilina e 4-aminofenol ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$), o copolímero foi inicialmente eletropolimerizado nas mesmas condições que seus polímeros de origem, para avaliação de alterações nos perfis antes observados. A Figura 31, apresenta o voltamograma do primeiro ciclo de eletropolimerização para 4-PANAP. É observada a presença dos dois potenciais de pico de oxidação dos comonômeros 4-aminofenol e anilina. Ao comparar esse gráfico com aquele observado na Figura 25, pode-se notar que não houve deslocamento significativo dos valores de potenciais de pico. Como a oxidação do 4-aminofenol ocorre primeiro, pode-se afirmar que, nesse primeiro momento, a formação do cátion radical 4-aminofenol não dificulta a formação inicial dos cátions radicais anilina. Por outro lado, ao observar as magnitudes de corrente de pico, pode-se dizer que houve maior formação de cátion radical anilina do que de 4-aminofenol.

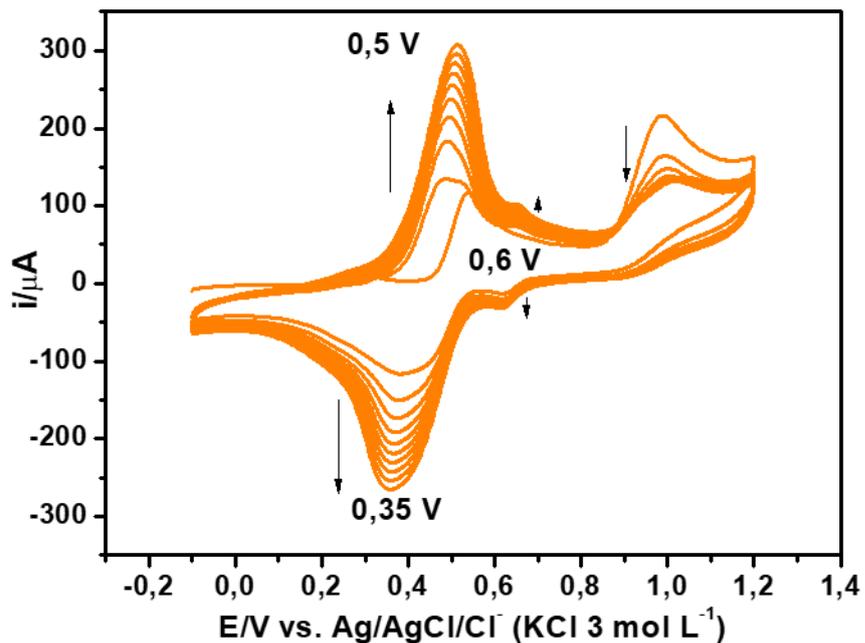
Figura 31 – Primeiro ciclo obtido por VC na eletropolimerização de 4-PANAP $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na superfície de EG, velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}



FONTE: elaborada pela autora, 2021.

O voltamograma completo da eletropolimerização de 4-PANAP pode ser visto na Figura 32. É apresentado um perfil de crescimento do filme bastante diferente daqueles observados para P4AP e PANI.

Figura 32 – Voltamograma cíclico consecutivo da eletropolimerização de 4-PANAP $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$; com 10 ciclos em meio de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 50 mV s^{-1} , na superfície de EG

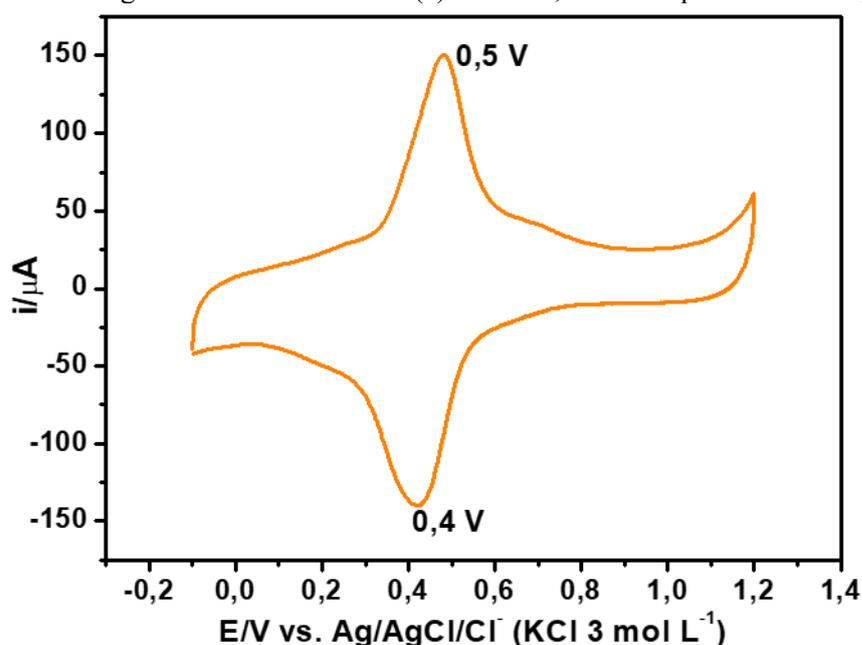


FONTE: elaborada pela autora, 2021.

Em detalhe, a partir da Figura 32, os picos redox em +0,25 V e +0,80 V que na PANI apresentava alto valor de magnitude, não são observados na eletropolimerização de 4-PANAP; apenas o pico na região de +0,6 V da PANI aparece como um ombro no voltamograma de 4-PANAP. Quando comparado ao processo de eletropolimerização de P4AP, percebe-se certa similaridade com 4-PANAP, estando o pico anódico deslocado de +0,40 V para +0,50 V, e o pico catódico na mesma região, diferenciado apenas por um alargamento do pico. Outra diferença observada também é a magnitude dos valores de corrente de pico, que são consideravelmente maiores, quando comparado aos seus polímeros de origem. Esses resultados podem estar relacionados com a somatória dos picos de oxidação de P4AP e PANI de mesma região, indicando a formação de um material polimérico diferente daqueles já conhecidos.

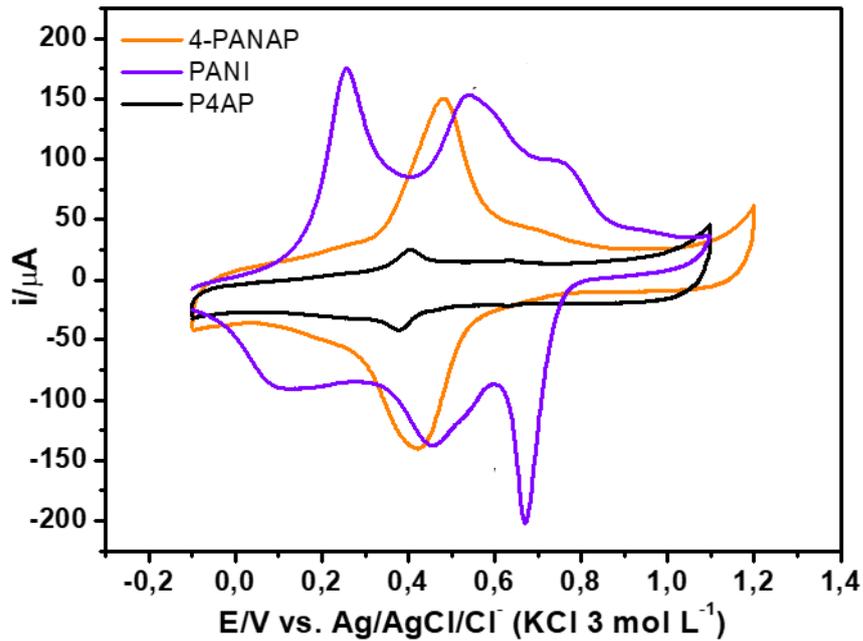
O perfil obtido do filme 4-PANAP após o processo de eletropolimerização é mostrado na Figura 33. É notado, a partir da Figura 33, que o filme 4-PANAP apresenta apenas um par redox, na região de +0,5 V, o que é bastante similar ao observado em P4AP (Figura 34), porém, a área mostrada desse filme é bastante similar à da magnitude observada em PANI (Figura 34), o que pode ser resultado de um efeito sinérgico dos dois comonômeros. A partir desse perfil eletroquímico, é possível sugerir que a estrutura copolimérica deve conter grupos expostos em sua cadeia, provenientes do 4-aminofenol, visto pela região eletroativa de potencial similar entre os dois; enquanto a estrutura da cadeia deve ser mais similar ao da PANI, visto pela magnitude de corrente observada.

Figura 33 – Voltamograma cíclico obtido em (a) H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} para 4-PANAP, 50 mV s^{-1}



FONTE: elaborada pela autora, 2021.

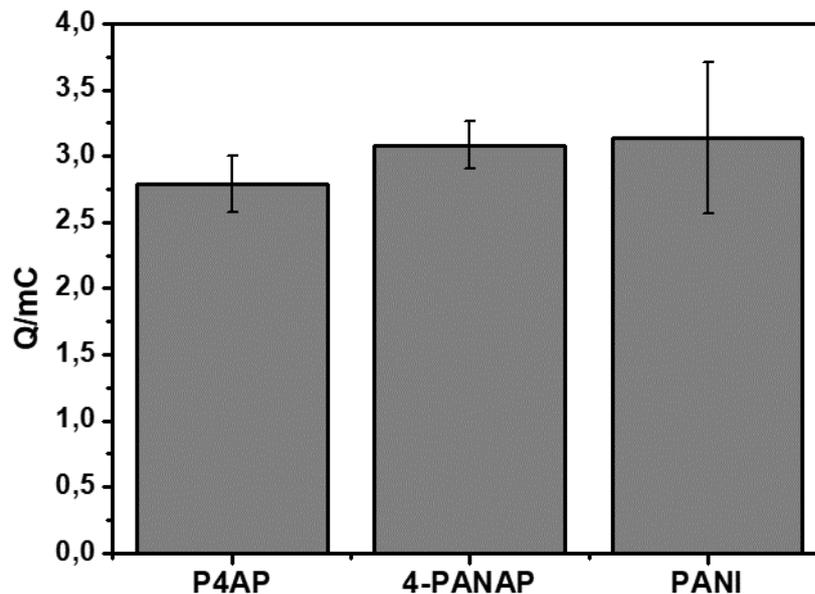
Figura 34 – Voltamogramas cíclicos comparativos entre 4-PANAP e seus homopolímeros



FONTE: elaborada pela autora, 2021.

O estudo de transferência eletrônica, que foi realizado com a sonda aniônica $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, mostrou que o copolímero 4-PANAP não apresentou diferença significativa frente a seus polímeros de origem, Figura 35. A quantidade de carga envolvida no copolímero 4-PANAP fica entre as cargas envolvidas para PANI e P4AP, indicando, mais uma vez, em um efeito sinérgico entre os comonômeros.

Figura 35 – Quantidade de Carga envolvida para cada filme polimérico



FONTE: elaborada pela autora, 2021.

Essas mudanças observadas no perfil eletroquímico são indicativos de que um novo material foi incorporado na superfície dos eletrodos de grafite, diferente de seus polímeros de origem, que foi embasado pelas técnicas de imagem a seguir.

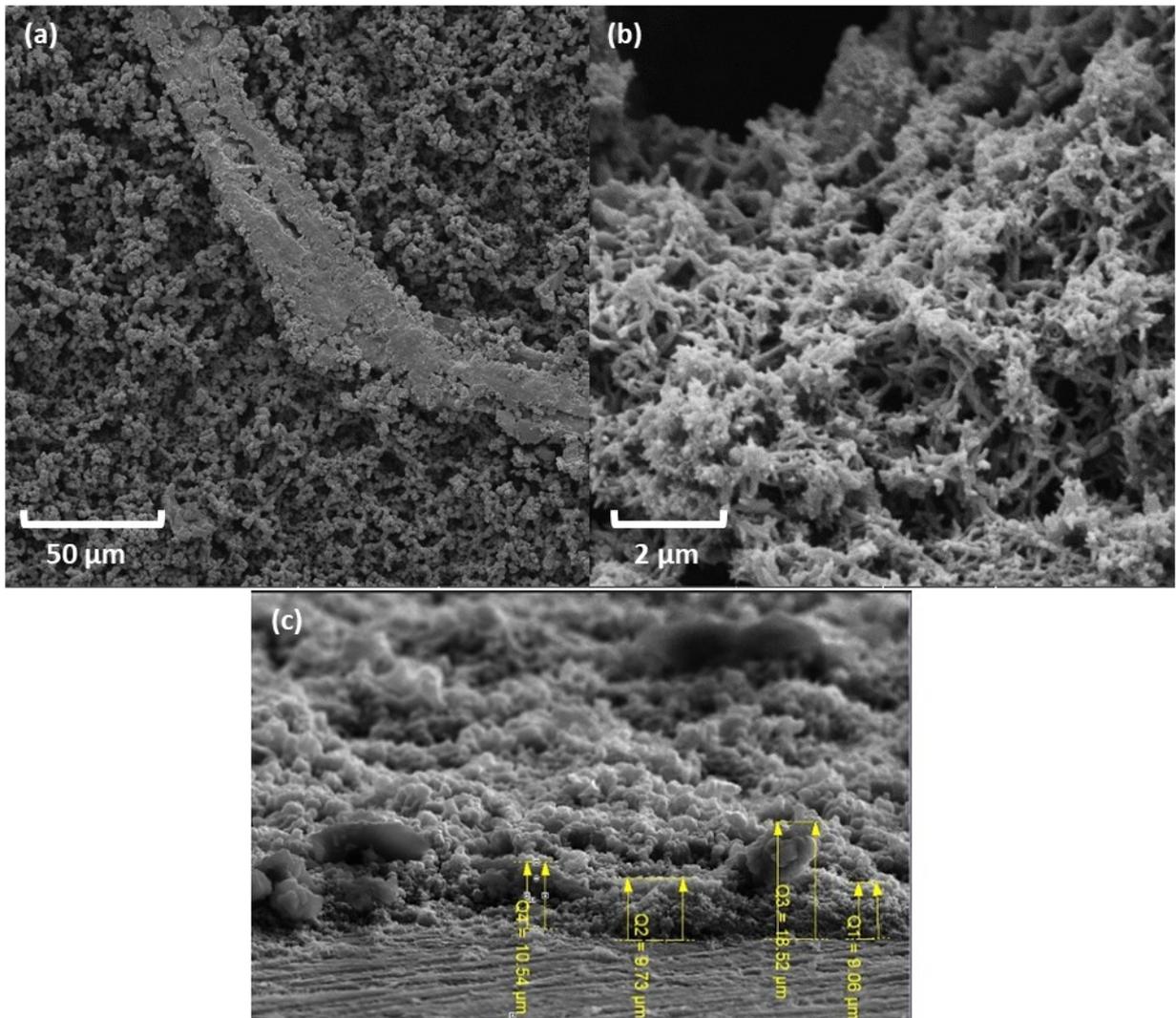
4.4 Caracterização morfológica e estrutural do copolímero 4-PANAP

Imagens de MEV de 4-PANAP, Figura 36, revelam uma grande quantidade de material formado na superfície do eletrodo de grafite espalhado de maneira bastante uniforme, Figura 36(a). A morfologia globular observada anteriormente para PANI (Figura 29a) e a morfologia linear do P4AP (Figura 29b), dão espaço agora para estruturas interconectadas em espécies de fibras globulares no copolímero 4-PANAP, Figura 36(b), que chegam a ter uma espessura média de 12 μm , Figura 36(c). Ao observar as imagens da Figura 36 e compará-las com as imagens da Figura 29, pode se pensar na contribuição dos dois comonômeros para a morfologia resultante.

Alguns pesquisadores tem mostrado que a morfologia da PANI eletrossintetizada é afetada por alguns fatores, como: utilização de membranas-modelo (MARTIN, 1995; CHOI e PARK, 2000); espessura do material eletropolimerizado (ZHANG *et al.*, 1995); técnica eletroquímica empregada (LIANG *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2003); natureza do contra-íon proveniente do eletrólito (ZHANG *et al.*, 1995); utilização de dopantes (LANGER *et al.*, 2001; WEI e WAN, 2003); velocidade de varredura (ANDARADE *et al.*, 1998); natureza do eletrodo (DALMOLIN *et al.*, 2005) e etc. Em todos esses trabalhos é relatado a obtenção de fibras e/ou tubos na escala nano ou micro, relacionados a PANI.

Neste trabalho a alteração da morfologia observada de globular para fibrosa, é relacionada unicamente a presença de monômeros 4-aminofenol ao meio. Por outras perspectivas, o produto obtido poderia ser caracterizado apenas como uma PANI dopada que resultou em uma morfologia de fibras. Contudo, como o grupo de Wei e colaboradores relatam (WEI e WAN, 2003), o produto pode ser simultaneamente caracterizado como um material copolimérico, visto que os monômeros/dímeros/oligômeros de 4-aminofenol fazem parte da cadeia polimérica e se repetem ao longo da mesma.

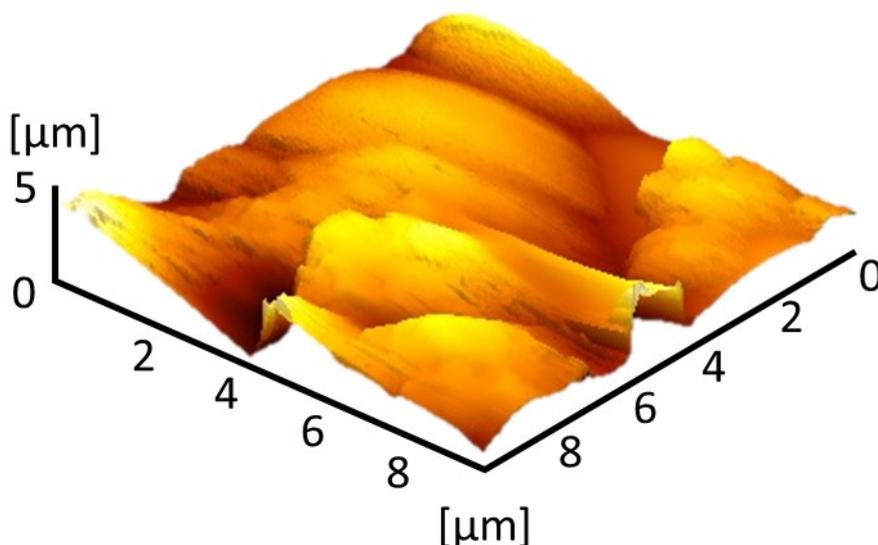
Figura 36 – Imagens de MEV para 4-PANAP com ampliação de (a) 1.000 Kx; (b) 20.000 Kx e (c) dados de sua espessura



FONTE: elaborada pela autora, 2021.

As imagens de AFM, Figura 37, para 4-PANAP corroboram com o observado nas imagens de MEV, caracterizando-se como um material altamente poroso e com alto valor de R_q (645 nm), que chega a ser 2,6 vezes maior que a de seus polímeros de origem. Este valor maior de rugosidade pode ser positivo na aplicação em biossensores, pensando-se na biocompatibilidade da interface eletrodo/biomoléculas. As caracterizações de imagem revelam que as morfologias observadas para 4-PANAP contém diferenças nítidas quando comparado com P4AP e PANI, sintetizados nas mesmas condições, o que indica ser uma nova estrutura polimérica. Quando é visada a aplicação desse material como um ambiente para recebimento de biomoléculas, espera-se um bom resultado devido a riqueza de profundidades no material, que podem ser fontes de grupos orgânicos.

Figura 37 – Imagens de AFM em três dimensões para 4-PANAP

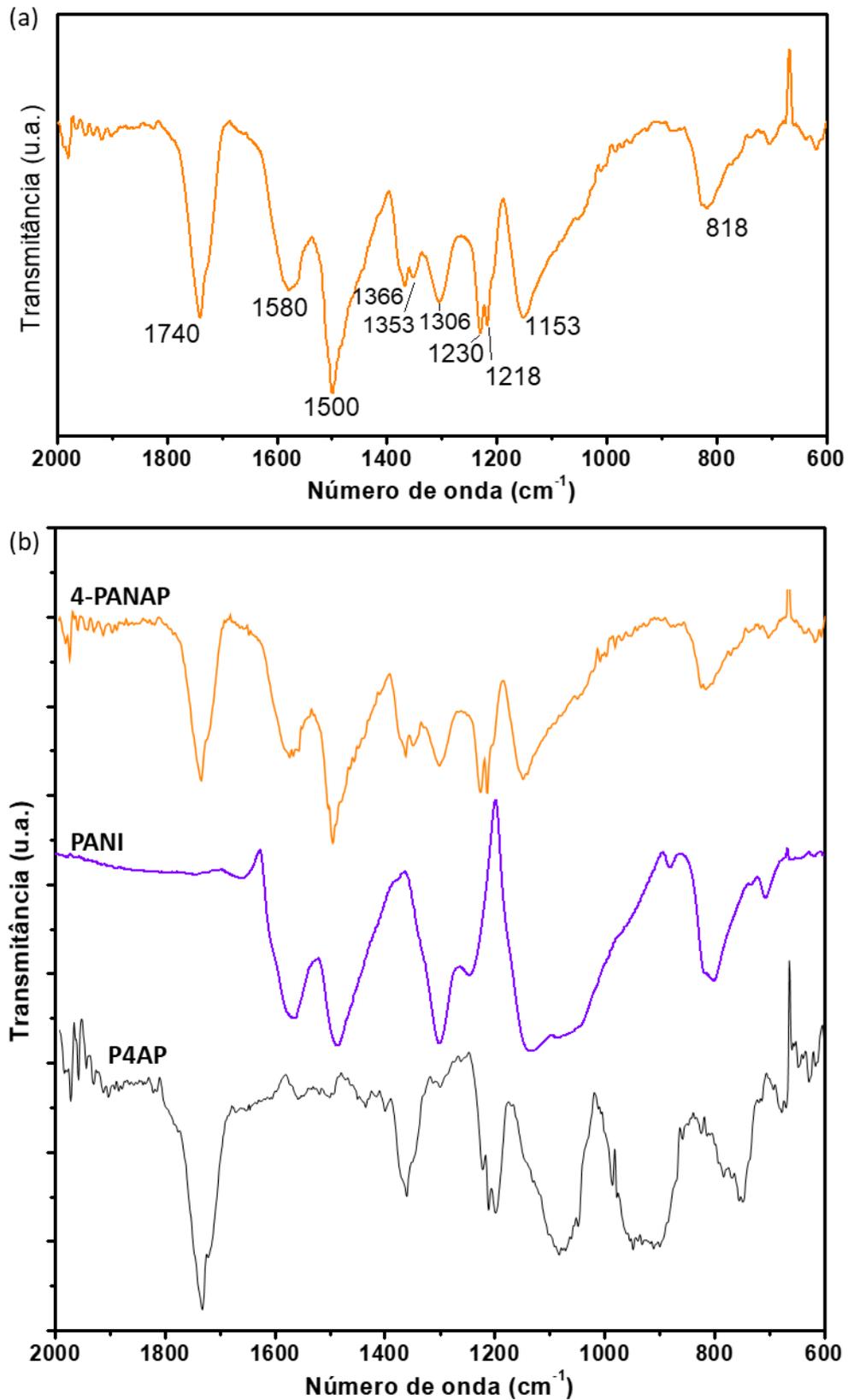


FONTE: elaborada pela autora, 2021.

O espectro de infravermelho obtido para 4-PANAP mostrado na Figura 38 pode ser interpretado como uma somatória dos espectros de PANI e P4AP. É notória a presença de bandas características de PANI na região de 1578 cm^{-1} e 1499 cm^{-1} atribuídas aos grupos C=N e C=C, como já discutido anteriormente. Já no espectro de P4AP e de 4-PANAP, observa-se o mesmo pico acentuado na região de 1739 cm^{-1} atribuídos aos grupos C=O, em 1366 cm^{-1} referente a grupos C–N vizinho a amins quinoides, e em 1230 cm^{-1} e 1217 cm^{-1} relacionados a estiramentos vibracionais de C–O e O–H, respectivamente. Percebe-se que o pico em 1305 cm^{-1} é comum a todos os espectros e está relacionado ao grupo C–N–C.

As diferenças mais acentuadas observadas entre os três espectros é a ausência das bandas relacionadas a estiramentos de C–H aromáticos dentro e fora do plano, nas regiões de 1088 cm^{-1} , 922 cm^{-1} e 754 cm^{-1} , observadas anteriormente no espectro de P4AP, assim como ausência da banda relacionada à formas protonadas no nitrogênio, em 1245 cm^{-1} atribuídas aos estiramentos de C–N⁺ e N–H⁺, respectivamente. Por outro lado, percebe-se que as bandas na região de 1366 cm^{-1} e $1227\text{--}1216\text{ cm}^{-1}$, atribuídos a grupos –C–O–C–, foram acentuadas. Outro ponto observado é a diminuição nas intensidades das bandas daquelas já existentes em PANI. Estes resultados reforçam a suposição de que a estrutura do copolímero deve ser composta por uma mistura dos grupos funcionais de seus polímeros de origem, e que o crescimento da cadeia polimérica pode acontecer de forma aleatória, como descrito abaixo.

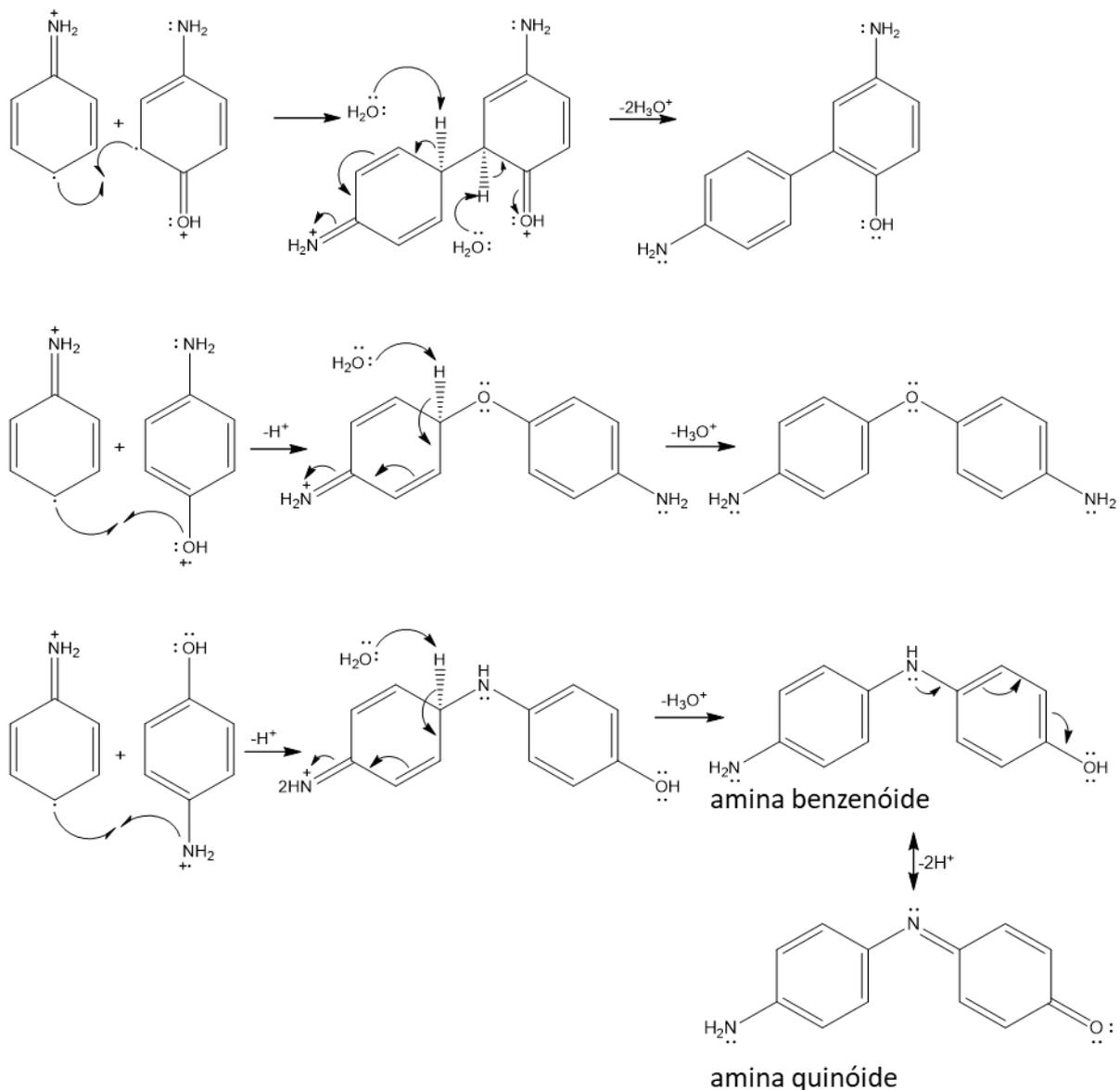
Figura 38 – Espectros de infravermelho para (a) 4-PANAP; e (b) comparativo com P4AP e PANI



FONTE: elaborada pela autora, 2021.

A partir do infravermelho do filme 4-PANAP é possível propor mecanismos de eletropolimerização do copolímero, bem como prever seu arranjo estrutural. Lacerda propôs que pode ocorrer três possibilidades de ataques de radicais entre as moléculas de anilina e 4-aminofenol, sempre partindo do ataque da molécula anilina na posição *para*, como pode ser visto na Figura 39, (LACERDA, 2020). A partir dos ataques propostos, é possível a formação de três dímeros diferentes, ora acoplamento anel/anil, ora acoplamento anel/heteroátomo.

Figura 39 – Proposta de mecanismo para a formação de dímeros do 4-PANAP proposto por Lacerda



FONTE: adaptada de LACERDA, 2020, p. 53.

A partir dos resultados de espectroscopia de infravermelho obtidos neste trabalho, pode-se levantar alguns pontos interessantes para discussão: a ausência de picos de grupos C–

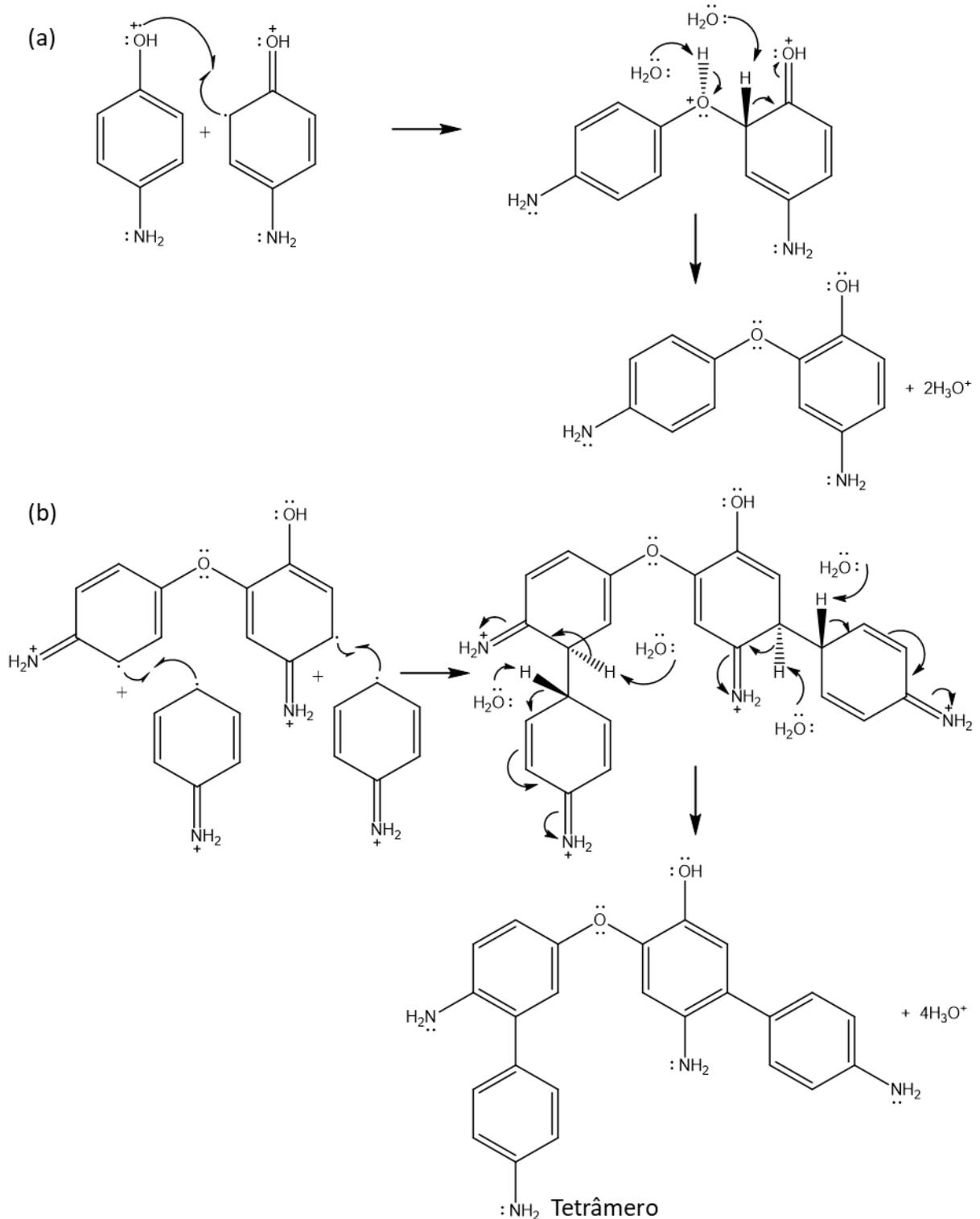
H indicam que muitos hidrogênios ligados ao anel aromático foram substituídos por outros grupos ligantes, o que vai ao encontro da proposta do primeiro dímero sugerido por Lacerda (LACERDA, 2020). Por outro lado, os picos característicos de grupos $-C-N-C-$, $-C=N-$ e $-C-O-C-$, indicam que os três arranjos de heteroátomos são possíveis, também sugerido pelo autor. Portanto, pode-se pensar na estrutura polimérica como uma mistura de arranjos estruturais de forma randômica.

Ao pensar no processo de eletropolimerização, na formação do carbocátion e no primeiro ataque, pode-se pensar em duas possíveis vias: a cinética e a termodinâmica. A via termodinâmica está relacionada com a energia envolvida e, portanto, com a espontaneidade da reação. Já a via cinética relaciona-se com a via mais rápida e, em geral, requer um fator externo extra para promovê-la. No início do processo de eletropolimerização, o potencial de oxidação da molécula de 4-aminofenol é o primeiro a ser atingido e os dois grupos da molécula podem ser oxidados.

Pensando na via termodinâmica, o grupo amino seria primeiramente oxidado, já que o nitrogênio é menos eletronegativo do que o oxigênio e, portanto, aceita melhor uma carga parcial positiva, sendo a forma intermediária mais estável. Porém, o grupo hidroxila apresenta uma maior densidade de elétrons, sendo mais fácil o encontro de um elétron para retirada durante a aplicação de um sobrepotencial, em um processo cineticamente favorável. Além disso, uma carga parcialmente positiva no oxigênio colocaria a molécula mais reativa do que no outro grupo. Como a banda em 1150 cm^{-1} , atribuída ao grupo $-C-O-C-$ tem uma intensidade levemente maior do que aquelas atribuídas a amina secundária, acredita-se que a reação seja iniciada com a forma oxidada na hidroxila.

O cátion radical reativo formado tende a atacar a molécula mais próxima vizinha, mas, pensando que ainda se encontra na região de oxidação de moléculas 4-aminofenol, a vizinhança é predominantemente composta por moléculas 4-aminofenol oxidadas que, portanto, devem gerar o início da cadeia. Como não há registros nos espectros de bandas $-C-O-O-C-$, o ataque do grupo hidroxila oxidado ocorre no anel, em alguma estrutura de ressonância. Levando em consideração a via cinética, a estrutura ressonante mais próxima ao grupo hidroxila, é o radical na posição *orto* com relação ao mesmo, podendo levar a formação, em sua maior parte, dímeros entre duas moléculas de 4-aminofenol com o oxigênio como heteroátomo, como mostra a Figura 40(a).

Figura 40 – Proposta de mecanismo de início de processo de eletropolimerização de 4-PANAP por via cinética, evidenciando a formação de um (a) dímero; e um (b) tetrâmero

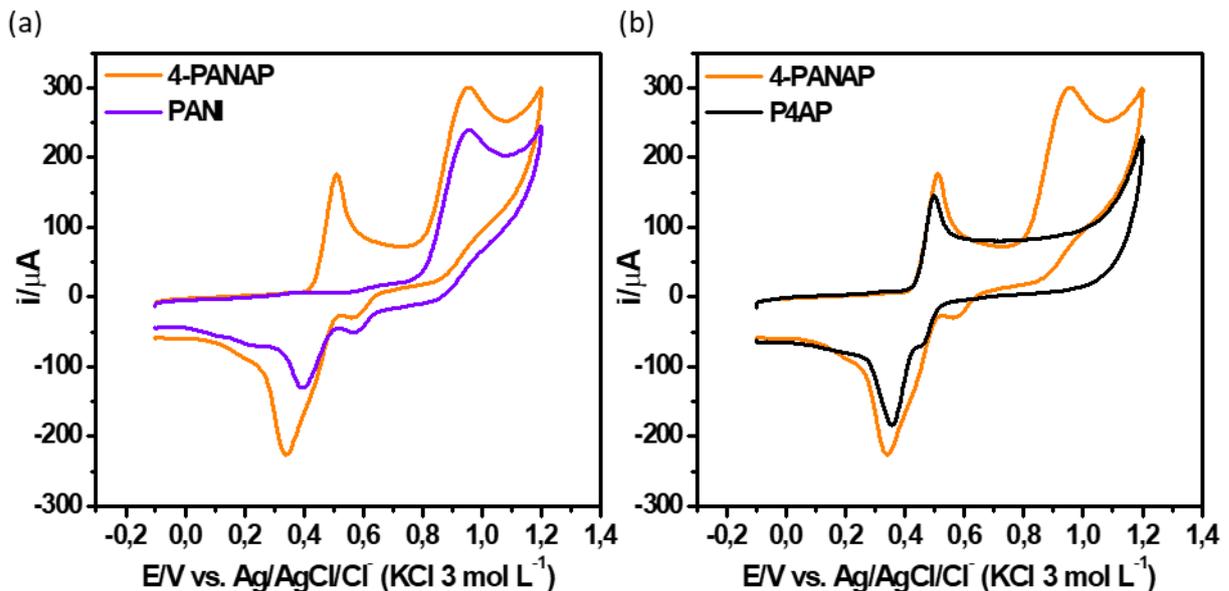


FONTE: elaborada pela autora, 2021.

Na região de oxidação das moléculas de anilina, em potencial próximo a +1,0 V, há uma atração maior dos monômeros anilina para a interface eletrodo-solução, para ocorrer o

processo de oxidação da anilina. Simultaneamente, os dímeros gerados também podem se oxidar no grupo amino, levando a um aumento no valor de corrente de pico anódica (cerca de 17%) para o processo de oxidação que seria somente da anilina. Este fato é evidenciado quando compara-se o pico de oxidação na região de +1,0 V, proveniente somente da solução de anilina, com o pico de oxidação na mesma região proveniente da mistura comonomérica, como mostra a Figura 41(a). Por outro lado, este comportamento não é observado ao se comparar com o primeiro ciclo de eletropolimerização de P4AP, Figura 41(b). Portanto, no mecanismo a ser proposto na Figura 40(b), formas oxidadas da anilina tendem a reagir com o dímero oxidado na superfície eletródica gerando tetrâmeros.

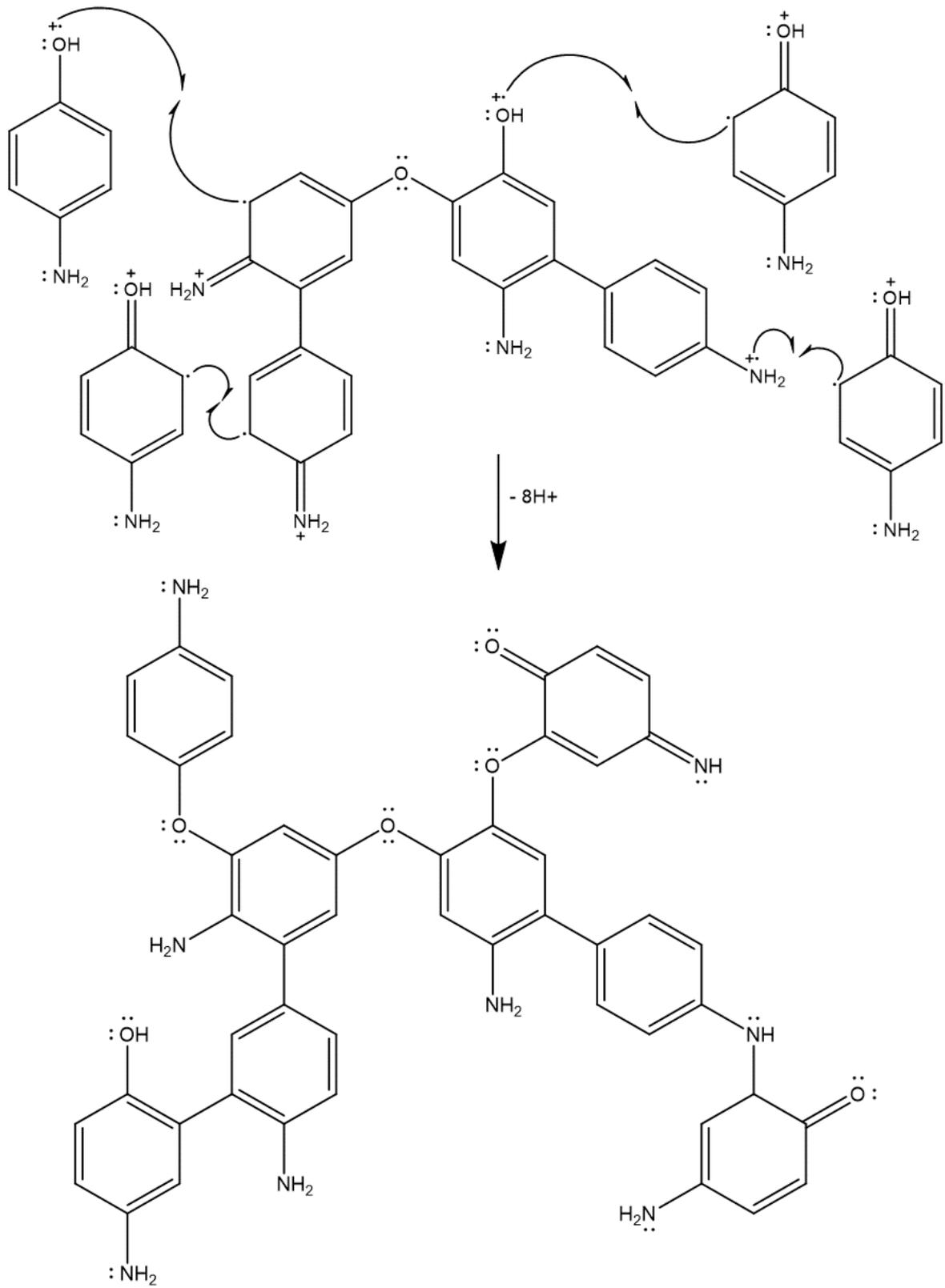
Figura 41 – Primeiros voltamogramas cíclicos comparativos para o processo de eletropolimerização dos filmes 4-PANAP e (a) PANI; e (b) P4AP



FONTE: elaborada pela autora, 2021.

Continuando o raciocínio do mecanismo de eletropolimerização, no segundo ciclo, ao atingir novamente o potencial de oxidação do monômero 4-aminofenol, o tetrâmero adsorvido na superfície eletródica é oxidado, e tende a reagir com moléculas de 4-aminofenol também oxidadas na superfície eletródica, como mostra a Figura 42. Nesse momento, sugere-se que as moléculas se ligam em todos os sítios ativados, conferindo ao copolímero ligações no grupo hidroxila e no grupo amino de forma aleatória, possibilitando grupos funcionais livres. Esse mecanismo proposto implica em uma cadeia copolimérica não linear, mas de forma ramificada, o que embasa a morfologia estrutural observada nos estudos de MEV da Figura 36.

Figura 42 – Proposta de mecanismo de eletropolimerização de 4-PANAP



FONTE: elaborada pela autora, 2021.

Vale ressaltar que outras posições de ataques são permitidos e possíveis para a estrutura, que resultariam em uma gama de mecanismos possíveis para o copolímero 4-PANAP, sendo os mecanismos das Figuras 40 e 42 apenas propostas do que seria o caminho cinético e uma possível estrutura predominante.

A partir do mecanismo proposto, conclui-se então que os monômeros/dímeros 4-aminofenol oxidados servem como pontos de nucleação, para integração de moléculas anilinas e crescimento da cadeia, com morfologia fibrilar. Possivelmente, a presença de cadeias ramificadas na estrutura podem promover interações por ligações de hidrogênio, pensando na natureza de seus grupos funcionais, o que indica uma estrutura resistente. Observando ainda, a estrutura apresentada na Figura 42, presume-se que o copolímero 4-PANAP é rico em grupos funcionais e, portanto, se caracteriza como uma material promissor para aplicação em biossensores, com a perspectiva de criar um ambiente biocompatível para as biomoléculas.

4.5 Estudo das melhores condições de eletropolimerização de 4-PANAP frente ao imunossensor para T3

Para avaliação das melhores condições de síntese do copolímero 4-PANAP, foram avaliadas 03 variáveis: proporção molar; faixa de potencial; e velocidade de varredura. Como já descrito no item 3.3.4, essas três variáveis foram analisadas de forma simultânea, frente a detecção dos sinais de sonda e sonda-alvo. Foi utilizada a eq. 5 para cálculo do número de experimentos necessários para obtenção do melhor resultado, sendo n o número de variáveis a serem analisadas.

$$\textit{Experimentos} = 2^n \quad \text{eq. 5}$$

Conforme cálculo, foi necessário a realização de 08 experimentos, que para melhor entendimento dos resultados a seguir, foram classificados em 08 grupos, como mostra a Tabela 3. Tendo realizado as eletropolimerizações de 4-PANAP seguindo as condições apresentadas na Tabela 3, obteve-se 08 voltamogramas de respostas do copolímero. Esses gráficos foram agrupados pelo parâmetro de faixa de potencial, como pode ser observado pela Figura 43.

Tabela 3 – Descrição dos experimentos com relação as variáveis observadas

Nº do Grupo	Proporção molar (4-AP : ANI)	Faixa de Potencial	Velocidade de Varredura
1	5:1	-0,1 a +1,2 V	50 mV s ⁻¹
2	1:1	-0,1 a +1,2 V	50 mV s ⁻¹
3	5:1	0,0 a +0,8 V	50 mV s ⁻¹
4	1:1	0,0 a +0,8 V	50 mV s ⁻¹
5	5:1	-0,1 a +1,2 V	100 mV s ⁻¹
6	1:1	-0,1 a +1,2 V	100 mV s ⁻¹
7	5:1	0,0 a +0,8 V	100 mV s ⁻¹
8	1:1	0,0 a +0,8 V	100 mV s ⁻¹

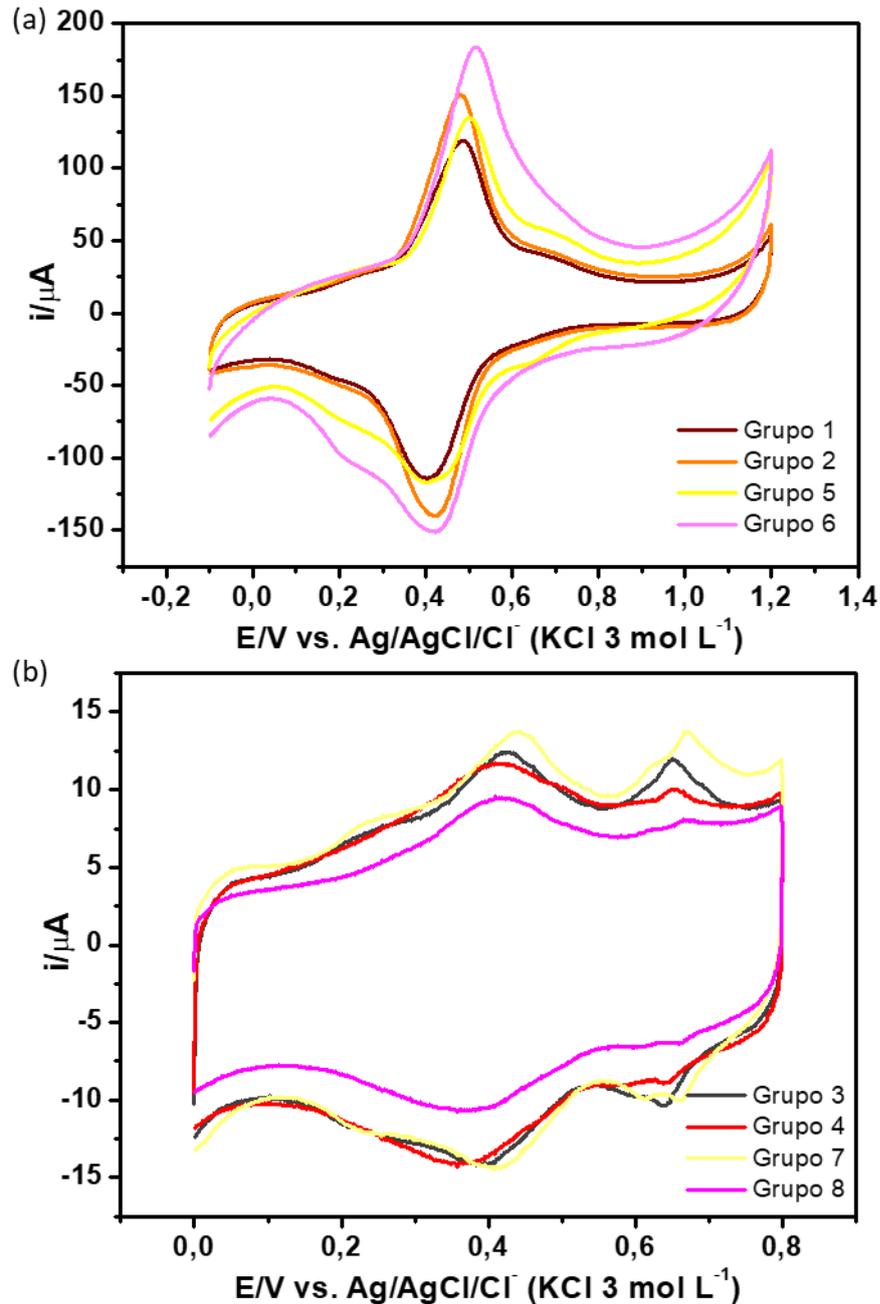
FONTE: elaborada pela autora, 2021.

Os filmes eletropolimerizados em diferentes condições apresentaram perfis bastante reproduzíveis dentro de cada subgrupo de faixa de potencial, ou seja, há um padrão de perfil eletroquímico dentre os voltamogramas da Figura 43(a) e outro padrão de perfil eletroquímico dentre os voltamogramas da Figura 43(b). Nos filmes eletropolimerizados na faixa de potencial de -0,1 a +1,2 V (Figura 43a), foi observado grandes densidades de correntes, alcançando correntes de pico na magnitude de 150 μA . Por outro lado, os filmes eletropolimerizados na faixa de potencial de 0,0 a +0,8 V resultaram em áreas muito pequenas, Figura 43(b), com magnitudes de corrente de 15 μA , ou seja, 10 vezes menor.

Esta diferença observada de 10 vezes nos valores de corrente com relação a faixa de potencial, implica em dizer que quando se eletropolimeriza o copolímero na região de 0,0 a +0,8 V, possivelmente está sendo favorecido somente a oxidação do 4-aminofenol, que apresenta uma área muito inferior, quando comparado a PANI, como mostrado na Figura 26(a). Nesta linha de raciocínio poucas espécies anilina oxidadas devem ser encontradas na interface reacional, e a ligação de moléculas 4-aminofenol—4-aminofenol é predominante ao invés da formação do copolímero. Essa hipótese vai ao encontro com a ideia de efeito inibidor do 4-

aminofenol frente a formação do copolímero, já citada em trabalhos anteriores (CHEN *et al.*, 2008b).

Figura 43 – Voltamogramas cíclicos obtido em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para 4-PANAP em diferentes condições de eletropolimerização utilizando a faixa de potencial de (a) $-0,1$ a $+1,2 \text{ V}$; e (b) $0,0$ a $+0,8 \text{ V}$



FONTE: elaborada pela autora, 2021.

Ainda, ao analisar os voltamogramas da Figura 43 com relação a velocidade de varredura utilizada, percebe-se que dentro de cada subgrupo não é observada variação significativa nos perfis eletroquímicos, assim como nas magnitudes de áreas capacitivas e

correntes de picos registradas. Esse resultado revela que, para eletropolimerização do 4-PANAP as velocidades de varredura estudadas possivelmente não interferem no mecanismo de eletropolimerização.

Quando a variável proporção molar foi o objeto de estudo, esperava-se que a relação com maior proporção molar formasse maior quantidade de material do que a relação equimolar. Porém, ao comparar todos os voltamogramas da Figura 43, foi observado que os filmes eletropolimerizados na proporção 1:1, deram áreas levemente maiores do que aqueles eletropolimerizados nas proporções 5:1, dentro do grupo eletropolimerizados na faixa de $-0,1$ a $+1,2$ V, Figura 43(a). Para os filmes eletropolimerizados na faixa de potencial de $0,0$ a $+0,8$ V, não foi observada diferença significativa quanto a diferença na proporção molar. Estes resultados concordam, mais uma vez, com a ideia do efeito inibidor do monômero 4-aminofenol para formação do copolímero, uma vez que somente sua concentração molar foi alterada.

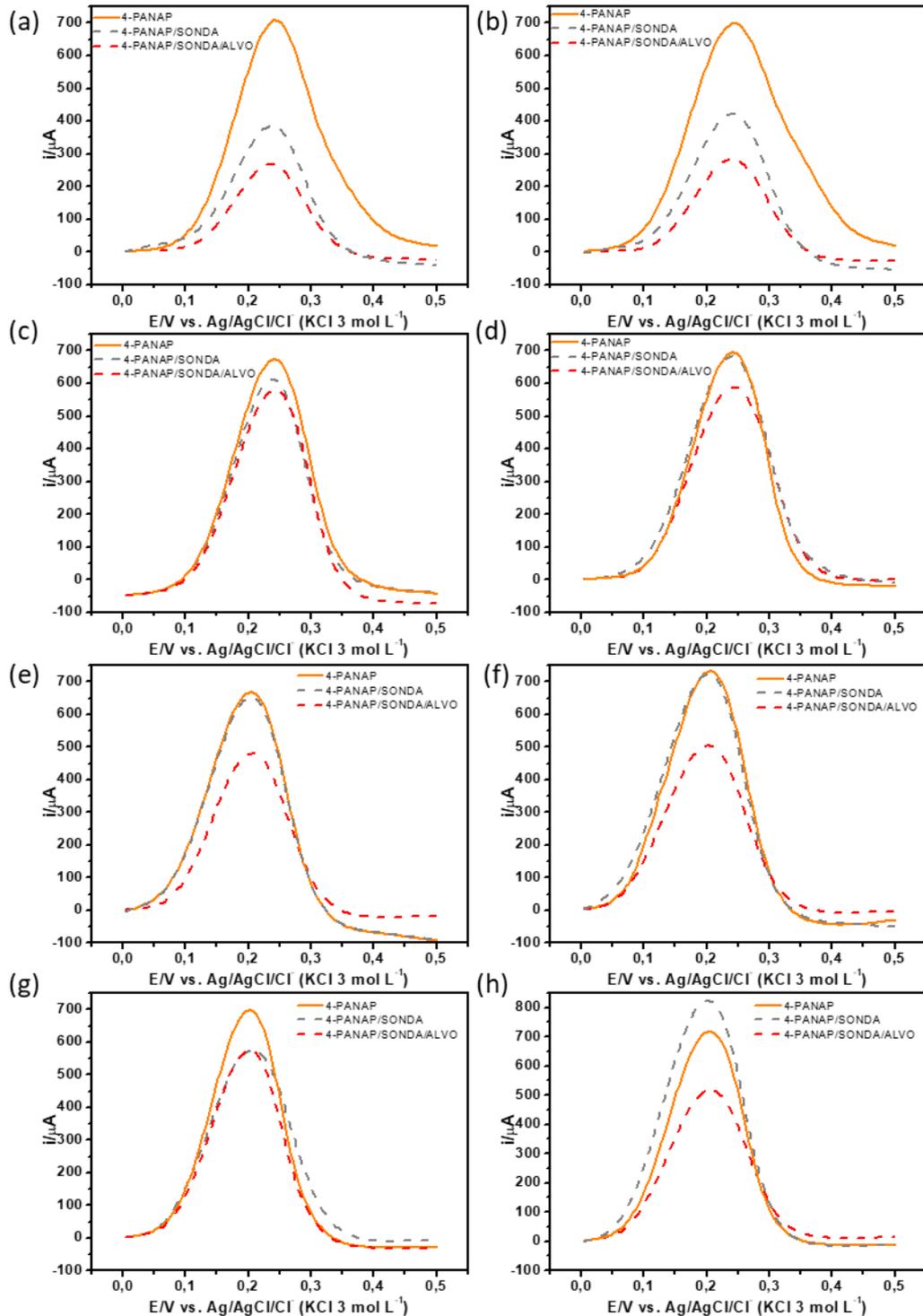
Vale salientar que, neste trabalho, a proporção 1:5 (4-AP:ANI) não foi investigada, pois o objetivo da mistura monomérica era formar um material rico em grupos funcionais expostos, porém, de forma espaçada, para promover uma melhor interação com grupos funcionais. A característica de grupos funcionais expostos advém do P4AP, uma vez que na PANI, o grupo amino se integra na cadeia como heteroátomo. Então, as moléculas de ANI serviriam como espaçadores dos monômeros 4-AP e, por isso, foi investigada em menor proporção.

Dentre as três variáveis estudadas e mostradas na Figura 43, pode-se verificar que para a formação do material polimérico, a variável faixa de potencial foi o principal efeito diferenciador dos copolímeros eletropolimerizados. Isto implica dizer que a natureza do copolímero está fortemente ligada a natureza do cátion-radical iniciador da reação.

Os oito grupos da Tabela 3 também foram estudados frente ao desempenho eletroquímico do imunossensor para detecção do T3. As medidas de detecções foram realizadas monitorando o pico de oxidação do $K_4Fe(CN)_6$ 5 mmol L^{-1} em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, uma vez que a detecção direta de espécies eletroativas do próprio anticorpo Anti-T3 em solução de eletrólito, resultaram em picos anódicos de pequenas magnitudes de corrente e não reprodutíveis. Para tanto, fez-se essa medida de detecção da superfície eletródica em três momentos: da superfície contendo apenas o filme copolimérico; da superfície contendo o filme copolimérico com a sonda Anti-T3 e as moléculas de bloqueio; e dessa mesma superfície após

interação sonda-alvo. A Figura 44 mostra os voltamogramas de pulso diferencial obtidos a partir dos três momentos de detecção para cada grupo de copolímero.

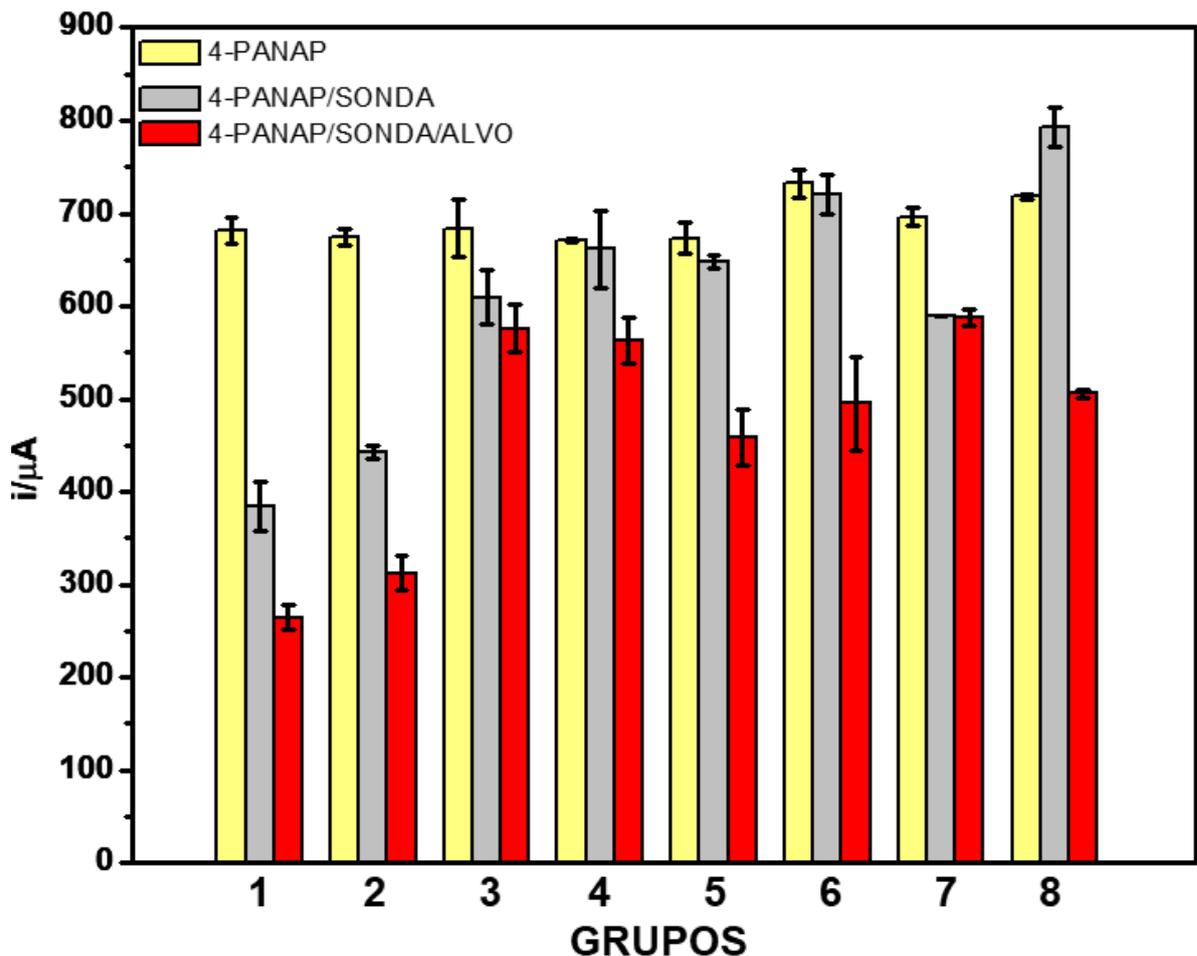
Figura 44 – Voltamogramas de pulso diferencial com pico de oxidação do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 5,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹ para os copolímeros 4-PANAP eletropolimerizados em diferentes condições: (a) grupo 1; (b) grupo 2; (c) grupo 3; (d) grupo 4; (e) grupo 5; (f) grupo 6; (g) grupo 7; e (h) grupo 8



FONTE: elaborada pela autora, 2021.

Para melhor visualização da tendência de resposta, os valores de corrente de pico anódica de cada curva foram agrupados em um gráfico de barras, como mostra a Figura 45. Observando-se os gráficos de barras da Figura 45, observa-se um padrão no valor da corrente de pico para a detecção do filme copolimérico, obtendo-se uma média entre as detecções-filme para todos os grupos de $691,3 \pm 22,3 \mu\text{A}$. Já para detecções da superfície sonda e para sonda-alvo, percebe-se grandes variações entre os sinais, que dependem do modo de preparação do eletrodo. Para facilitar o entendimento dos resultados mostrados na Figura 45, foi calculada a diferença entre os valores de corrente de pico da detecção-filme e detecção sonda, e também da detecção-sonda e detecção-alvo. A partir destas diferenças calculadas, foi calculada a porcentagem relativa a diferença de sinal, e esses dados constam na Tabela 4.

Figura 45 – Gráfico de barras obtido do pico de oxidação de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ versus a superfície eletródica para os copolímeros eletropolimerizados em diferentes condições



FONTE: elaborada pela autora, 2021.

Tabela 4 – Diferenças entre sinais de detecção obtidos a partir do pico de oxidação do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 5,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹ para os 8 diferentes grupos de eletropolimerização

GRUPO	Diferença FILME-SONDA (μA)	Porcentagem diferença FILME-SONDA	Diferença SONDA-ALVO (μA)	Porcentagem diferença SONDA-ALVO
1	296,6	44 %	120,1	31 %
2	231,9	34 %	130,1	30 %
3	74,1	11 %	34,2	6 %
4	9,3	1 %	98,5	15 %
5	25,2	4 %	189,0	29 %
6	11,7	2 %	225,2	31 %
7	107,9	15 %	0,25	0,5 %
8	-74,0	-10 %	286,0	36 %

FONTE: elaborada pela autora, 2021.

Ao analisar os dados apresentados na Tabela 4, é observado que apenas o grupo 8 apresentou um resultado negativo da diferença entre os sinais das correntes de pico da sonda para o filme. Isto significa que somente o grupo 8 apresentou o sinal de detecção da sonda maior que o sinal de detecção do filme, enquanto em todos os outros grupos, a tendência é ter um sinal de sonda menor que o sinal do filme, e sinal de alvo menor que o sinal de sonda. Essa tendência observada implica na ideia de que a medida que as biomoléculas são imobilizadas na superfície do material, aumenta-se a dificuldade na troca de cargas da interface. Assim, quanto mais livre a superfície, mais disponível para recebimento da espécie eletroativa e efetivação do processo redox.

Outro fato observado a partir da Tabela 4 foi de que os grupos 4, 5 e 6 tiveram as diferenças de resposta entre filme-sonda inferiores a 5%. A partir desses resultados fica difícil afirmar se houve imobilização do anticorpo na superfície copolimérica. No mesmo sentido, ao observar a variação entre os sinais sonda-alvo para esses grupos, percebe-se que a porcentagem pode ser considerada mais significativa, sendo de 15%, 29%, 31% e 36% para os grupos 4, 5, 6

e 8, respectivamente. Este fato pode estar relacionado com a interação de outras biomoléculas presentes no soro utilizado, não ocorrendo reação específica antígeno-anticorpo, uma vez que a variação de sinal para a presença de anticorpo anti-T3 é insignificante.

Já para os grupos 3 e 7, os resultados mostram uma variação de sinal sonda-filme superior a 10 %, contudo com pequena variação de sinal sonda-alvo, o que também não possibilita afirmar se houve reação específica antígeno-anticorpo. Os grupos 1 e 2 foram os que demonstraram melhores resultados frente a detecção, com diferenças entre os sinais superiores a 30% em ambas medidas. Com esse resultado, tem-se uma maior segurança para afirmar que houve efetiva imobilização de biomoléculas Anti-T3 e interações específicas sonda-alvo.

Dentre os dois grupos (1 e 2), tem que a única variável que difere-se entre eles é a proporção molar, sendo de 1:1 para o grupo 1 e 5:1 para o grupo 2. No sentido de utilizar menor quantidade do reagente 4-aminofenol nos ensaios, foi escolhido os parâmetros de síntese do grupo 2, além do mesmo ter apresentado maior precisão entre sinais de resposta. Dessa forma, os parâmetros adotados para o grupo 2 (10 ciclos de varredura – proporção molar 1:1 – faixa de potencial de $-0,1$ a $+1,2$ V – velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}) foram escolhidos para continuidade do trabalho.

Salienta-se que o tipo de abordagem adotada para análise dos resultados neste trabalho foi a avaliação do conjunto como um todo, ou seja, tanto da resposta de sinal do imunossensor, quanto após o contato com o alvo. Em outras palavras, não é interessante uma diferença de resposta muito grande após o contato com o alvo se a diferença de resposta quando da imobilização da sonda é baixa. Assim, deve-se haver uma diferença efetiva de resposta em ambas etapas.

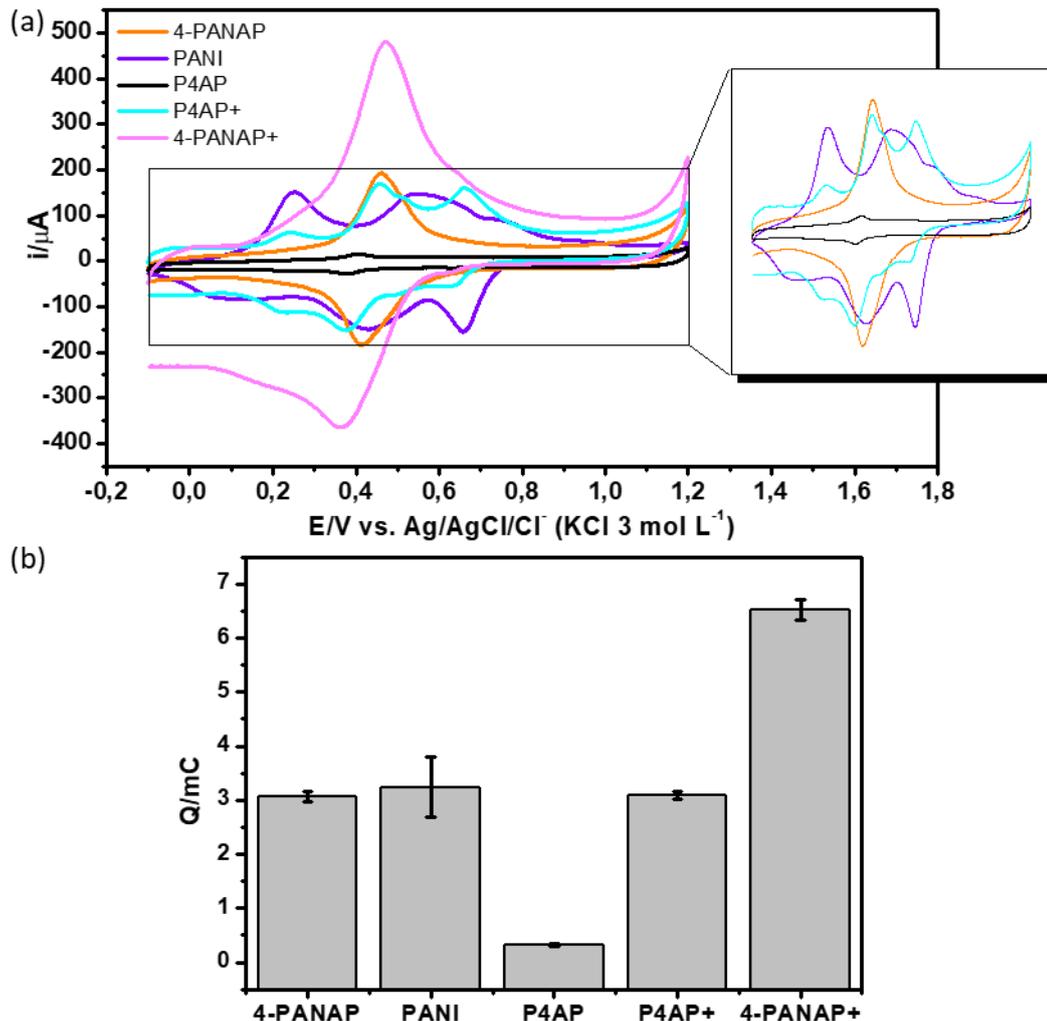
4.6 Estudo comparativo da resposta eletroquímica do imunossensor para T3 em outras superfícies

A título de comparação, a construção do imunossensor para T3 foi realizada em superfícies diferentes do copolímero proposto, o 4-PANAP. A biofuncionalização foi realizada sobre a superfície de seus polímeros de origem eletropolimerizados na mesma condição que o copolímero 4-PANAP, ou seja, na concentração de 1 mmol L^{-1} , realizando-se 10 ciclos de

potencial na velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , e faixa de potencial de 0,0 a +0,8 V para P4AP, e -0,1 a +1,2 V para PANI.

A carga (Q) das superfícies citadas acima foram calculadas e, de modo a realizar uma comparação dos filmes contendo a mesma carga, o filme P4AP foi também eletropolimerizado nas mesmas condições acima, porém aumentando-se o número de ciclos até atingir a mesma carga eletroquímica que os demais, sendo que foi necessário uma quantidade de 450 ciclos para eletropolimerização, chamado então de P4AP+. E por último, o copolímero 4-PANAP também foi eletrossintetizado utilizando uma quantidade de ciclos 10 vezes superior que a condição acima, ou seja, 100 ciclos, para análise de variação do sinal de resposta frente ao imunossensor para T3, chamado de 4-PANAP+. Os voltamogramas de cada filme eletropolimerizado, bem como a quantidade de carga envolvida estão mostrados na Figura 46.

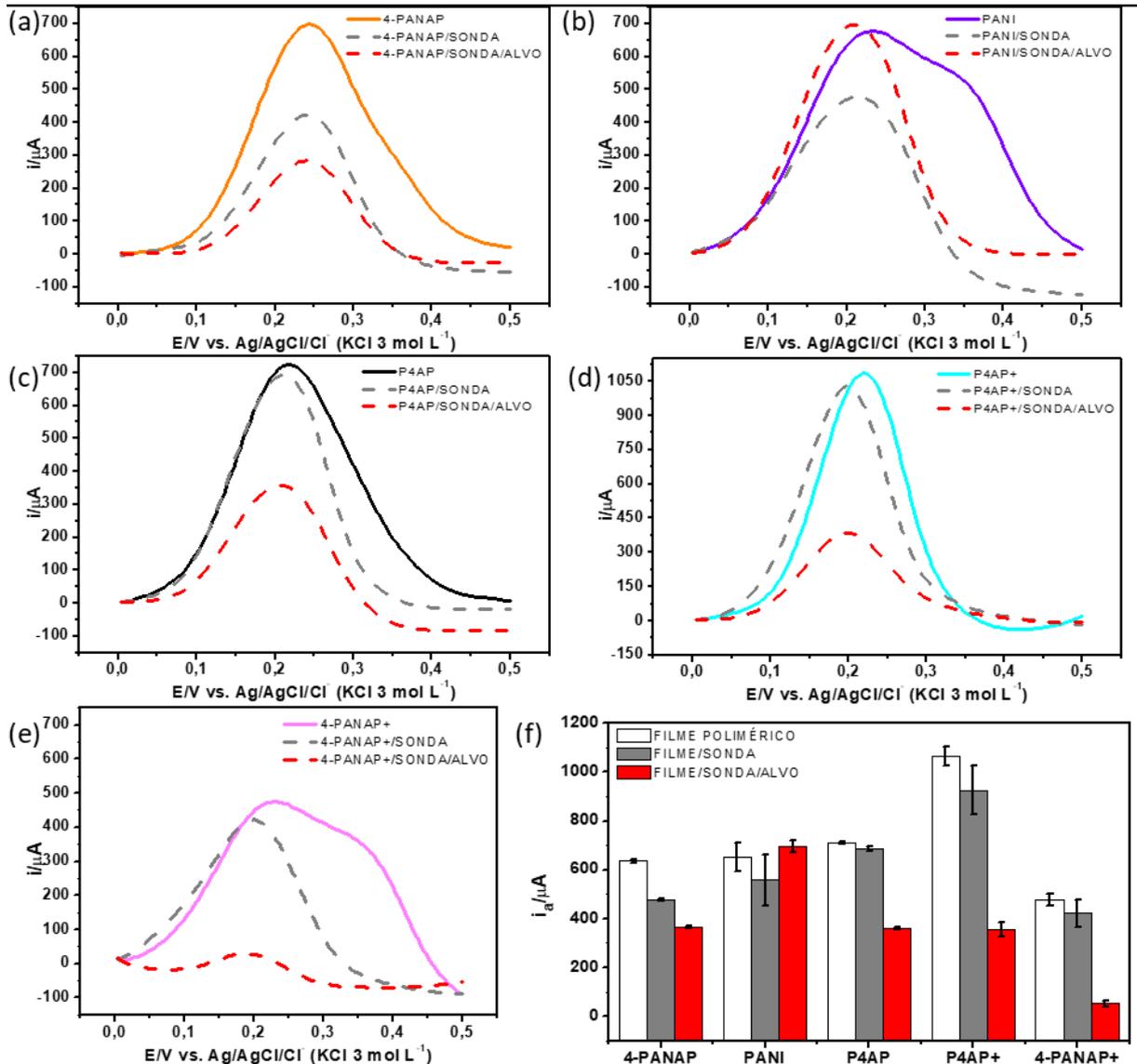
Figura 46 – (a) Voltamogramas cíclicos em H_2SO_4 $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ para diferentes polímeros eletrossintetizados; e (b) quantidade de carga envolvida para cada filme polimérico



FONTE: elaborada pela autora, 2021.

A partir da Figura 46, é notável que os filmes 4-PANAP, PANI e P4AP+ (eletropolimerizado com 450 ciclos) apresentaram carga em torno de 3 mC, enquanto o filme P4AP (10 ciclos) apresenta uma carga 10 vezes inferior, $\sim 0,32$ mC. Já o filme 4-PANAP+, cuja eletropolimerização consistiu de uma quantidade de ciclos 10 vezes superior à de 4-PANAP, mostrou uma carga de $\sim 6,52$ mC, ou seja, aproximadamente 2 vezes superior, mostrando um comportamento não-linear do sistema eletroquímico. Essas superfícies foram testadas frente a resposta eletroquímica do imunossensor para T3, conforme procedimento anteriormente descrito, utilizando a técnica de VPD, como mostra a Figura 47.

Figura 47 – Voltamogramas de pulso diferencial com pico de oxidação do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para os polímeros: (a) 4-PANAP; (b) PANI; (c) P4AP; (d) P4AP+; (e) 4-PANAP+; e (f) gráfico de barras dos valores de i_p versus superfícies copoliméricas biofuncionalizadas



FONTE: elaborada pela autora, 2021.

Tabela 5 – Diferenças entre sinais de detecção obtidos a partir do pico de oxidação do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 5,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹ para os diferentes filmes poliméricos

FILME	Diferença FILME-SONDA (μA)	Porcentagem diferença FILME-SONDA	Diferença SONDA-ALVO (μA)	Porcentagem diferença SONDA-ALVO
4-PANAP	231,9	34 %	130,1	30 %
PANI	197,69	29 %	- 218,23	-31 %
P4AP	37,88	5 %	328,68	48 %
P4AP+	78,00	7 %	499,3	63%
4-PANAP+	54,68	12 %	326,81	88 %

FONTE: elaborada pela autora, 2021.

Já para P4AP, P4AP+ e 4-PANAP+ foi observado pequenas diferenças entre os sinais de resposta de Ipa filme e sonda, com conseqüente grande diferença entre os valores de Ipa para sonda e alvo. Conforme já discutido no item 4.5 para os filmes 4-PANAP eletropolimerizado em diferentes condições, a pequena diferença de resposta entre filme e sonda não permite afirmar, com segurança, que houve imobilização do anticorpo Anti-T3 efetivamente. Como conseqüência, não é possível afirmar que a grande diferença de sinal entre sonda e alvo é proveniente da interação específica SONDA/ALVO, ou proveniente da interação inespecífica de outra biomolécula presente no soro com a superfície polimérica/eletrodo. Além deste fato, ao observar a magnitude de Ipa para a detecção SONDA/ALVO sobre a superfície 4-PANAP+, o sinal de corrente de $52,19 \pm 12,40 \mu\text{A}$ caracteriza-se como um sinal relativamente baixo quando comparado aos demais. Este fato poderia dificultar a detecção de concentrações mais concentradas do alvo T3, visto que a tendência é ocorrer uma diminuição no valor de Ipa a medida que aumenta-se a concentração, que seria uma característica negativa visando a construção de uma curva analítica.

Estes resultados demonstram que o copolímero 4-PANAP proposto, apresenta melhor desempenho do que as outras superfícies poliméricas para detecção do imunossensor, devido ao fato de apresentar a diferença de resposta mais promissora entre as detecções: filme e sonda (34 %); sonda e alvo (30 %). Estas porcentagens de diferença de sinais dão maior

segurança para afirmar a imobilização orientada do anticorpo e interação específica anticorpo-antígeno, além de permitir uma melhor faixa de corrente para detecções de alvos em soluções mais concentradas ou mais diluídas.

Também foi avaliado a resposta do imunossensor para T3 eletrossintetizando o filme nas condições do Grupo 2 da Tabela 3, e realizando a biofuncionalização da superfície conforme descrito no subitem 3.9, com exceção da ativação com EDC-NHS e desativação com etanolamina, ou seja, imobilizando o Anti-T3 diretamente sobre 4-PANAP. Foi aplicada a técnica de VPD para detecção das superfícies, conforme utilizado nas outras detecções anteriores. A tabela 6 mostra os valores de corrente de pico anódica para cada superfície detectada.

Tabela 6 – Valores de I_{pa} de $[Fe(CN)_6]^{4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com seus respectivos desvios-padrão para superfícies imunossensoras com e sem a ativação com EDC-NHS

Superfície	Valor de I_{pa} (μA)	Desvio-padrão (μA)	Valor de I_{pa} (μA)	Desvio-padrão (μA)
	SEM EDC-NHS		COM EDC-NHS	
4-PANAP	635,3	9,5	674,3	9,0
4-PANAP /SONDA	475,3	7,3	442,7	7,1
4-PANAP /SONDA /ALVO	364,3	18,6	312,6	9,4

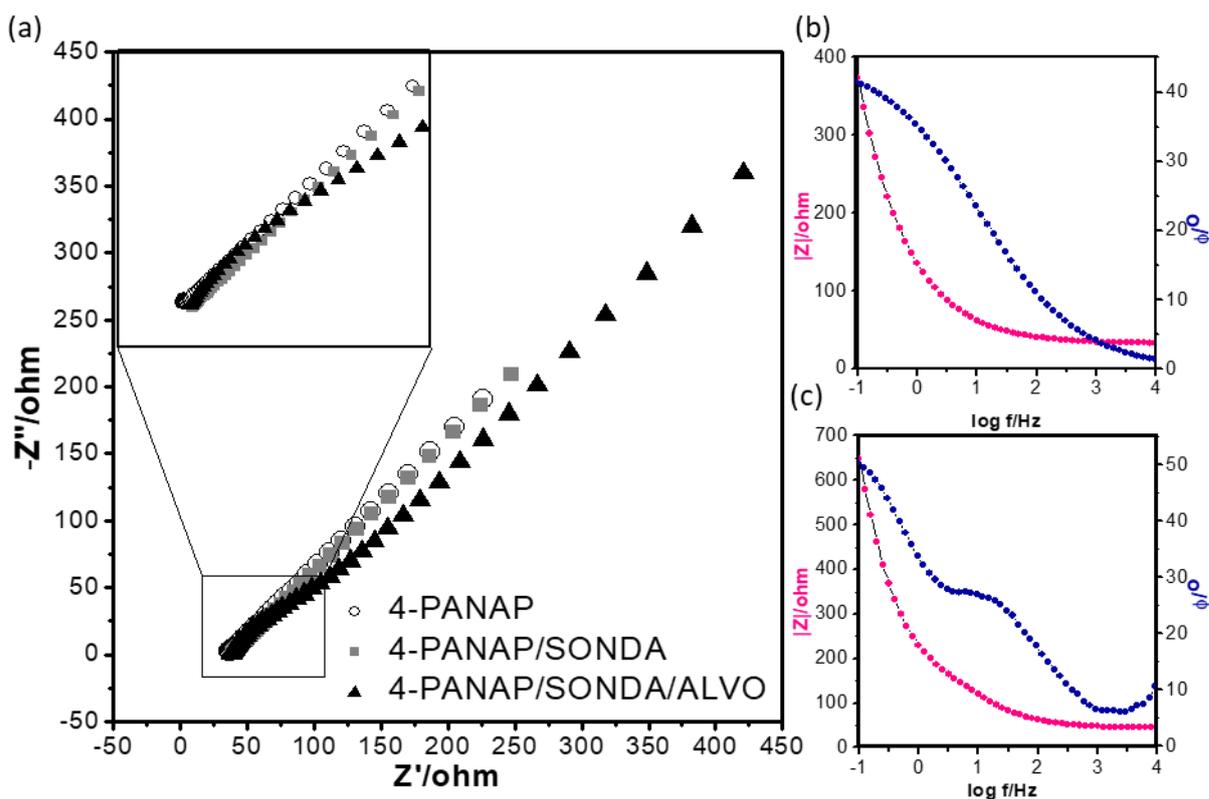
FONTE: elaborada pela autora, 2021.

Observando-se os dados da Tabela 6, nota-se que a diferença de resultados entre as duas superfícies está apenas na melhora do desvio-padrão para a detecção do imunossensor para ALVO, cujo mesmo reduz de $18,6 \mu A$ para $9,4 \mu A$. Esta diminuição melhora a precisão do resultado e justifica a sua utilização na construção da plataforma.

4.7 Caracterização eletroquímica do imunossensor proposto por EIS

Com o objetivo de auxiliar a caracterização eletroquímica do copolímero 4-PANAP proposto e também para averiguação do comportamento observado para a plataforma imunossensora, os eletrodos de grafite modificados com o filme 4-PANAP eletropolimerizado conforme condições do grupo 2 da Tabela 3 e após imobilização de sonda e contato sonda-alvo, foram submetidos a análise de EIS. Os gráficos de Nyquist e de Bode obtidos são aqueles mostrados na Figura 48.

Figura 48 – (a) Diagrama de Nyquist (Z'' vs. Z') dos eletrodos de grafite modificados com 4-PANAP e Anti-T3 antes e após contato com alvo T3; (b) Gráfico de Bode para a superfície 4-PANAP/SONDA; e (c) Gráfico de Bode para a superfície 4-PANAP/SONDA/ALVO, obtidos por EIS em $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 1 mmol L^{-1} em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Amplitude 10 mV ; Intervalo de frequência: $10\ 000$ a $0,01 \text{ Hz}$



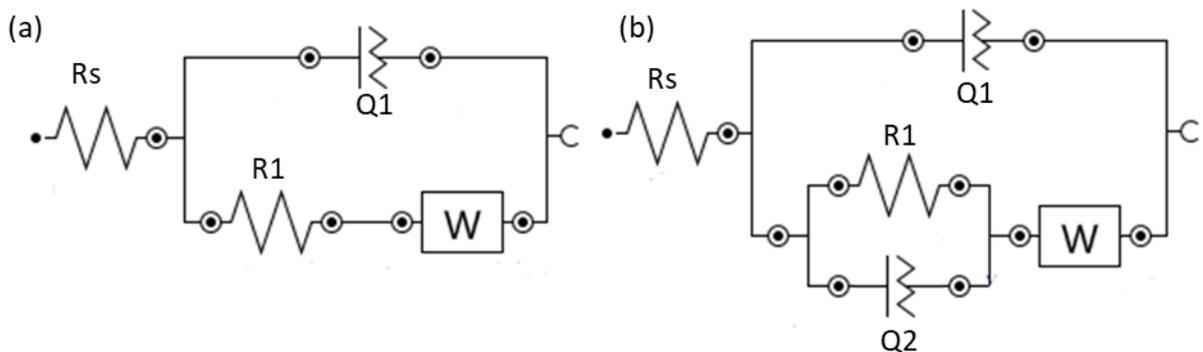
FONTE: elaborada pela autora, 2021.

A partir dos resultados da Figura 48, é observado que o sistema apresenta baixa resistência a transferência de carga, uma vez que quase não é observado a presença de um semicírculo definido, sendo predominantemente observado um efeito capacitivo, com uma curva de inclinação de $\sim 45^\circ$. Os gráficos de Bode do sistema, Figura 48(b-c), revelam que após

contato com o alvo há o surgimento de uma segunda interface, devido a presença de 2 ângulos de fase, Figura 48(c).

A partir dos dados obtidos foi possível a comparação com um circuito elétrico equivalente, como mostra a Figura 49. Neste circuito com melhor ajuste dos dados experimentais, o R_s representa a resistência da solução eletrolítica, Q_1 representa o carregamento da dupla camada elétrica na interface FILME-SONDA | SOLUÇÃO, R_1 representa a resistência à transferência de carga, Q_2 representa o carregamento da dupla camada elétrica na interface FILME-SONDA-ALVO | SOLUÇÃO, e W a impedância de Warburg, que é associado ao processo difusional dos íons. O efeito capacitivo é representado por um elemento de fase constante, no lugar de um capacitor puro, devido a não-homogeneidade da superfície analisada.

Figura 49 – Circuitos elétricos propostos para a interface (a) FILME-SONDA | SOLUÇÃO; e (b) FILME-SONDA-ALVO | SOLUÇÃO



FONTE: elaborada pela autora, 2021.

Na Tabela 7 estão apresentados alguns parâmetros de ajuste. Q é a representação da impedância, dada pela equação:

$$Z_{Q(\omega)} = K^{-1}(j \omega)^{-n} \quad \text{eq. 8}$$

onde ω é a frequência angular, j é a unidade imaginária e n varia de 0 a 1, tendo unidades de $S^{-1} s^{-n}$. Se $n = 0$, o comportamento é relativo a resistência, se $n = 1$, o comportamento é capacitivo, e para $n = 0,5$, a impedância corresponde à impedância de Warburg. A partir dos dados da Tabela 7, observa-se que o material e imunossensor proposto tem maior tendência de capacitância.

Tabela 7 – Parâmetros elétricos para as etapas de biofuncionalização do copolímero 4-PANAP

Parâmetros elétricos	Superfície 4-PANAP	Superfície 4-PANAP/SONDA	Superfície 4-PANAP/SONDA /ALVO
Rs /ohm	17,19	20,25	21,34
Q ₁ / S ⁻¹ s ⁻ⁿ	4,77 10 ⁻³	6,31 10 ⁻³	5,89 10 ⁻⁴
n ₁	0,85	0,97	0,75
R ₁ /ohm	19,27	22,66	49,93
Q ₂ / S ⁻¹ s ⁻ⁿ	-	-	2,47 10 ⁻³
n ₂	-	-	0,68
χ ²	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻²

FONTE: elaborada pela autora, 2021.

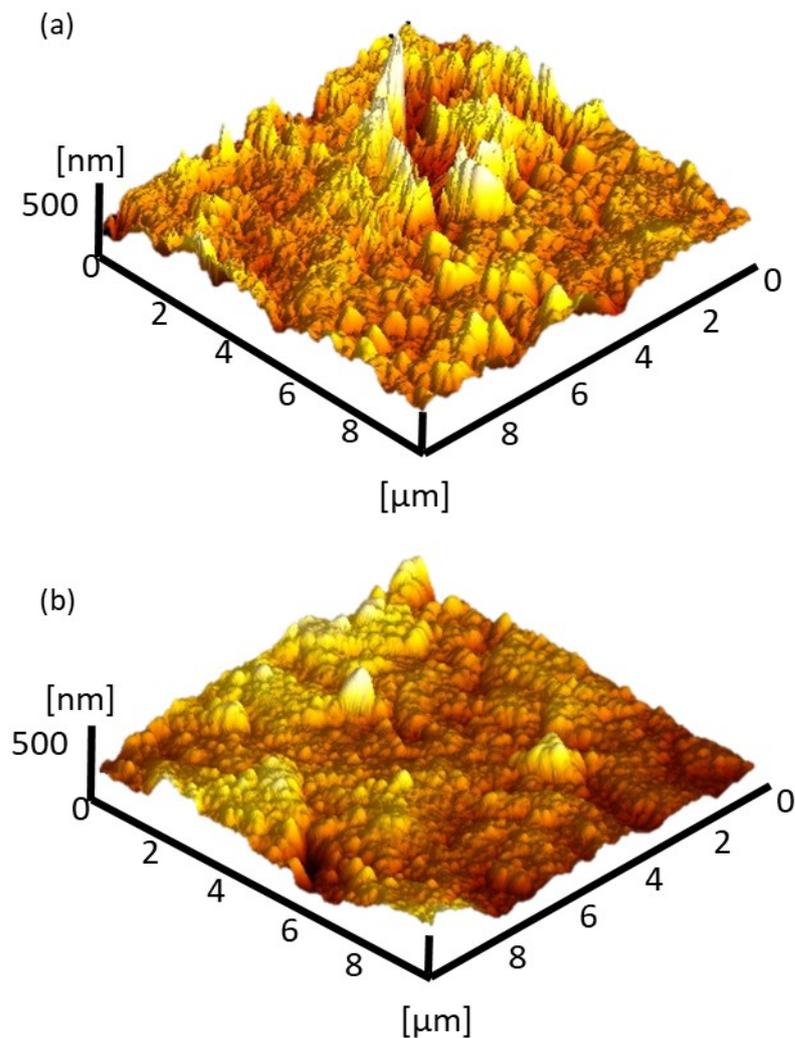
Os resultados obtidos pela técnica de EIS corroboram com aqueles obtidos na análise voltamétrica, indicando que a presença de biomoléculas na superfície polimérica aumenta a resistência interfacial, conforme mostrado pelos valores de Rct da interface: ~20 Ω, ~23 Ω e ~50 Ω, para 4-PANAP, SONDA e SONDA-ALVO, respectivamente. Contudo, os valores apresentados para resistência são relativamente baixos. Este fato pode ser da possibilidade de entrada direta das espécies eletroativas pela plataforma, que apresenta um material copolimérico que pressupõe-se ser altamente poroso.

4.8 Caracterização do imunossensor proposto por AFM

Outra técnica auxiliar para caracterização da superfície após a imobilização de sonda e também da interação sonda-alvo, foi a obtenção de imagens de AFM para superfície do imunossensor, como mostra a Figura 50.

Analisando as imagens da Figura 50 percebe-se que antes da interação com o alvo T3, Figura 50(a), a morfologia apresenta muitos picos pronunciados, com rugosidade de $R_q = 73$ nm, o que indica a presença dos anticorpos anti-T3 imobilizados ou adsorvidos sobre a superfície. Após contato com o alvo T3, Figura 50(b), visualmente percebe-se uma melhor uniformidade entre centros elevados, levantando a hipótese de que as moléculas de T3 preenchem os espaços entre os centros anteriormente observados. A rugosidade média também diminuiu para $R_q = 55$ nm, corroborando com a ideia de efetiva formação do imunocomplexo Anti T3 – T3.

Figura 50 –Imagens de AFM para eletrodos de grafite modificados com 4-PANAP contendo a biomolécula Anti-T3 imobilizada em sua superfície (a) antes; e (b) após contato com o alvo T3

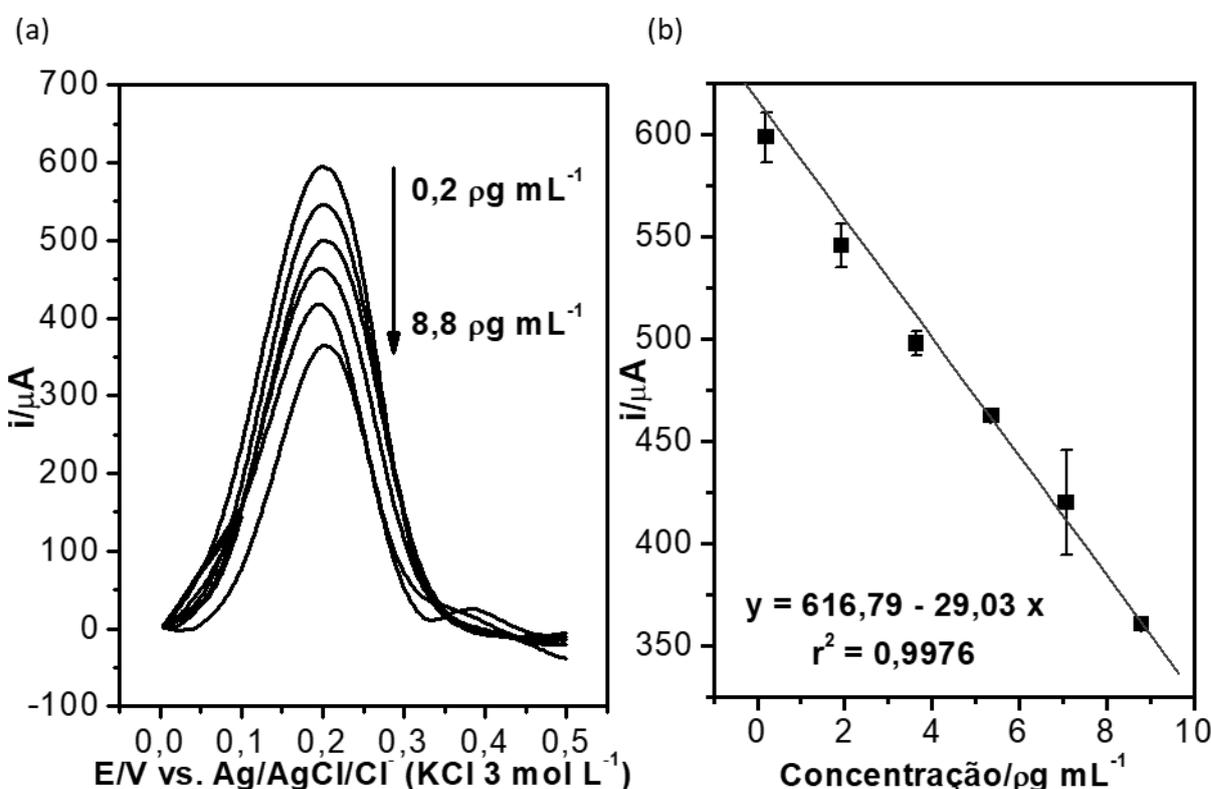


FONTE: elaborada pela autora, 2021.

4.9 Construção da curva analítica

A elaboração de uma curva analítica para a plataforma biossensora proposta é de fundamental importância, quando se pensa na aplicação real em pacientes clínicos. A curva de calibração foi desenvolvida a partir da diluição ou concentração de T3 em uma amostra de soro real, quantificada por método comercial, dentro da faixa de concentração de $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $8,8 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os eletrodos previamente preparados com a superfície imunossensora já descrita, foram divididos em 06 grupos, onde cada grupo foi submetido a uma concentração. As medidas de detecções foram realizadas nos mesmos parâmetros de estudo da plataforma, sendo os voltamogramas de pulso diferencial para diferentes concentrações de T3 em amostras de soro reais mostrados na Figura 51 (a).

Figura 51 – (a) Voltamogramas de pulso diferencial dos EG modificados com 4-PANAP contendo Anti-T3 imobilizado após a interação com diferentes concentrações do alvo T3 ($0,2$, $1,92$, $3,64$, $5,36$, $7,08$, e $8,8 \mu\text{g mL}^{-1}$). Eletrólito: solução de KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) contendo $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$). Módulo de amplitude: 50 mV . Intervalo de pulso: $0,2 \text{ s}$; 20 mV s^{-1} ; (b) Curva analítica da corrente de pico anódica vs. diferentes concentrações de T3 alvo na faixa de $\mu\text{g mL}^{-1}$



Foi observado a partir da Figura 51(a), que a partir do aumento da concentração do alvo T3, a tendência é ocorrer uma diminuição nos valores de corrente de pico. Esse fato está relacionado com o método de detecção empregado, que neste caso é a avaliação do pico de oxidação de uma espécie eletroativa em solução. Portanto, quanto maior a concentração do alvo T3, maior a probabilidade da promoção de interações sonda-alvo e maior a quantidade de material adsorvido na superfície eletródica. Neste caso, a interação de íons ferrocianeto com a superfície do eletrodo é dificultada, e uma diminuição da magnitude de corrente é a consequência observada.

A Figura 51(b) apresenta a curva analítica proposta para quantificação do alvo T3, onde foi utilizado os dados de corrente de pico anódica, obtido por VPD em solução de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Os dados de regressão linear de corrente *versus* as diferentes concentrações de T3 em soro, resultou em um perfil linear para a faixa de trabalho escolhida de $0,2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ a $8,8 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, com coeficiente de correlação de 0,9976. O valor do coeficiente angular da equação de reta foi de $29 \text{ } \mu\text{A } \mu\text{g mL}^{-1}$, indicando uma boa sensibilidade da plataforma.

O limite de detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) e o limite de quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) foram calculados usando a definição da IUPAC (ANVISA), como mostram as equações 6 e 7, respectivamente.

$$LOD = 3,3 \frac{s_b}{b} \quad \text{eq. 6}$$

$$LOQ = 10 \frac{s_b}{b} \quad \text{eq. 7}$$

Onde s_b é o desvio padrão do branco e b é o coeficiente angular da curva de calibração. Toda amostra de soro contém certa quantidade de T3 livre, assim o branco, neste trabalho, foi padronizado como a diluição da amostra de soro em 1000 vezes. A partir dos cálculos realizados, foram obtidos os valores de LOD e LOQ em $0,60 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e $1,80 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Uma vez que a concentração de T3 livre considerada como normal no soro é na faixa de $2,00$ a $4,40 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, a curva analítica obtida foi satisfatória para aplicação real.

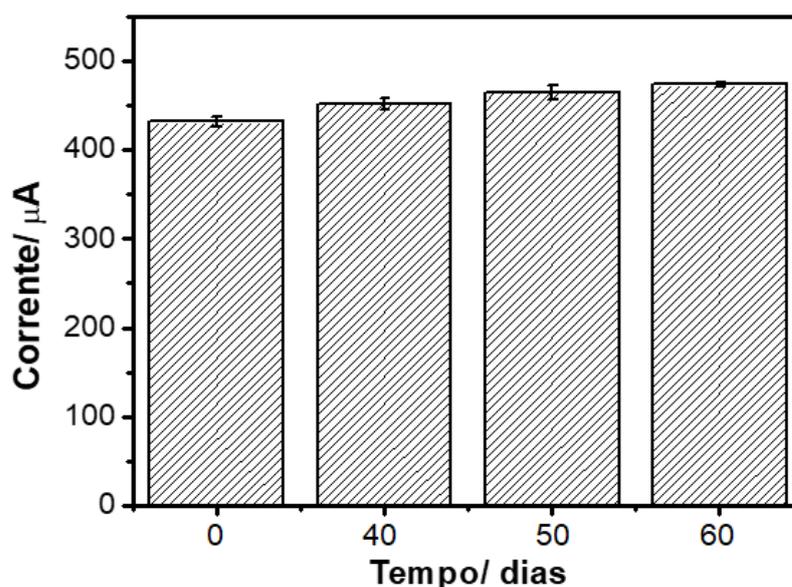
Para avaliar a performance do imunossensor proposto, um teste de repetibilidade foi realizado da seguinte maneira: foram preparadas amostras de soro com 03 diferentes concentrações de T3: 1,9, 3,1, e $7,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Essas amostras foram colocadas sobre a superfície

de eletrodos modificados com 4-PANAP e sonda imobilizada para interação sonda-alvo, conforme já estabelecida. Foram realizadas 5 medidas de detecção, em cada eletrodo e o desvio padrão relativo foi calculado para cada grupo, conforme o protocolo descrito. Os resultados obtidos foram variações de 2% para $1,9 \text{ pg mL}^{-1}$; 1% para $3,1 \text{ pg mL}^{-1}$; e 6% para $7,0 \text{ pg mL}^{-1}$. Estes resultados mostram boa performance do imunossensor proposto, e se caracteriza como um teste de validação analítica, indicando que a proposta desse trabalho apresenta grau de concordância satisfatório.

4.10 Estabilidade

O estudo de estabilidade da plataforma proposta é de grande importância para aplicação em biossensores. Nesse sentido, a estabilidade foi avaliada realizando-se detecções eletroquímicas em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mmol L^{-1} dos eletrodos modificados armazenados. Os dados foram analisados a partir dos valores de corrente de pico anódica obtidos para cada dia de detecção. A Figura 52 mostra histogramas relacionando a magnitude de corrente de pico anódica com o tempo.

Figura 52 – Estabilidade do imunossensor proposto utilizando a plataforma 4-PANAP



FONTE: elaborada pela autora, 2021.

A partir da análise do gráfico de barras da Figura 52, é possível calcular a diferença de sinal entre o dia 0 e o dia 60, que resulta em 41,83 μA , o que corresponde a um percentual de 10 % do valor original. Ou seja, após 60 dias, o imunossensor proposto mantém 90 % de sua performance. A perda de sinal pode estar relacionada com perda de atividade das biomoléculas com o tempo de estocagem, uma vez que se estivesse relacionada com variáveis experimentais, como efeito de restabelecimento de temperatura, processos de lavagem e imersão em meio ácido, a perda de sinal ocorreria de forma constante a cada detecção e não de forma gradativa como o observado.

Contudo, a variação em apenas 10 % de sinal após 60 dias de armazenamento é um bom resultado quando se trata de biomoléculas, principalmente anticorpos que são caracterizados como biomoléculas sensíveis e instáveis.

5. CONCLUSÃO

O desenvolvimento deste trabalho permitiu a eletrossíntese de um novo material copolimérico, bastante promissor para aplicação em biossensores. O procedimento adotado para síntese eletroquímica do copolímero 4-PANAP é considerado como um método simples, rápido e eficaz, visando produção em larga escala. As caracterizações eletroquímicas mostraram aumento na resposta de corrente do eletrodo, quando comparado aos seus polímeros de origem, PANI e P4AP. Como já se sabe, a resposta de corrente do eletrodo está intimamente relacionada com a quantidade de material formado, bem como com a área superficial do mesmo. A hipótese de formação de maior quantidade de material polimérico leva a hipótese de que mais material biológico seja imobilizado sobre a superfície de biossensores.

A caracterização morfológica do material por imagens de MEV e AFM, permitiu observar uma nova morfologia no copolímero, diferente daquelas morfologias características de seus polímeros de origem eletrossintetizados nas mesmas condições. Foi evidenciada uma morfologia com estruturas interconectadas em espécies de fibras no copolímero 4-PANAP, com espessura média de 12 μm . Essa morfologia sugere a estrutura polimérica como cadeias ramificadas, apontando para uma estrutura resistente e altamente porosa. A caracterização estrutural obtida por espectroscopia na região do infravermelho, revelou um espectro híbrido entre aqueles observados para PANI e P4AP. Os principais grupos observados foram ligações de amina secundárias e iminas quínoídes, indicando que grande parte dos grupos amino se incorporam no interior das cadeias poliméricas como heteroátomos. Os grupos contendo oxigênio foram observados como grupos hidroxila e grupos éter, indicando que o oxigênio também fica disponível fora da cadeia polimérica.

A partir das caracterizações realizadas foi possível sugerir um mecanismo de eletropolimerização do copolímero 4-PANAP, optando-se por uma via cinética. Em resumo é gerado a formação do cátion radical sobre o grupo hidroxila dos monômeros 4-aminofenol que, em um primeiro momento, se ligam entre si. Posteriormente, com a oxidação do monômero anilina, há a incorporação dos monômeros anilina no dímero previamente formado. As oxidações subsequentes levam a incorporação de moléculas de forma aleatória, permitindo a existência de diferentes ligações, como mostrou o espectro de infravermelho.

Com a perspectiva da estrutura copolimérica de 4-PANAP ser composta por uma rede fibrosa interconectada e com grande quantidade de grupos funcionais, foi realizada a aplicação do material como matriz para imobilização do anticorpo anti-T3, visando o desenvolvimento de um imunossensor para detecção de T3. Houve sucesso nas etapas de biofuncionalização da plataforma, sendo possível a diferenciação significativa entre os sinais obtidos apenas do filme, daqueles obtidos apenas da sonda sobre o filme, e daqueles após a interação sonda-alvo.

A partir dos resultados de detecção do imunossensor para T3 proposto, foi possível a avaliação das melhores condições de eletrossíntese de 4-PANAP, visando aqueles que melhoraram a diferenciação entre os sinais de corrente da superfície copolimérica do sinal de sonda, e deste último com o sinal de alvo. Com este estudo, concluiu-se que a melhor condição de síntese é utilizando uma mistura equimolar (1:1) de 4-aminofenol e anilina, em uma faixa de potencial de $-0,1$ a $+1,2$ V, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Foi possível a construção de uma curva analítica para concentrações de T3, caracterizada como uma etapa fundamental para o desenvolvimento de biossensores. Os resultados obtidos mostram uma relação linear entre a corrente anódica e a faixa de concentração de T3, na faixa de trabalho de $0,2$ a $8,8 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, alcançando um limite de detecção de $0,60 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e um limite de quantificação de $1,80 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. A faixa de trabalho compreende a faixa de concentração de T3 no sangue, considerada como nível normal. Além disso, alguns testes de validação indicaram boa repetibilidade da plataforma e boa estabilidade, mantendo 90% de sua resposta após 60 dias de armazenamento.

Em conclusão, foi possível preparar um material copolimérico com características distintas daquelas de seus polímeros de origem, sendo evidente a contribuição das propriedades dos dois monômeros para o produto final. O material desenvolvido se mostrou bastante promissor para aplicação em biossensores, visto pela facilidade de preparação, pouco consumo de matéria prima e não geração de resíduos. O imunossensor proposto se mostrou eficaz no monitoramento de concentração do hormônio tireoidiano T3, o que aumenta a expectativa de aplicação para diagnóstico real de pacientes, pelo fato de utilizar pequeno volume de amostra, baixo tempo de resposta e possibilidade de miniaturização.

REFERÊNCIAS

- AHMADI, Zahed; CHAUHAN, Narendra Pal Singh; ZARRINTAJ, Payam; KHIABANI, Aidin Bordbar; SAEB, Mohammad Reza; MOZAFARI, Masoud. Experimental procedures for assessing electrical and thermal conductivity of polyaniline. *In: MOZAFARI, Masoud; CHAUHAN, Narendra Pal Singh (ed). **Fundamentals and Emerging Applications of Polyaniline***. [Amsterdã]: Elsevier, 2019. ISBN 978-0-12-817915-4, versão *online*. DOI: <https://doi.org/10.1016/C2018-0-02707-3>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/book/9780128179154/fundamentals-and-emerging-applications-of-polyaniline#book-info>. Acesso em: 14 jan. 2021.
- ALVES-BALVEDI, Renata Pereira; CAETANO, Luciano Pereira; MADURRO, João Marcos; BRITO-MADURRO, Ana Graci. Use of 3,3',5,5' tetramethylbenzidine as new electrochemical indicator of DNA hybridization and its application in genosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, vol. 85, p. 226-231, 2016. ISSN 0956-5663. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.05.016>.
- ANDRADE, Giovani de Toledo; AGUIRRE, María Jesús; BIAGGIO, Sonia Regina. Influence of the first potential scan on the morphology and electrica properties of potentiodynamically grown polyaniline films. **Electrochimica Acta**, vol. 44, p. 633-642, 1998. ISSN: 0013-4686. DOI: <https://doi.org/10.1016/S0013-4686%2898%2900185-6>.
- AWUZIE, Chioma I. Conducting polymers. **Materials Today: Proceedings**, vol. 4, n. 4, part. E, p. 5721-5726, 2017. ISSN 2214-7853. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.06.036>.
- AZEVEDO, Monalisa Ferreira; SALES, Barbára Guiomar; MAIA, L.; LEAL, E. Interpretação dos testes de função tireoidiana. *In: VILLAR, Lúcio. (ed.). **Endocrinologia Clínica***, 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 219-230.
- BLAIR, Ewen O.; CORRIGAN, Damion K. A review of microfabricated electrochemical biosensors for DNA detection. **Biosensors and Bioelectronics**, n. 134, p. 57-67, 2019. ISSN 0956-5663. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.03.055>.
- BRETT, Ana Maria Oliveira; BRETT, Christopher Michael Ashton. **Electroquímica – Princípios, Métodos e Aplicações**. Coimbra: Livraria Almedina, 1996. 471 p. ISBN 9789724009728.
- CAEATNO, Larissa; COSTA, Kellen; SILVA, Thalles; DIAS, Lídia; RODOVALHO, Vinícius; MADURRO, João Marcos; BRITO-MADURRO, Ana Graci. Use of gold nanoparticles os graphite electrodes functionalized with poly(4-aminophenol) in the development of a bioelectrode for hepatites B. **BMC Proceedings**, vol. 8, p. 57-58, nov. 2014. Trabalho apresentado no 5th Congress of the Brazilian Biotechnology Society (SBBIOTEC), 2013, Florianópolis. ISSN: 1753-6561. DOI:10.1186/1753-6561-8-S4-P57.
- CANEVAROLO JÚNIOR, Sebastião Vicente. **Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. 2ª ed. São Paulo: Artliber Editora, 2002. 282 f. ISBN 85-88-098-10-5.

CAROLINO, Adriano de Souza. **Estimativa do percentual de cristalinidade de polímeros semicristalinos derivados da anilina através dos padrões de difração de raios X**. Orientador: Edgar Aparecido Sanches. 2017. 88 f. Dissertação (Mestrado em Física) – Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2017. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/5624#preview-link0>. Acesso em: 15 mar. 2021.

CESEWSKI, Ellen; JOHNSON, Blake N. Electrochemical biosensors for pathogen detection. **Biosensors and Bioelectronics**, vol. 159, p. 1-29, 2020. ISSN 0956-5663. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112214>.

CERQUEIRA, Bruna. **Hipertireoidismo e Hipotireoidismo**. 2010. Disponível em: <https://pt.slideshare.net/ennyviana/hiper-e-hipotireoidismo>. Acesso em: 15 mar. 2021.

CHAI, Jingdang; ZHANG, Yingying; LIU, Fen; ZHANG, Hui; ZHANG, Xinxin; XU, Jingkun; ZHANG, Ge. The effect of boron trifluoride diethyl etherate on electrochemical polymerization and surface morphology of conjugated porous polymer poly(4,4',4''-Tris(9-carbazolyl)triphenylamine). **Journal of Electroanalytical Chemistry**, vol. 852, p. 113502, 2019. ISSN: 1572-6657. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.113502>.

CHAUHAN, Narendra Pal Singh; MOZAFARI, Masoud. Polyaniline: an introduction and overview. In: MOZAFARI, Masoud; CHAUHAN, Narendra Pal Singh (ed). **Fundamentals and Emerging Applications of Polyaniline**. [Amsterdã]: Elsevier, 2019. ISBN 978-0-12-817915-4 versão *online*. DOI: <https://doi.org/10.1016/C2018-0-02707-3>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/book/9780128179154/fundamentals-and-emerging-applications-of-polyaniline#book-info>. Acesso em: 20 jul. 2020.

CHEN, Chuanxiang; SUN, Cheng; GAO, Yuhua. Electrosynthesis of a net-like microstructured poly(p-aminophenol) film possessing electrochemical properties in a wide pH range. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**, vol. 45, n. 12, p. 972-979, 2008a. ISSN: 1520-5738. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10601320802453690>.

CHEN, Chuanxiang; SUN, Cheng; GAO, Yuhua; Electrosynthesis of poly(aniline-co-p-aminophenol) having electrochemical properties in a wide pH range. **Electrochimica Acta**, vol. 53, n. 7, p. 3021-3028, 2008b. ISSN: 0013-4686. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2007.11.039>.

CHEN, Chuanxiang; SUN, Cheng; GAO, Yuhua. Amperometric sensor for hydrogen peroxide based on poly(aniline-co-p-aminophenol). **Electrochemistry Communications**, vol. 11, n. 2, p. 450-453, 2009a. ISSN: 1388-2481. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.ELECOM.2008.12.026>.

CHEN, Chuanxiang; SUN, Cheng; GAO, Yuhua. Application of electrosynthesized poly(aniline-co-p-aminophenol) as a catechol sensor. **Electrochimica Acta**, vol. 54, n. 9, p. 2575-2580, 2009b. ISSN: 0013-4686. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.10.069>.

CHOI, Shin-Jung; PARK, Su-Moon. Electrochemical growth of nanosized conducting polymer wires on gold using molecular templates. **Advanced Materials**, vol. 12, n. 20, p.

1547-1549, 2000. ISSN: 1521-4095. DOI: [https://doi.org/10.1002/1521-4095\(200010\)12:20%3C1547::AID-ADMA1547%3E3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1521-4095(200010)12:20%3C1547::AID-ADMA1547%3E3.0.CO;2-1).

CLARK JR, Leland C.; LYONS, Champ. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals New York Academy of Sciences**, p. 29-45, 1962. ISSN: 1749-6632. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>.

DAKSHAYINI, B. Subbappa; REDDY, Kakarla Raghava; MISHRA, Amit; SHETTI, Nagaraj P.; MALODE, Shweta J.; BASU, Soumen; NAVEEN, S.; RAGHU, Anjanapura V. Role of conducting polymer and metal oxide-based hybrids for applications in amperometric sensors and biosensors. **Microchemical Journal**, vol. 147, p. 7-24, 2019. ISSN: 0026-265X. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.02.061>.

DALMOLIN, Carla; CANOBRE, Sheila Cristina; BIAGGIO, Sonia Regina; ROCHA-FILHO, Romeu Cardoso; BOCCHI, Nerilso. Electropolymerization of polyaniline on high surface area carbon substrates. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, vol. 578, p. 9-15, 2005. ISSN: 1572-6657. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2004.12.011>.

DE CASTRO, Ana Cristina Honorato; KOCHI, Leandro Toshio; MOÇO, Anna Clara Rios; COIMBRA, Roney Santos; OLIVEIRA, Guilherme Côrrea; CUADROS-ORELLANA, Sara; MADURRO, João Marcos; BRITO-MADURRO, Ana Graci. A new genosensor for meningococcal meningitis diagnosis using biological samples. **Journal of Solid State Electrochemistry**, vol. 22, p. 2339-2346, 2018. ISSN 1433-0768. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10008-018-3940-0>.

DEKKER, Marcel. π -electron models of conjugated polymers: vibrational and nonlinear optical spectra. In: SKOTHEIM, Terje A.; REYNOLDS, John R. (ed.). **Handbook of Conducting Polymers**, 3 ed. New York: CRC Press, 1693 p., 1998. ISBN 9781138065512, versão *on-line*. Disponível em: <https://www.routledge.com/Handbook-of-Conducting-Polymers-Fourth-Edition---2-Volume-Set/Reynolds-Thompson-Skotheim/p/book/9781138065512>. Acesso em: 22 jan. 2021.

DENG, Yuanxi; WU, Jie; TU, Kang; XU, Hui; MA, Long; CHEN, Jia; WANG, Jialiang. Preparation of DNA-based biosensor for electrochemically identification of transgenic soybean. **International Journal of Electrochemical Science**, vol. 15, p. 2456-4566, 2020. ISSN 1452-3981. DOI: <https://doi.org/10.20964/2020.05.09>.

DI VONA, Maria Luisa; KNAUTH, Philippe. Electrochemical synthesis of ion exchange polymers: comparison between hydroxide and proton conductors. **Solid State Ionics**, vol. 352, p. 115370, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ssi.2020.115370>.

DIAZ, Art F.; KANAZAWA, K. Keiji; GARDINI, Gian Piero. Electrochemical polymerization of pyrrole. **Journal of Chemical Society and Chemical Communications**, vol. 14, p. 635-636, 1979. ISSN 0022-4936. DOI: <https://doi.org/10.1039/c39790000635>.

DIAZ, Art F.; CASTILLO, Juan I. A polymer electrode with variable conductivity polypyrrole. **Journal of Chemical Society and Chemical Communications**, vol. 9, p. 397-398, 1980. ISSN 0022-4936. DOI: <https://doi.org/10.1039/c39800000397>.

DUFOUR, D. Robert. Laboratory tests of thyroid function: uses and limitations. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, vol. 36, n. 3, p. 579-594, 2007. ISSN: 0889-8529. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2007.04.003>.

EVTUGYN, Gennady; HIANIK, Tibor. Electrochemical DNA sensors and aptasensors based on electropolymerized materials and polyelectrolyte complexes. **Trends in Analytical Chemistry**, vol. 79, p. 168-178, 2016. ISSN: 0165-9936. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.025>.

FATONI, Amin; AZIZ, Abdullah Nur; ANGGRAENI, Mekar Dwi. Low-cost and real-time color detection developments for glucose biosensor. **Sensing and Bio-Sensing Research**, vol. 28, p. 100325, 2020. ISSN: 2214-1804. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2020.100325>.

FRANCO, Diego Leoni; AFONSO, André Santiago; FERREIRA, Lucas Franco; GONÇALVES, Rafael A.; BOODTS, Julien Françoise Coleta; BRITO-MADURRO, Ana Graci; MADURRO, João Marcos. Electrodes modified with polyaminophenols: Immobilization of purines and pyrimidines. **Polymer Engineering and Science**, vol. 48, p. 2043-2050, 2008. ISSN: 1548-2634. DOI: <https://doi.org/10.1002/pen.21044>.

FRANKLYN, Jayne A. The management of hyperthyroidism. **The New England Journal of Medicine**, vol. 330, n. 24, p. 1731-1738, 1994. ISSN 1533-4406. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJM199406163302407>.

GENIES, Eugène M.; TSINTAVIS, Costas. Redox mechanism and electrochemical behavior of polyaniline deposits. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, vol. 195, p. 109-128, 1985. ISSN: 1572-6657. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(85\)80009-7](https://doi.org/10.1016/0022-0728(85)80009-7).

GONZÁLEZ-TECHERA, Andrés; ZON, Maráa Alicia; MOLINA, Patricia Gabriela; FERNÁNDEZ, Héctor; GONZÁLEZ-SAPIENZA, Gualberto; ARÉVALO, Fernando Javier. Development of a highly sensitive noncompetitive electrochemical immunosensor for the detection of atrazine by phage anti-immunocomplex assay. **Biosensors and Bioelectronics**, vol. 64, p. 650-656, 2015. ISSN: 0956-5663. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.046>.

GOUVEIA, Sofia; LEITÃO, Fátima; RIBEIRO, Cristina; CARRILHO, Francisco. Fatores de interferência no estudo da função tiroideia. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, n. 11, p. 277-286, 2016. ISSN: 1646-3439. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rpedm.2016.02.008>.

GUENBOUR, Abdallah; KACEMI, A.; BENBACHIR, Ali. Corrosion protection of copper by polyaminophenol films. **Progress in Organic Coatings**, vol. 39, p. 151-155, 2000. ISSN: 0300-9440. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0300-9440\(00\)00141-7](https://doi.org/10.1016/S0300-9440(00)00141-7).

GUO, Yuna; WANG, Yu; LIU, Siu; YU, Jinghua; WANG, Hongzhi; CUI, Min; HUANG, Jiadong. Electrochemical immunosensor assay (EIA) for sensitive detection of *E. coli* O157:H7 with signal amplification on a SG-PEDOT-AuNPs electrode interface. **Analyst**, vol. 140, p. 551-559, 2015. ISSN: 1364-5528. DOI: <https://doi.org/10.1039/C4AN01463D>.

HALL, John E.; GUYTON, Arthur Clifton. **Tratado de Fisiologia Médica**. Tradução de Alcides Marinho Junior *et al.* 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1151 p., 2011.

HOLZE, Rudolf. Copolymers – A refined way to tailor intrinsically conducting polymers. **Electrochimica Acta**, vol. 56, p. 10479-10492, 2011. ISSN: 0013-4686. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.04.013>.

INSTRUMENTS, Gamry. **Basics of electrochemical impedance spectroscopy**. Disponível em: <https://www.gamry.com/application-notes/EIS/basics-of-electrochemical-impedance-spectroscopy/>. Acesso em: 23 jun. 2021.

IRAM, Mahmood; GUO, Chen; LIU, Huizhou; ISHFAQ, Ahmad. Highly ordered mesostructured silica spheres as template for polyaniline nanofibres: synthesis, characterization and their electrochemical properties. **Journal of Experimental Nanoscience**, vol. 7, n. 1, p. 27-41, 2012. ISSN: 1745-8099. DOI: <https://doi.org/10.1080/17458080.2010.498123>.

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2 ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). *Online version* (2019-), created by S. J. Chalk. DOI: <http://dx.doi.org/10.1351/goldbook.B00663>.

HAWLEY, Dale; ADAMS, Ralph N. Homogeneous chemical reactions in electrode processes measurement of rates of follow-up chemical reactions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, vol. 10, p. 376-386, 1965. ISSN: 1572-6657. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(65\)80040-7](https://doi.org/10.1016/0022-0728(65)80040-7).

HANMOHAMMADI, Akbar; AGHAIE, Ali; VAHEDI, Ensieh; QAZVINI, Ali; GHANEI, Mostafa; AFKHAMI, Abbas; HAJIAN, Ali; BAGHERI, Hasan. Electrochemical biosensors for the detection of lung cancer biomarkers: A review. **Talanta**, vol. 206, p. 120251, 2020. ISSN: 0039-9140. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120251>.

HERAS, Ángeles María; AVILA, José Luis; RUIZ, Juan José; GARCIA-BLANCO, Francisco. A contribution to the study of the electrochemical oxidation of p-aminophenol on a mercury electrode. **Electrochimica Acta**, vol. 29, p. 541-545, 1984. ISSN: 0013-4686. DOI: [https://doi.org/10.1016/0013-4686\(84\)87106-6](https://doi.org/10.1016/0013-4686(84)87106-6).

HUANG, Jiaying; KANER, Richard B. A general chemical route to polyaniline nanofibers. **Journal of American Chemical Society**, vol. 126, p. 851-855, 2004. ISSN: 0002-7863. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja0371754>.

HUANG, Jing; TURNER, Richard. Recent advances in alternating copolymers: The synthesis, modification, and applications of precision polymers. **Polymer**, vol. 116, p. 572-586, 2017. ISSN: 0032-3861. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2017.01.020>.

HUANG, W. S.; MACDIARMID, Alan Graham. Optical properties of polyaniline. **Polymer**, vol. 34, n. 9, p. 1833-1845, 1993. ISSN: 0032-3861. DOI: [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(93\)90424-9](https://doi.org/10.1016/0032-3861(93)90424-9).

KARABIBEROGLU, Sukriye Ulubay; KOÇAK, Çağrı Ceylan; DURSUN, Zekerya. Electrochemical determination of dicofol at nickel nanowire modified poly(p-aminophenol) film electrode. **Electroanalysis**, vol. 31, p. 1304-1310, 2019. ISSN: 1521-4109. DOI: <https://doi.org/10.1002/elan.201900095>.

KONG, Yong; LI, Xueying; NI, Junhua; YAO, Chao; CHEN, Zhidong. Enantioselective recognition of glutamic acid enantiomers based on poly(aniline-co-m-aminophenol) electrode column. **Electrochemistry Communications**, vol. 14, p. 17-20, 2012. ISSN: 1388-2481. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2011.10.019>.

LANGER, Jerzy J.; FRAMSKI, Grzegorz; JOACHIMIAK, Roman. Polyaniline nano-wires and nano-networks. **Synthetic Metals**, vol. 121, p. 1281-1282, 2001. ISSN: 0379-6779. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0379-6779\(00\)01438-7](https://doi.org/10.1016/S0379-6779(00)01438-7).

LASIA, Andrzej. **Electrochemical impedance spectroscopy and its applications**. New York: Springer New York Heidelberg Dordrecht London, 369 p., 2014. Versão online, ISBN: 978-1-4614-8933-7. Disponível em: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4614-8933-7>. Acesso em: 19 jun. 2021.

LACERDA, Ariadne Fernandes. **Desenvolvimento e caracterização de copolímeros produzidos a partir dos monômeros anilina e 4-aminofenol para aplicação em plataforma de biossensores**. Orientador: João Marcos Madurro. 2020. 98 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/29004>. Acesso em: 06 jan. 2021.

LEITE FILHO, Valfrido Furtado. **Eletropolimerização e caracterização de polianilina com incorporação de nanopartículas de TiO₂ a diferentes pHs**. Ouro Preto: Editora UFOP, 2018. 128 p.

LETHEBY, Henry. On the production of a blue substance by the electrolysis of sulphate of aniline. **Journal of the Chemical Society**, vol. 15, p. 161-163, 1862. ISSN: 0368-1769. DOI: <https://doi.org/10.1039/JS8621500161>.

LEVA-BUENO, J.; PEYMAN, Sally A.; MILNER, Paul. A review on impedimetric immunosensors for pathogen and biomarker detection. **Medical Microbiology and Immunology**, vol. 209, p. 343-362, 2020. ISSN: 1432-1831. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00430-020-00668-0>.

LIANG, Liang; LIU, Jiu; WINDISCH JR, Charles F.; EXARHOS, Gregory J.; LIN, Yuehe. Direct assembly of large arrays of oriented conducting polymer nanowires. **Angewandte Chemie International Edition**, vol. 41, n. 19, p. 3665-3668, 2002. ISSN: 1521-3773. DOI: [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20021004\)41:19%3C3665::AID-ANIE3665%3E3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20021004)41:19%3C3665::AID-ANIE3665%3E3.0.CO;2-B).

LIU, Jun; LIN, Yuehe; LIANG, Liang; VOIGT, James A.; HUBER, Dale L.; TIAN, Zhengrong R.; COKER, Eric; MCKENZIE, Bonnie; MCDERMOTT, Matthew J. Templateless assembly of molecularly aligned conductive polymer nanowires: A new approach for oriented nanostructures. **Chemical European Journal**, vol. 9, n. 3, p. 604-611, 2003. ISSN: 1521-3765. DOI: <https://doi.org/10.1002/chem.200390064>.

LIU, Meiling; YE, Min; YANG, Qin; ZHANG, Youyu; XIE, Qingji; YAO, Shouzhao. A new method for characterizing the growth and properties of polyaniline and poly(aniline-co-o-aminophenol) films with the combination of EQCM and in situ FTIR spectroelectrochemistry.

Electrochimica Acta, vol. 52, p. 342-352, 2006. ISSN: 0013-4686. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2006.05.013>.

LIVINGSTON, Mark; BIRCH, K.; GUY, Mark; KANE, J.; HEALD, Adrian H. No role for tri-iodothyronine (T3) testing in the assessment of levothyroxine (T4) over-replacement in hypothyroid patients. **British Journal of Biomedical Science**, vol. 72, p. 160-163, 2015. ISSN: 0967-4845. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2006.05.013>.

LU, Hongbin; ZHOU, Youzhen; VONGEHR, Sascha; HU, Kun; MENG, Xiangkang. Electropolymerization of PANI coating in nitric acid for corrosion protection of 430 SS. **Synthetic Metals**, vol. 161, p. 1368-1376, 2011. ISSN: 0379-6779. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2011.05.003>.

MACDIARMID, Alan Graham. "Synthetic Metals": A novel role for organic polymers (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie International Edition**, vol. 40, p. 2581-2590, 2001. ISSN: 1521-3773. DOI: [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010716\)40:14%3C2581::AID-ANIE2581%3E3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010716)40:14%3C2581::AID-ANIE2581%3E3.0.CO;2-2).

MARTIN, Charles R. Template synthesis of electronically conductive polymer nanostructures. **Accounts of Chemical Research**, vol. 28, n. 2, p. 61-68, 1995. ISSN: 0001-4842. DOI: <https://doi.org/10.1021/ar00050a002>.

MZENDA, Venantio Marovha. **Characterization of the electrical properties of polyaniline in the temperature range 30-450 K**. Orientador: S. A. Goodman. 2006. 148 f. Dissertação Faculty of Natural and Agricultural Sciences da University of Pretoria, Pretória, 2006. URI: <http://hdl.handle.net/2263/29755>. Disponível em: <https://repository.up.ac.za/handle/2263/29755>. Acesso em: 15 jun. 2021.

MELLO, Hugo José Nogueira Pedroza Dias; MULATO, Marcelo. Effect of aniline monomer concentration on PANI electropolymerization process and its influence for applications in chemical sensors. **Synthetic Metals**, vol. 239, p. 66-70, 2018. ISSN: 0379-6779. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2018.02.008>.

MELO, Edmar Isaías; FRANCO, Diego Leoni; AFONSO, André Santiago; REZENDE, Hélen Cristine; BRITO-MADURRO, Ana Graci; MADURRO, João Marcos; COELHO, Nívia Maria Melo. A biosensor using poly(4-aminophenol)/acetylcholinesterase modified graphite electrode for the detection of dichlorvos. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol. 54, n. 6, p. 1217-1222, 2011. ISSN: 1678-4324. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-89132011000600018>.

MENEZES, HEBERT A.; MAIA, GILBERTO. Films formed by the electrooxidation of p-aminophenol (p-APh) in aqueous medium: What do they look like? **Journal of Electroanalytical Chemistry**, vol. 586, p. 39-48, 2006. ISSN: 1572-6657. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2005.09.014>.

MOON, Jong-Min; THAPLIYAL, Neeta; HUSSAIN, Khalil Khadim; GOYAL, Rajendra N.; SHIM, Yoon-Bo. Conducting polymer-based electrochemical biosensors for neurotransmitters: a review. **Biosensors and Bioelectronics**, vol. 102, p. 540-552, 2018. ISSN: 0956-5663. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.069>.

MOROVAT, Alireza. Methods for the Investigation of Thyroid Function. *In*: WHEELER, Michael J. **Hormone Assays in Biological Fluids**, p 75-104, 2013. Versão online. ISBN: 978-1-62703-616-0. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-616-0_5.

MOZHGANI, Sayed-Hamidreza; KERMANI, Hanie Ahmadzade; NOROUZI, Mehdi; ARABI, Mohsen; SOLTANI, Saber. Nanotechnology based strategies for HIV-1 and HTLV-1 retroviruses gene detection. **Heliyon**, vol. 6, p. 04048, 2020. ISSN: 2405-8440. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04048>.

MU, Shaolin. Poly(aniline-co-o-aminophenol) nanostructured network: electrochemical controllable synthesis and electrocatalysis. **Electrochimica Acta**, vol. 51, p. 3434-3440, 2006. ISSN: 0013-4686. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2005.09.039>.

NAWAZ, Mian Hasnain; HAYAT, Akhtar; CATANANTE, Gaelle; LATIF, Usman; MARTY, Jean Louis. Development of a portable and disposable NS1 based electrochemical immunosensor for early diagnosis of dengue virus. **Analytica Chimica Acta**, vol. 1026, p. 1-7, 2018. ISSN: 0003-2670. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.032>.

OLIVEIRA, Danielle Alves; SILVA, Jussara Vieira; FLAUZINO, José Manuel Rodrigues; SOUSA, Heliane Silva; CASTRO, Ana Cristina Honorato; MOÇO, Anna Clara Rios; SOARES, Márcia M. C. N.; MADURRO, João Marcos; BRITO-MADURRO, Ana Graci. Carbon nanomaterial as platform for electrochemical genosensor: a system for the diagnosis of the hepatitis C in real sample. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, vol. 844, p. 6-13, 2019. ISSN: 1572-6657. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.04.045>.

OLIVEIRA, Vanessa; MALDONADO, Rafael Resende. Hipotireoidismo e hipertireoidismo – uma breve revisão sobre as disfunções tireodianas. **Revista Interciência e Sociedade**, vol. 3, n. 2, p. 36-44, 2014. ISSN: 2238-1295. Disponível em: <https://revista.francomontoro.com.br/intercienciaesociedade/article/view/65/53>. Acesso em: 30 jul. 2021.

PADILHA, Giovana da Silva; GIACON, Virgínia Mansanares; BARTOLI, Júlio Roberto. Effect of solvents on the morphology of PMMA films fabricated by spin-coating. **Polímeros**, vol. 27, n. 3, p. 195-200, 2017. ISSN: 0104-1428. DOI: <https://doi.org/10.1590/0104-1428.12516>.

PADILLA, Ronald Marcos Arcos. **Estudo de Transporte de Carga de Polímeros de Polianilina**. Orientador: Marco Aurélio C. Pacheco. 2011. 84 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica) – Departamento de Engenharia Elétrica, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/PUC_RIO-1_885ebb2955cee2a4c45d84b0ab2fd4d0. Acesso em: 28 jan. 2021.

PARAÍSO, Lara Ferreira; PAULA, Lucas Ferreira de; FRANCO, Diego Leoni; MADURRO, João Marcos; BRITO-MADURRO, Ana Graci. Bioelectrochemical detection of alanine aminotransferase for molecular diagnostic of the liver disease. **International Journal of Electrochemical Science**, vol. 9, p. 1286-1297, 2014. ISSN 1452-3981. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Bioelectrochemical-Detection-of-Alanine-for-of-the-Para%C3%ADso-Paula/19d501927e4bda64e977a26aad261c51006161f>. Acesso em 15 jan. 2021.

PARSA, Ali; TAJIK, Maryam. Determination of ascorbic acid using differential pulse voltammetry method on aniline-co-para-aminophenol modified electrode. **Polish Journal of Chemical Technology**, vol. 19, n. 2, p. 125-129, 2017. ISSN: 1899-4741. DOI: <https://doi.org/10.1515/pjct-2017-0038>.

FIGUILLEM, Sofia V.; ORTEGA, Francisco G.; RABA, Julio; MESSINA, Germán Alejandro; FERNÁNDEZ-BALDO, Martín A. Development of a nanostructured electrochemical immunosensor applied to the early detection of invasive aspergillosis. **Microchemical Journal**, vol. 139, p. 394–400, 2018. ISSN: 0026-265X. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.03.025>.

PIMENTEL, Laura; HANSEN, Karen N. Thyroid disease in the emergency department: a clinical and laboratory review. **The Journal of Emergency Medicine**, vol. 28, n. 2, p. 201-209, 2005. ISSN: 0736-4679. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jemermed.2004.08.020>.

RIVAS, Ana M.; PENA, Camilo; KOPEL, Jonathan; DENNIS, Jeff A.; NUGENT, Kenneth. Hypertension and hyperthyroidism: association and pathogenesis. **The American Journal of the Medical Sciences**, vol. 361, n. 1, p. 3-7, 2021. ISSN: 0002-9629. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2020.08.012>.

REID, Jeri R.; WHEELER, Stephen F. Hyperthyroidism: Diagnosis and Treatment. **American Family Physician**, vol. 72, n. 4, p. 623-630, 2005. ISSN: 1532-0650. Disponível em: <https://www.aafp.org/afp/2016/0301/p363.html>. Acesso em: 19 jun. 2021.

RENGAMANI, S.; MURALIDHARAN, S.; ANBU KULANDAINATHAN, M.; VENKATAKRISHNA IYER, S. Inhibiting and accelerating effects of aminophenols on the corrosion and permeation of hydrogen through mild steel in acidic solutions. **Journal of Applied Electrochemistry**, vol. 24, p. 355-360, 1994. ISSN: 1572-8838. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF00242066.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2021.

RIBEIRO, Josimar. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica: uma ferramenta nas investigações eletroquímicas. **Revista Virtual de Química**, vol. 12, n. 6, p. 1-16, 2020. ISSN: 1984-6835. DOI: <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200123>.

ROSLAN, Nazreen Che; AIZAMDDIN, Muhammad Faiz; OMAR, Siti Nurzatul Ikma; JANI, Nur Aimi; HALIM, Mohamed Izzharif Abdul; ARIFFIN, Zaidah Zainal; MAHAT, Mohd Muzamir. Morphological and conductivity studies of polyaniline fabric doped phosphoric acid. **Malaysian Journal of Analytical Sciences**, vol. 24, n. 5, p. 698-706, 2020. ISSN: 1394-2506. Disponível em: https://mjas.analis.com.my/mjas/v24_n5/pdf/Nazreen_24_5_7.pdf. Acesso em: 19 jan. 2021.

SABIN – Medicina Diagnóstica, 2019. Disponível em: < <https://www.sabin.com.br/>>. Acesso em 12 fev. 2019.

SAIKRITHIKA, Sairaman; HUANG, Sheng-Tung; KUMAR, Annamalai Senthil. Electrochemical polymerization of para-chloroaniline as highly redox-active poly(para-chloroaniline) on graphitized mesoporous carbon surface. **Electrochimica Acta**, vol. 349, p. 136376, 2020. ISSN: 0013-4686. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.136376>.

SAM, Sabrina; TOUAHIR, L.; ANDRESA, J. Salvador; ALLONGUE, Phillippe; CHAZALVIEL, J.-N.; GOUGET-LAEMMEL, Anne Chantal; DE VILLENEUVE, Catherine Henry; MORAILLON, A.; OZANAM, F.; GABOUZE, N.; DJEBBAR, Safia. Semiquantitative study of the EDC/NHS activation of acid terminal groups at modified porous silicon surfaces. **American Chemical Society**, n. 26, p. 809-814. 2010. ISSN: 0002-7863. DOI: <https://doi.org/10.1021/la902220a>.

SANTOS, Lucas Henrique Eiras dos. **Compósitos de polianilina e nanopartículas de magnetita eletropolimerizados sobre o aço AISI 1020: correlação entre variáveis operacionais, características eletroquímicas e propriedades anticorrosivas**. Orientador: Artur de Jesus Motheo. 2019. 185 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75134/tde-15102019-082727/pt-br.php>. Acesso em: 10 ago. 2021.

SEGATTO, Mônica Silva. **Desenvolvimento da plataforma de grafite funcionalizada com poli(ácido-4-hidroxifenilacético) sobre óxido de grafeno reduzido-nanopartículas de ouro, para detecção do hormônio triiodotironina**. Orientador: João Marcos Madurro. 2017. 114 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017. DOI: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2017.446>. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/21370>. Acesso em: 10 ago. 2021.

SETFORD, Steven J.; NEWMAN, Jeffrey D. Enzyme biosensors. p. 29-60. *In*: BARREDO, José Luis (ed). **Methods in biotechnology: microbial enzymes and biotransformations**, vol. 17. New Jersey: Humana Press, Totowa. 2005. 320 p. ISBN 978-1-59259-846-5. DOI: 10.1385/1592598463.

SILVA, Heliane Sousa da. **Desenvolvimento de um imunossensor para detecção do hormônio tireoidiano L-triiodotironina (L-T3)**. Orientador: João Marcos Madurro. 2017. 106 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.11>. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/20565>. Acesso em 10 ago. 2021.

SILVA, Jussara Vieira da. **Desenvolvimento e aplicação do material compósito HRP/PANI/PEG-MWCNT como plataforma para detecção de peróxido de hidrogênio a baixo potencial**. Orientador: Flávio Santos Damos. 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2013. Disponível em: <http://acervo.ufvjm.edu.br:8080/jspui/handle/1/508>. Acesso em 10 ago. 2021.

SILVA, Rafael da. **Síntese e caracterização de poli(4-aminofenol) e comparação com poli(4-aminofenol) produzido eletroquimicamente**. Orientador: João Marcos Madurro. 2015. 73 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Química Industrial) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.222>. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/21068>. Acesso em: 10 ago. 2021.

SILVA, Thalles Douglas Souza e; CASTRO, Ana Cristina Honorato; RODOVALHO, Vinícius de Rezende; MADURRO, João Marcos; BRITO-MADURRO, Ana Graci. Development of electrochemical genosensor for MYCN oncogene detection using rhodamine

B as electroactive label. **Journal of Solid State Electrochemistry**, vol. 20, p. 2411-2418, 2016. ISSN: 1433-0768. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10008-016-3326-0>.

SKOOG, West; HOLLER, Crouch. Voltametria. *In: Fundamentos de Química Analítica*. Tradução da 8ª edição, 2006. Thomson. 1026 f.

SPENCER, C. A. **Thyroid function tests**: assay of thyroid hormones and related substances. 2013. Disponível em: <<http://www.thyroidmanager.org/chapter/assay-of-thyroid-hormones-and-related-substances/>>. Acesso em: 04 ago. 2021.

SOGANCI, Tugba; DEMIRKOL, Dilek Odaci; AK, Metin; TIMUR, Suna. A novel organic–inorganic hybrid conducting copolymer for mediated biosensor applications. **RSC Advances**, vol. 4, p. 46357-46362, 2014. ISSN 2046-2069. DOI: <https://doi.org/10.1039/C4RA07516A>.

SOYLEMEZ, Saniye; KANIK, Fulya Ekiz; NURIOGLU, Ayda Goyçek; AKPINAR, Hava; TOPPARE, Levent. A novel conducting copolymer: investigation of its matrix properties for cholesterol biosensor applications. **Sensors and Actuators B: Chemical**, vol. 182, 2013. p. 322-329. ISSN: 0925-4005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.03.009>.

STOCKIGT, Jim R. Free thyroid hormone measurement: A critical appraisal. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, vol. 30, n. 2, p. 265-289, 2001. ISSN: 889-8529. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0889-8529\(05\)70187-0](https://doi.org/10.1016/S0889-8529(05)70187-0).

STRIEBEL, Adriana. Hipertireoidismo. *In: FOCHESTATTO FILHO, L.; BARROS, E. Medicina Interna na Prática Clínica*. Porto Alegre: Artmed, 2013. ISBN: ISBN 9788565852678.

TANISELASS, Steven; ARSHAD, Mohd Khairuddin Md; GOPINATH, Subash C. B. Graphene-based electrochemical biosensors for monitoring noncommunicable disease biomarkers. **Biosensors and Bioelectronics**, vol. 130, p. 276-292, 2019. ISSN: 0956-5663. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.01.047>.

TAYLOR, Peter N.; ALBRECHT, Diana; SCHOLZ, Anna; GUTIERREZ-BUEY, Gala; LAZARUS, John H.; DAYAN, Colin M.; OKOSIEME, Onyebuchi E. Global epidemiology of hyperthyroidism and hypothyroidism. **Natures reviews**, vol. 14, p. 301-316, 2018. ISSN 2058-8437. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2018.18>.

THENMOZHI, G.; AROCKIASAMY, P.; SANTHI, R. Jaya. Isomers of poly aminophenol: chemical synthesis, characterization, and its corrosion protection aspect on mild steel in 1M HCl. **International Journal of Electrochemistry**, p. 1-12, 2014. ISSN: 2090-3537. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/961617>.

TRCHOVÁ, Miroslava; SEDENKOVÁ, Ivana; TOBOLKOVÁ, Eva; STEJSKAL, Jaroslav. FTIR spectroscopic and conductivity study of the thermal degradation of polyaniline films. **Polymer Degradation and Stability**, vol. 86, p. 179-185, 2004. ISSN: 0141-3910. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2004.04.011>.

TURAN, Janset; KESIK, Melis; SOYLEMEZ, Saniye; GOKER, Seza; KOLB, Marit; BAHADIR, Müfit; TOPPARE, Levent. Development of an amperometric biosensor based on a novel conducting copolymer for detection of anti-dementia drugs. **Journal of**

Electroanalytical Chemistry, vol. 735, p. 41-43, 2014. ISSN: 1572-6657. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2014.10.007>.

VIAL, Jérôme; JARDY, Alain. Experimental Comparison of the Different Approaches To Estimate LOD and LOQ of an HPLC Method. **Analytical Chemistry**, vol. 71, n. 14, p. 2672-2677, 1999. ISSN: 1520-6882. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac981179n>.

VIEIRA, Sabrina Nunes; FERREIRA, Lucas Franco; FRANCO, Diego Leoni; AFONSO, André Santiago; GONÇALVES, Rafael Ariza; BRITO-MADURRO, Ana Graci; MADURRO, João Marcos. Electrochemical modifications of graphite electrodes with poly(4-aminophenol). **Macromolecular Symposia**, p. 236-242, 2007. ISSN: 1521-3900. DOI: <https://doi.org/10.1002/masy.200651333>.

WANG, Cun; XIONG, Zhengwei; SUN, Peng; WANG, Rui; ZHAO, Xin; WANG, Qiang. Facile longitudinal unzipped multiwalled carbon nanotubes incorporated overoxidized poly(p-aminophenol) modified electrode for sensitive simultaneous determination of dopamine, uric acid and tryptophan. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, vol. 801, p. 395-402, 2017. ISSN: 1572-6657. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.08.028>.

WEI, Zhixiang; WAN, Meixiang. Synthesis and characterization of self-doped poly(aniline-co-aminonaphthalene sulfonic acid) nanotubes. **Applied Polymer Science**, vol. 87, p. 1297-1301, 2003. ISSN: 1097-4628. DOI: <https://doi.org/10.1002/app.11541>.

YAZDANPANAHI, Abolfazl; RAMEDANI, Arash; ABRISHAMKAR, Amirbabak; MILAN, Peiman Brouki; MOGHADAN, Zoha Salehi; CHAUHAN, Narendra Pal Singh; SEFAT, Farshid; MOZAFARI, Masoud. Synthetic route of PANI (V): Electrochemical polymerization. In: MOZAFARI, Masoud; CHAUHAN, Narendra Pal Singh (ed). **Fundamentals and Emerging Applications of Polyaniline**. [Amsterdã]: Elsevier, 2019. ISBN 978-0-12-817915-4, versão *online*. DOI: <https://doi.org/10.1016/C2018-0-02707-3>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/book/9780128179154/fundamentals-and-emerging-applications-of-polyaniline#book-info>. Acesso em: 14 jan. 2021.

YSI Life Sciences. **Manual do usuário YSI 2300 STAT PLUS**. Analisador de Glicose e L-Lactato. 2009. Disponível em < <http://www.ysilifesciences.com/>>. Acesso em: 15 mar. 2021.

YUKIRD, Jutiporn; WONGTANGPRASERT, Tossapon; RANGKUPAN, Ratthapol; CHAILAPAKUL, Orawon; PISITKUN, Trairak; RODTHONGKUM, Nadnudda. Label-free immunosensor based on graphene/polyaniline nanocomposite for neutrophil gelatinase-associated lipocalin detection. **Biosensors and Bioelectronics**, vol. 87, p. 249-255, 2017. ISSN: 0956-5663. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.08.062>.

ZHANG, A. Q.; CUI, Chen Qiang; LEE, Jim Yang. Electrochemical degradation of polyaniline in HClO₄ and H₂SO₄. **Synthetic Metals** 72, p. 217-223, 1995. DOI: ISSN: 0379-6779. DOI: [https://doi.org/10.1016/0379-6779\(95\)03304-1](https://doi.org/10.1016/0379-6779(95)03304-1)

ZHANG, Jing; SHAN, Dan; UM, Shaolin. Electrochemical copolymerization of aniline with m-aminophenol and novel electrical properties of the copolymer in the wide pH range. **Electrochimica Acta**, vol. 51, p. 4262-4270, 2006. ISSN: 0013-4686. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2005.12.005>.

