



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA MATRIZ
FTO/POLI(3-AMINOFENOL) NA DETECÇÃO DE MARCADOR DE
LESÃO CARDÍACA POR FOTOLUMINESCÊNCIA DE QUANTUM DOTS**

Mestrando: Luciano Pereira Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

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

2011

Fevereiro



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA MATRIZ
FTO/POLI(3-AMINOFENOL) NA DETECÇÃO DE MARCADOR DE
LESÃO CARDÍACA POR FOTOLUMINESCÊNCIA DE QUANTUM DOTS**

Dissertação de mestrado
apresentada à Comissão de Pós-
Graduação do Instituto de Química
da Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito para
obtenção do título de Mestre em
Química.

Mestrando: Luciano Pereira Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

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

Área de concentração: Química

2011

Fevereiro

Agradecimentos

A Jesus Cristo, meu orientador pessoal, meu referencial particular, único digno de ser chamado "Mestre";

Ao meu pastor, Balmir Rodrigues da Cunha, instrumento nas mãos do Pai há aproximadamente uma década orientando-me pelo Espírito Santo a viver com segurança nos verdadeiros preceitos de Deus;

A minha esposa Rosilene, mulher sábia e idônea, que gerou mais duas bênçãos, meus filhos Luís Felipe e Samuel, dia após dia aprendemos em unidade a romper em fé;

A meus pais, Moacir e Abigail e minha irmã Letícia e aos demais familiares pelos sinceros votos, em especial ao meu cunhado José Antônio.

A meus irmãos em Cristo da Igreja Batista do Evangelho Pleno e da Primeira Igreja Batista de Itumbiara, família espiritual em crescimento quantitativo e qualitativo;

Ao Prof. Dr. Ivo Hümmelgen (UFPR) pelas informações cedidas e pelas "prompt replies" acerca do óxido de estanho dopado com flúor;

A Profa. Dra. Alessandra Berton (FTT) pelas discussões relacionadas à eletropolimerização de aminofenóis em vidros condutores;

A mestrandia Lívia Viol e Prof. Dr. Marco Schiavon (UFSJ) e ao doutorando Diogo Almeida (UNICAMP) pelas informações e discussões sobre os quantum dots;

Aos Profs. Dr. Sinésio, Dr. José Daniel, Ms. Rafael Ariza e José Lucio e aos técnicos Flávio Alves e Ângela Maria (FEMEC-UFU) pela colaboração nas caracterizações FE-SEM e IL;

Ao Prof. Dr. Adamo Monte (INFIS-UFU) pela atenção e tempo disponibilizado apoiando na caracterização elétrica e consecutivamente nas medidas de fotoluminescência;

Ao Prof. Dr. Carlos Ueira e as doutorandas Yara Cristina, Paula de Souza e Patrícia Tieme (INGEB-UFU), pelo apoio na biologia molecular e na concessão dos quantum dots;

Ao Prof. Dr. Fábio Augusto (IQ-UFU) pela participação extremamente construtiva na banca de qualificação;

Ao Prof. Dr. Jair Pereira (ICBIM-UFU) pelas orientações imprescindíveis na biotinylation dos anticorpos e também pelas sugestões na qualificação;

Ao meu amigo doutorando André Santiago (DQ-UFSCar) e ao Prof. Dr. Murilo Cabral (IQSC-USP) pelas discussões sobre a imobilização covalente;

A doutoranda Nizamara Simenremis (UNB) pelas imagens e discussões de AFM e ao Prof. Dr. Lucas Franco (UFVJM) pelo apoio e discussões sobre EIE;

Aos Profs. Drs. responsáveis pela minha formação teórica nesta etapa, Antônio Eduardo, Francisco Aquino, Nívea Coelho, Reinaldo Ruggiero, Sandra Terezinha, Sérgio Lemos, Waldomiro Borges, Wellington Cruz (IQ-UFU), Wendell Coltro (IQ-UFG) e Luísa Maria Abrantes (DQB-FCUL - Lisboa);

A colaboração nos estudos destas disciplinas resultando em amizades recíprocas, Flaysner Magayver, Nilson Roberto, Edmilson de Oliveira, David, Kelly Cristina, Roberto, Alexandre Faria, Alexandre Dias, Douglas Eduardo, Douglas Queiroz, Maria Thereza, Tatielli Gonçalves, Denise Tofanelo e Joyce;

À amiga Mayta Peixoto, secretária do Programa de Pós-Graduação em Química pela prestatividade e excelente trabalho junto à coordenação;

A todos os amigos do laboratório, Alex, Ana Consuelo, Ana Cristina, Deusmaque, Diego, Erick, Héden, Lara, Larissa, Letícia, Lucas de Paula, Miquéias, Natália, Pâmela e Sabrina pela colaboração direta ou indireta neste trabalho;

Ao Prof. Dr. João Marcos Madurro e a Profa. Dra. Ana Graci Brito-Madurro pela orientação e co-orientação, respectivamente, no envolvimento constante que promoveu discussões e proporcionou todas as condições necessárias para execução deste trabalho;

Aos membros da Banca pelo aceite na participação e as valiosas contribuições no aprimoramento deste trabalho;

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo;

A todos estes, sinceramente, meu muito obrigado!

***O homem tem ciência das coisas da terra,
mas a sabedoria é dom de Deus***

Na verdade, há veios de onde se extrai a prata, e lugar onde se refina o ouro.

O ferro tira-se da terra, e da pedra se funde o cobre.

Da terra procede o pão, mas por baixo é revolvida como por fogo.

As suas pedras são o lugar da safira, e tem pó de ouro.

Porém onde se achará a sabedoria, e onde está o lugar da inteligência?

O homem não conhece o seu valor, e nem ela se acha na terra dos viventes.

O abismo diz: Não está em mim; e o mar diz: Ela não está comigo.

Não se dará por ela ouro fino, nem se pesará prata em troca dela.

Nem se pode comprar por ouro fino de Ofir, nem pelo precioso ônix, nem pela safira.

Com ela não se pode comparar o ouro e cristal; nem se trocará por jóia de ouro fino.

Não se lhe igualará o topázio da Etiópia, nem se pode avaliar por ouro puro.

Donde, pois, vem a sabedoria, e onde está o lugar da inteligência?

Pois está encoberta aos olhos de todo o vivente, e oculta às aves do céu.

A perdição e a morte dizem: Ouvimos com os nossos ouvidos a sua fama.

Deus entende o seu caminho, e Ele sabe o seu lugar.

Porque Ele vê as extremidades da terra; e vê tudo o que há debaixo dos céus.

Quando deu peso ao vento, e tomou a medida das águas;

Quando prescreveu leis para a chuva e caminho para o relâmpago dos trovões;

Então a viu e relatou; estabeleceu-a, e também a esquadrinhou.

E disse ao homem:

Eis que o temor do Senhor é a sabedoria, e apartar-se do mal é a inteligência.

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas.....	i
Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tabelas.....	viii
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
1 - Introdução	1
1.1 Infarto agudo do miocárdio.....	1
1.2 Biossensores.....	3
1.3 Antígenos e Anticorpos.....	4
1.4 Técnicas de imobilização	5
1.5 Polímeros condutores.....	7
1.6 Polímeros não condutores.....	8
1.7 Eletropolimerização	9
1.8 Óxido de Estanho IV	10
1.9 Imunossensores impedimétricos livres de marcadores "label free".....	12
1.10 Imunossensores com marcadores "label".....	13
1.11 Técnicas de análise, experimentos de caracterização e detecção.....	15
2 – Objetivos	30
3 - Procedimento experimental.....	31
3.1 Fluxograma do procedimento experimental.....	31
3.2 Equipamentos, Materiais e Reagentes	32
3.2.1 Equipamentos	32
3.2.2 Materiais	32
3.2.3 Reagentes	33
3.3 Metodologia	34
3.3.1 Soluções.....	34
3.3.2 Preparação das soluções e utilização	35
3.3.3 Eletrodos	38
3.3.4 Eletropolimerização de P3AMF por Voltametria Cíclica.....	39

3.3.5 Caracterização por ultra-violeta visível	39
3.3.6 Caracterização por Espectroscopia de Fluorescência	39
3.3.7 Caracterização por infra-vermelho	39
3.3.8 Caracterização de troca iônica	40
3.3.9 Caracterização por microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo	40
3.3.10 Caracterização por microscopia de força atômica	40
3.3.11 Caracterização da espessura por interferometria a laser	41
3.3.12 Caracterização das propriedades elétricas	41
3.3.13 Caracterização do FTO/P3AMF e detecção do troponina T por espectroscopia de impedância eletroquímica.....	41
3.3.14 Biotinilação do anti-cTnT.....	42
3.3.15 Imobilização do anti-cTnT na matriz de P3AMF	42
3.3.16 "Dot blot"	43
3.3.17 Detecção do troponina T por fotoluminescência	44
4 - Resultados e Discussão	46
4.1 Eletropolimerização de P3AMF por Voltametria Cíclica (VC).....	46
4.2 Espectros de UV/VIS e EF.....	49
4.3 Espectros de FTIR.....	50
4.4 Transporte iônico.....	51
4.5 Medidas topográficas de IL	53
4.6 Imagens de FE-SEM.....	55
4.7 Estudos morfológicos de superfície por AFM	56
4.8 Medidas elétricas.....	58
4.9 Espectros de EIE	61
4.10 Detecção por "Dot blot"	64
4.10.1 Marcação do anti-cTnT com biotina	64
4.10.2 Funcionalidade do biossensor tipo "Sanduíche".....	66
4.11 Imobilização do anti-cTnT no P3AMF por adsorção física	68
4.12 Imobilização do anti-cTnT no P3AMF por ligação covalente.....	69
4.13 Detecção da cTnT por EIE "label free"	71
4.14 Detecção da cTnT por fotoluminescência de quantum dots "label".....	74

5 - Conclusões e perspectivas futuras.....	77
6 - Referências Bibliográficas	80

Lista de Abreviaturas e Siglas

2AMF - 2-aminofenol

3AMF - 3-aminofenol

4AMF - 4-aminofenol

A – ampère

Å – angstrom

AFM - atomic force microscopy (microscopia de força atômica)

anti-cTnI – anticorpo monoclonal troponina I

anti-cTnT – anticorpo monoclonal troponina T

Anti-cTnT-B – anticorpo monoclonal troponina T marcado com biotina

C – Coulomb

CA – cronoamperometria

CK - creatinofosfoquinase

CP – cronopotenciometria

cTnI – troponina I

cTnT – troponina T

d. c. – circuito aberto

DAB – tetracloreto de 3,3-diaminobenzidina

EAM – enfarte agudo do miocárdio

EDC – cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

EF – espectroscopia de fluorescência

EIE – espectroscopia de impedância eletroquímica

ELISA – enzyme linked immunosorbent assay (ensaio imunoenzimático)

EQM – eletrodo quimicamente modificado

eV – elétron-volt

FE-SEM – field emission scanning electron microscopy (microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo)

FITR – fourier transform infrared spectroscopy (Infravermelho com transformada de Fourier)

FTO – fluorine doped tin oxide (óxido de estanho dopado com flúor)

HRP – Horseradish peroxidase (peroxidase de rábano silvestre)

IAM - infarto agudo do miocárdio

IL - interferometria a laser
ITO - indium tin oxide (óxido de estanho e índio)
IV - corrente elétrica X tensão
KDa – kilodalton
MO – microscópio óptico
N₂ – nitrogênio ultra puro
NHS - N-hidroxi-succinimida
NHSB – N-hidroxi-succinimida biotina
nm – nanômetro
P2AMF – poli(2-aminofenol)
P3AMF – poli(3-aminofenol)
P4AMF – poli(4-aminofenol)
PANI – polianilina
PMT - photomultiplier tube (tubo da fotomultiplicadora)
PPT – precipitado
Q – capacitância
QDs – quantum dots
R – resistência
R_{ct} - charge transfer resistance (resistência à transferência de carga)
S – Siemens
SCE – eletrodo de calomelano saturado
SEM - scanning electron microscopy (microscopia eletrônica de varredura)
S-HRP - conjugado estreptavidina-peroxidase
S-QDs – conjugado estreptavidina-quantum dot
UV/Vis – espectroscopia no ultravioleta visível
V – volts
VC – voltametria cíclica
Z' – componente real de impedância (resistiva)
Z'' – componente imaginária de impedância (capacitiva)
Z_w – impedância de Warburg
λ – lambda – comprimento de onda
σ – condutividade
Ω – ohm – resistência elétrica

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema ilustrativo de um coração com tecido cardíaco lesionado....	1
Figura 2: Esquema ilustrativo geral de biossensor.....	3
Figura 3: Esquema ilustrativo das estruturas funcionais dos anticorpos.....	4
Figura 4: Isômeros planos de aminofenóis.....	8
Figura 5: Esquema geral de eletropolimerização.....	9
Figura 6: Estrutura Cristalina do SnO_2	11
Figura 7: Quantum dots de CdSe.....	14
Figura 8: (A) Circuito equivalente de Randles para um sistema eletroquímico simples (B) Gráfico de Nyquist proveniente do circuito Randles mostrado em A.....	16
Figura 9: Esquema representativo de um perfilômetro de Mireau.....	22
Figura 10: Esquema representativo de um interferômetro de Michelson.....	22
Figura 11: Mecanismo de bioconjugação por ligação de amida (A) mediada por EDC (B) mediado por EDC com assistência de NHS.....	25
Figura 12: Mecanismo geral de biotinylação de proteínas.....	27
Figura 13: Esquema de “dot blot” usando o “A” ou “S” oligonucleotídeo alelo-específico.....	27

Figura 14: Forma do potencial em uma estrutura tipo poço quântico.....	28
Figura 15: Esquema ilustrativo do arranjo óptico utilizado na detecção do troponina T por fotoluminescência.....	45
Figura 16: Voltamogramas do P3AMF (a) Ciclos iniciais da eletropolimerização em FTO (3AMF - $2,5 \times 10^{-2}$ mol.L ⁻¹ ; H ₂ SO ₄ 2,5 mol.L ⁻¹ ; 50 mV.s ⁻¹).....	47
Figura 17: (a) Fotos dos eletrodos de FTO modificados com P3AMF ($2,5 \times 10^{-2}$ mol.L ⁻¹) após 100 sucessivos ciclos de potencial variando entre: -0.2 V e: +0.9 V (2); +1.1 V (3); +1.3 V (4); +1.6 V (5). (FTO) (1); (b) Última varredura de redução obtida nos voltamogramas de formação do P3AMF.....	48
Figura 18: Espectros UV/Vis (a) FTO (—); FTO/P3AMF por VC a (—) 25 mV.s ⁻¹ e a (—) 50 mV.s ⁻¹	49
Figura 19: Espectros sobreposto de FTIR para o 3-aminofenol (3AMF) e poli(3-aminofenol) (P3AMF).....	51
Figura 20: Respostas voltamétricas em KCl (—) FTO e (—) FTO/P3AMF: (a) 5 mmol.L ⁻¹ de K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe(CN) ₆ ; (b) 5 mmol.L ⁻¹ de Ru(NH ₃) ₆ Cl ₂	52
Figura 21: Respostas voltamétricas em KCl do FTO/P3AMF (—) antes e (—) após imersão 30 minutos em solução contendo: (a) 5 mmol.L ⁻¹ de K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe(CN) ₆ ; (b) 5 mmol.L ⁻¹ de Ru(NH ₃) ₆ Cl ₂	52
Figura 22: Reflexão de luz na Interface FTO / FTO/P3AMF.....	53
Figura 23: Topografia na Interface FTO / FTO/P3AMF após remoção da forma.....	53

Figura 24: Média dos 100 perfis restritos a ondulação e rugosidade.....	54
Figura 25: Imagem tridimensional da interface FTO e FTO/P3AMF	54
Figura 26: Micrografias de FE-SEM; (a) FTO (amostra 1) (b) FTO/P3AMF (amostra 5).....	55
Figura 27: Imagens da topografia por AFM (a) FTO (b) FTO/P3AMF.....	56
Figura 28: Contraste de fase (AFM) (a) FTO (b) FTO/P3AMF.....	57
Figura 29: Caracterização elétrica IV dos filmes – (a) FTO / FTO/P3AMF / Resistor ($R=12\text{ K}\Omega$); (b) FTO/P3AMF lavado em H_2O e solução eletrolítica de $\text{H}_2\text{SO}_4\ 2,5\text{ mol.L}^{-1}$; (c) FTO modificado com PANI.....	59
Figura 30: Estrutura da PANI na forma de base (não dopada).....	60
Figura 31: Diagrama de Nyquist (Z'' vs. Z') para medidas de impedância em $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}\ 5\text{ mmol.L}^{-1}/\text{KCl}\ 0,1\text{ mol.L}^{-1}$ para o FTO e FTO/P3AMF; (–) Fitting.....	61
Figura 32: Circuito equivalente proposto para simulação dos dados experimentais dos eletrodos (a) FTO e (b) FTO/P3AMF.....	62
Figura 33: Esquema da biotinylation do anti-cTnT.....	65
Figura 34: Ensaio de “dot blot” em membrana de nitrocelulose sensibilizada: em (1) com anti-cTnI e em (3) com anti-cTnT-B (controle negativo de proteínas irrelevantes). Em (2) com cTnT (controle positivo). A membrana foi sondada com anti-cTnT-B e S-HPR. A reação foi revelada com DAB®.....	65

Figura 35: Esquema ilustrativo do design utilizado no ensaio de “*dot blot*” para verificação da funcionalidade do biossensor (a) Troponina T (+) (b) Anti-troponina I (-).....67

Figura 36: Ensaio de “*dot blot*” em membrana de nitrocelulose sensibilizada em(1) e (2) com anti-cTnT. Em (1) adicionado alvo específico cTnT (controle positivo) e em (2) proteína irrelevante anti-cTnI (controle negativo). As membranas foram sondadas com anti-cTnT-B e S-HRP. A reação foi revelada com DAB[®] w/Co.....68

Figura 37: Imagens da topografia por AFM (a) FTO/P3AMF (b) anti-cTnT imobilizada por adsorção física em FTO/P3AM após lavagem sob agitação em PBS.....69

Figura 38: Representação esquemática da ligação covalente do anti-cTnT via EDC/NHS com a matriz FTO/P3AMF.....71

Figura 39: Esquema ilustrativo do design utilizado na detecção por EIE (a) Sonda (b) Troponina T (+) (c) Anti-troponina I (-).....71

Figura 40: Diagrama de Nyquist (Z'' vs. Z') para medidas de impedância em $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ $5 \text{ mmolL}^{-1}/\text{KCl } 0,1 \text{ molL}^{-1}$ para a sonda, o controle (+) Troponina T e o controle (-) Anti-troponina I; (-) Fitting.....72

Figura 41: Circuito equivalente proposto para simulação dos dados experimentais para o sistema (a), (b) e (c) da Figura 49.....72

Figura 42: Esquema óptico real utilizado na fotoluminescência para detecção do troponina T através de QDs de CdSe/ZnS como marcadores.....74

Figura 43: Esquema ilustrativo do design utilizado na detecção por fotoluminescência (a) Sonda (b) Troponina T (+) (c) Anti-troponina I (-).....75

Figura 44: Espectros de fotoluminescência (a) Sonda (b) Anti-troponina I (-) (c) Troponina T (+).....75

Lista de Tabelas

Tabela 1: Parâmetros obtidos, a partir dos resultados de simulação de EIE para os eletrodos de FTO e FTO/P3AMF.....63

Tabela 2: Parâmetros obtidos, a partir dos resultados de simulação EIE para o imunossensor na presença do alvo (+) e (-) para marcador de lesão cardíaca.....73

Resumo: O coração é um órgão vital propulsor de sangue, que transporta oxigênio e nutrientes para todo organismo, todavia quando estes componentes não chegam a ele devido à obstrução arterial, ocorre instabilidade elétrica no processo de contração deste músculo, causando arritmias que, normalmente em menos de uma hora, promovem o infarto agudo do miocárdio, que juntamente com os problemas vasculares cerebrais são os maiores responsáveis pela mortalidade em todo o mundo. O diagnóstico segundo a OMS tem 3 vertentes: clínico, eletrocardiográfico e bioquímico. Este último é muito lento e os dois primeiros apresentam muitas falhas, sendo necessário o desenvolvimento de técnicas analíticas que possam gerar resultados rápidos, específicos, sensíveis e de baixo custo. Polímeros como poli(aminofenóis) são plataformas interessantes para imobilização de biomoléculas em função dos substituintes no anel aromático e de suas características, tais como: excelente permeabilidade, seletividade, reprodutibilidade e tempo de resposta rápida. Para formação destes polímeros a síntese eletroquímica é a mais usual e quando o interesse é pela detecção óptica, substratos vítreos como o óxido de estanho dopado com flúor (FTO) tornam-se atrativos como transdutores, pelas suas excelentes características, tais como: boa condutividade elétrica, alta transparência, inércia química, alta reprodutibilidade e aderência ao vidro. A detecção óptica indireta através de marcadores aumenta a sensibilidade do diagnóstico, sendo que os quantum dots têm se mostrado superiores aos fluoróforos convencionais, como a cianina, a rodamina e o alexa flúor, em função de suas propriedades fotofísicas extraordinárias como: amplo espectro de absorção, estreito espectro de emissão, elevada fotoestabilidade e tempo de decaimento. Neste trabalho foi eletropolimerizado em FTO através de voltametria cíclica o 3-aminofenol, cujo espectro de ultravioleta na região do visível mostrou absorção entre 300 e 350 nm, proporcional a quantidade de material formado. A troca iônica das sondas redox ferro/ferricianeto de potássio e cloreto de hexaminrutênio (II) demonstraram que o material tem atração por estruturas catiônicas e repulsão por estruturas aniônicas. As imagens de microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo e de força atômica mostraram recobrimento polimérico rugoso quase total da superfície do FTO, cuja espessura máxima por interferometria a laser foi estimada em 375 ± 75 nm. A caracterização elétrica e a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) demonstraram que o material tem um elevado caráter passivante, podendo ser aplicado como matriz na construção de uma plataforma de diagnóstico para lesão cardíaca através da formação de uma ligação amida estável entre os grupamentos NH_2 do poli(3-aminofenol) e as carboxilas terminais (Fc) do anti-troponina T via EDC/NHS. Adicionalmente este anticorpo foi modificado com biotina, sendo sua afinidade a estreptavidina, assim como a especificidade entre anticorpo e antígeno exploradas no design deste sistema. A detecção seletiva do troponina T foi realizada qualitativamente ("*dot blot*") e quantitativamente por (EIE) e fotoluminescência de quantum dots (PL) na concentração de $0,5 \mu\text{M}$, sendo estes resultados promissores no desenvolvimento de imunossensor para marcador de lesão cardíaca.

Palavras-chave: lesão cardíaca, poli(3-aminofenol), FTO, biotilação, quantum dots.

Abstract: The heart is a vital organ propelling blood, that carries oxygen and nutrients throughout the body, but whenever these components do not reach it due to arterial obstruction, there is an electrical instability in the process of contraction of the muscle, causing arrhythmias that often, in less than an hour, causes acute myocardial infarction. The problem and cerebrovascular accident are the major cause of mortality worldwide. The diagnosis according to WHO meet three possibilities: clinical exam, electrocardiograph, and biochemistry. The former is slower while the others are inaccurate. Thus, there is much room for the development of analytical techniques that can generate quick results, specific, sensitive, and inexpensive. Polymers such as poly(aminophenols) are interesting platforms for these systems for the immobilization of biomolecules due the substituents on the benzene ring and its characteristics such as excellent permeability, selectivity, reproducibility and fast response time. To form these polymers the electrochemical synthesis is the most common procedure and where the interest is for the optical detection, vitreous substrates like tin fluorine doped tin oxide (FTO) become attractive as transducers for their excellent features such as: good electrical conductivity, high transparency, chemical inertness, high reproducibility and adherence to glass. The optical detection via indirect markers increases the sensitivity of diagnosis, and the quantum dots have been shown to be superior to conventional fluorophores such as cyanine, rhodamine and alexa fluor, based on their outstanding photophysical properties such as broad absorption spectrum, narrow emission spectrum, high photostability and decay time. In this work was electropolymerized on FTO by cyclic voltammetry in 3-aminophenol, whose ultra-violet spectrum in the visible region showed between 300 and 350 nm, proportional to the amount of material formed. Ion exchange of iron redox probes / ferricyanide of potassium and hexaammineruthenium (II) chloride showed that the material attracts cationic structures and repels anionic structures. Scanning electron microscopy with field emission and atomic force microscopy showed almost total polymer coating rough FTO surface whose thickness by laser interferometry was estimated at 375 ± 75 nm. Electrical characterization and electrochemical impedance spectroscopy (EIE) showed that the material has a high passivating character. That can be applied as matrix for building the diagnostic platform for cardiac injury through stable amide bonds among the NH_2 groups of poly(3-aminophenol) and end carboxyls (Fc) of anti-troponin T via EDC/NHS. Additionally, this antibody was modified with biotin being streptavidin its affinity, such as the specificity between antibody and antigen investigated in the design of this system. Selective detection of troponin T was performed qualitatively (dot blot) and quantitatively by (EIE); and quantum dot photoluminescence (PL), at $0.5 \mu\text{M}$. The results are promising to develop immunosensors for marker cardiac injuries.

Keywords: cardiac injury, poly(3-aminophenol), FTO, biotinylation, quantum dots.

1 - Introdução

1.1 Infarto agudo do miocárdio

Infarto agudo do miocárdio (IAM), popularmente conhecido como ataque cardíaco é um processo que pode levar à necrose de parte do músculo cardíaco por falta de aporte adequado de nutrientes e oxigênio. O IAM é causado pela redução do fluxo sanguíneo coronariano de magnitude e duração suficiente para não ser compensado pelas reservas orgânicas [1].

A causa habitual da morte celular é uma isquemia no músculo cardíaco, por oclusão de uma artéria coronária (Figura 1). A oclusão se dá em geral pela formação de um coágulo sobre uma área previamente comprometida por aterosclerose causando estreitamentos luminais de dimensões variadas. A falta de circulação impede a chegada de nutrientes e de oxigênio ao território arterial.

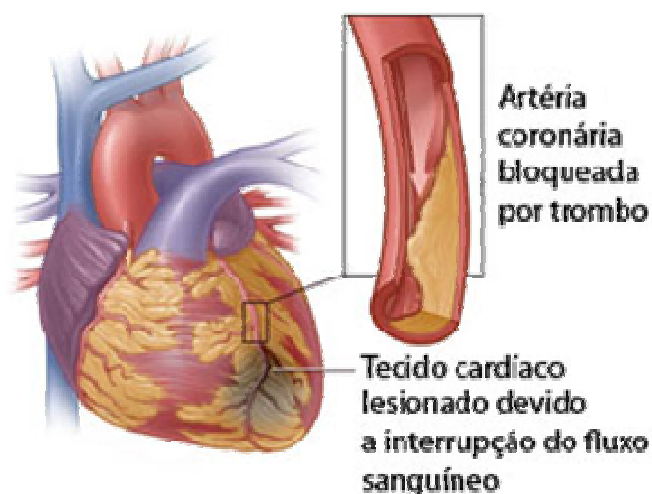


Figura 1: Esquema ilustrativo de um coração com tecido cardíaco lesionado.

A isquemia determina redução imediata e progressiva da contratilidade do miocárdio, que por sua vez é originada da dinâmica da movimentação normal de íons, em especial potássio, cálcio e sódio, isto ocasiona uma instabilidade elétrica que altera o ritmo cardíaco que é dependente do fluxo destes íons e de elétrons, o que leva ao aparecimento de arritmias já precocemente no infarto. A

partir de 20 minutos de oclusão, parcelas progressivamente maiores do miocárdio entram irreversivelmente em necrose, iniciando-se na região subendocárdica, metabolicamente mais ativa, estendendo-se para a epicárdica sob a forma de uma "onda de necrose", completando-se em cerca de 6 horas. Na ausência de adequada circulação colateral, 50 % da massa miocárdica em risco sofre necrose na primeira hora e 70 % em 3 a 4 horas.

Nos Estados Unidos morrem anualmente em torno de um milhão e quinhentas mil pessoas, sendo que cerca de 25 % destas mortes são devidas a este problema. No Brasil, as doenças cardiovasculares, dentre elas o infarto agudo do miocárdio, também são as principais causas de morte. Cerca de 66.000 pessoas morrem todos os anos devido ao infarto do coração em nosso país, segundo os dados do DATASUS. Cerca de 60 % destes óbitos por infarto acontecem na primeira hora após o início dos sintomas [2].

Segundo a organização mundial de saúde (OMS) o diagnóstico do IAM deve ser realizado em três vertentes, sendo elas: clínica, eletrocardiográfica e bioquímica. Pelo menos um de cada três IAM não são clinicamente reconhecidos, nem pelo paciente nem pelo médico, devido à dor torácica atípica ou a ausência da mesma. Segundo a Associação Americana de Cardiologia, cerca de 50 % dos IAM não são detectados pelo eletrocardiograma. Estes dados sugerem a necessidade de dispor de marcadores cardíacos no soro sanguíneo, capazes de detectar cada vez mais precocemente os danos causados no organismo pela necrose das células miocárdicas.

Após a lesão cardíaca, substâncias intracelulares, como a creatinofosfoquinase (CK) e os troponinas T (cTnT) e I (cTnI), passam para a circulação e suas concentrações no sangue dependem do tempo, extensão, gravidade e caráter agudo das lesões celulares [3]. Os diagnósticos atuais para os marcadores do troponina são proporcionados por quimiluminescência no ensaio imunoenzimático (ELISA), em formato de microplacas. Esta técnica apresenta algumas desvantagens, por exemplo, os laboratórios convencionais retiram em torno de 4 mL de sangue do paciente, entregando os resultados em aproximadamente 2 dias, em contrapartida são muito sensíveis conseguindo detectar o troponina abaixo de 10^{-13} mol.L⁻¹ [4].

Neste sentido o desenvolvimento de biossensores para detecção em tempo real dos níveis de concentração do troponina T cardíaca (cTnT) pode ser um guia valioso no diagnóstico das lesões de células do miocárdio [5].

1.2 Biossensores

Um sensor é um dispositivo que responde de forma seletiva a um analito particular, tornando possível sua determinação qualitativa ou quantitativa.

Nos biossensores (Figura 2), o analito (alvo) é reconhecido seletivamente por um material biológico (sonda), que está imobilizado em um transdutor, produzindo um sinal quantitativo proporcional à concentração deste alvo.

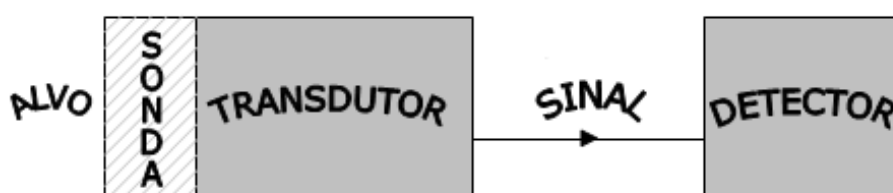


Figura 2: Esquema ilustrativo geral de biossensor.

Biossensores de tamanho reduzido, baixo custo, elevada sensibilidade e detecção em tempo-real são desejados na análise clínica e biomédica, particularmente em diagnósticos próximos aos pacientes, onde a análise deve ser rápida e pequeno volume de amostras é requerido [6,7]. Sendo assim, os sensores baseados em biomoléculas contribuem para o estabelecimento das técnicas analíticas, representando uma nova ferramenta para a determinação de analitos (glicose, uréia, lactato, colesterol, DNA, antígenos, anticorpos) em fluídos corpóreos como o sangue, e também para monitoramento ambiental e análise de alimentos [8,9].

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o analito a ser detectado. Dentre eles podemos citar os genossensores (genes) [10], os enzimáticos (enzimas) [11], os microbiológicos (microorganismos) [12] e os imunossensores (antígenos e anticorpos) [13,14].

Os imunossensores baseiam-se no uso de um anticorpo que reage especificamente com uma substância (antígeno) a ser testada. A imobilização do receptor (p.ex., anticorpo) sobre um substrato transdutor é conveniente para aplicações de reconhecimento biomolecular para detecção da molécula alvo (p.ex., antígeno) presente na solução. A especificidade da interação antígeno-anticorpo permite o desenvolvimento de imunossensores para diagnósticos clínicos, monitoramento ambiental, dentre outros [15].

1.3 Antígenos e Anticorpos

Os antígenos são componentes capazes de iniciar uma resposta imune no organismo, induzindo a produção de células T reativas e imunoglobulinas específicas. Em geral, os antígenos são componentes biológicos (vírus, bactérias, protozoários, etc) que contém proteínas, polissacarídeos e lipídeos. Estas macromoléculas podem apresentar regiões mais expostas que são capazes de estimular a produção de imunoglobulinas [16].

As imunoglobulinas ou anticorpos são glicoproteínas constituídas de quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas cadeias leves e duas cadeias pesadas unidas entre si por ligações dissulfeto (Figura 3).

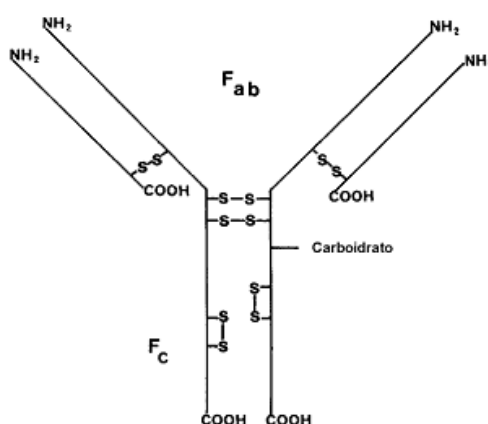


Figura 3: Esquema ilustrativo das estruturas funcionais dos anticorpos.

Funcionalmente na imunoglobulina, ainda podem ser detectadas duas regiões. A parte Fab das imunoglobulinas, apresenta uma composição variável

que é responsável pelo estabelecimento de ligações não-covalentes com os antígenos (epítipo). Esta porção da molécula está localizada na região amino-terminal do anticorpo. A parte Fc, que se apresenta mais conservada em sequência de aminoácidos, está localizada na região carboxi-terminal e é responsável pelas funções efectoras dos anticorpos, como por exemplo, a de ligação com receptores em células fagocíticas e fixação do complemento [17].

Neste contexto, os anticorpos e antígenos, assim como as demais biomoléculas, podem ser imobilizadas sobre um transdutor previamente modificado. Basicamente o objetivo das metodologias de imobilização é reter a máxima quantidade e atividade possível do elemento biorreconhecedor na superfície do transdutor. Deste modo, a imobilização dos componentes de reconhecimento sobre a superfície modificada representa fator determinante para o bom funcionamento do biossensor, o que inclui as condições adequadas de sensibilidade e especificidade.

1.4 Técnicas de imobilização

As técnicas de imobilização de biomoléculas com maior utilização são as de formação de ligação covalente e adsorção [18]. Outros processos como os de ligação cruzada ("cross-linking") e oclusão ("entrapment") também são utilizados [19,20]. Podemos destacar como característica de cada procedimento:

Adsorção física: baseia-se na formação de forças atrativas de van der Waals, ligações de hidrogênio e complexos de transição de elétrons entre as biomoléculas e o eletrodo. Este método, não exige qualquer modificação química e possui a vantagem da simplicidade, requerendo apenas uma solução contendo o componente biológico [21,22].

Ligação covalente: esta técnica baseia-se na reação entre grupos funcionais terminais da biomolécula, não essenciais à atividade biológica e grupos reativos da superfície do transdutor. Dentre as diversas superfícies, pode-se ter um

filme polimérico. Esta técnica possui como vantagem o fato de que dificilmente o componente biológico lixívia da matriz suporte, mas é extremamente relevante que os sítios biológicos sejam preservados durante a ligação e estejam disponíveis. Vários métodos são apontados para a formação da ligação covalente, por exemplo, a formação de ligações via grupos acila, diazônio e tióis [23,24].

Oclusão: esta técnica é utilizada quando o componente biológico é preparado em conjunto com o produto de modificação da superfície do eletrodo, deixando assim as biomoléculas aprisionadas. Um exemplo clássico é a preparação de filmes poliméricos em soluções contendo biomoléculas, onde estas ficam presas dentro da matriz do polímero, durante a polimerização. Poliacrilamida, amido ou nylon®, podem ser empregados para aprisionar biomoléculas [25,26]. Usualmente esta camada de modificação é separada da solução teste por uma membrana semipermeável, de forma a retardar a lixiviação do componente biológico. O processo de interação pode ser puramente físico ou envolver ligações covalentes [18].

Ligação Cruzada: baseia-se na imobilização como resultado da reação da biomolécula com um agente bifuncional em que se formam as ligações covalentes intermoleculares [27]. Os reagentes que permitem o uso desta técnica contêm grupos reativos terminais específicos para os grupos funcionais (por exemplo, aminas), que se encontram nas outras moléculas a imobilizar. A escolha do agente de “crosslinking” é feita de acordo com os grupos funcionais presentes na biomolécula e na matriz suporte. Para a maioria das aplicações é necessário manter a estrutura original da proteína, por isso, o “crosslinking” é feito em condições pouco agressivas de pH, preferencialmente em ambientes tamponados. É também importante obter um grau de conjugação entre o agente de “crosslinking” e a proteína pois, em alguns casos (incluindo enzimas em particular), é conveniente que não seja muito elevado de modo a permitir a manutenção da atividade biológica do fixado. A metodologia mais utilizada na aplicação é mergulhar da superfície de suporte (por exemplo, um eletrodo)

numa solução contendo a enzima e o agente bifuncional (por exemplo, glutaraldeído), de forma a cobrir toda a superfície, aguardar que se forme uma película (períodos que variam entre poucos minutos e várias horas, dependendo do agente) seguindo-se de períodos de lavagem e secagem da superfície tratada [18].

Analisando os fatores que influenciam as biomoléculas, como o meio reacional e o procedimento de imobilização, é possível definir a técnica que possui as condições mais adequadas ao sistema em estudo [18,28].

Sistemas desenvolvidos para biossensores usando filmes poliméricos modificando transdutores são comuns, pelo fato destas matrizes apresentarem características apreciáveis, tais como, excelente permeabilidade, seletividade, reprodutibilidade e tempo de resposta rápida.

1.5 Polímeros condutores

A pesquisa sobre polímeros condutores tem sofrido uma rápida aceleração [24,29,30,31,32,33,34], em que a obtenção de polímeros condutores é simples, sendo o método eletroquímico o mais relatado. Nestes polímeros, a cadeia polimérica possui um sistema altamente conjugado, em que os elétrons podem ser facilmente adicionados e/ou removidos [35]. Os polímeros condutores mais estudados englobam o politiofeno, polipirrol e a polianilina. Destes três a polianilina foi mais largamente utilizada nestes últimos 25 anos, devido a sua aplicação potencial em baterias recarregáveis [36], dispositivos eletrocromáticos [37], super capacitores [38], recobrimentos anti-corrosivos [39], biossensores, etc. De acordo com a literatura [40,41] a oxidação anódica da anilina leva a dímeros, por acoplamentos cabeça-cauda, cabeça-cabeça, cauda-cauda, tanto quanto a produtos poliméricos, com a participação de cátions radicais eletrogerados. Entretanto, o estudo deste polímero é mais complexo, devido à existência de várias formas redox, com a possibilidade de reações de protonação e/ou oxidação, as quais permitem a passagem de uma forma à outra. Por outro lado, o principal objetivo da pesquisa básica no sistema da

polianilina tem sido investigar as propriedades de polianilinas substituídas [42,43].

Monômeros derivados da anilina substituída com o grupo $-OH$, ou do fenol substituído com grupos $-NH_2$ são denominados aminofenóis (Figura 4), ou seja, são estruturas que podem ser classificadas como derivados do fenol e da anilina por apresentarem estes grupos ligados a um anel aromático, ambos podendo ser oxidados durante a eletropolimerização. Todavia, o estudo destes polímeros em relação à polianilina é mais recente e menos explorado [44,45,46]. Dos 3 isômeros de aminofenóis, poucos estudos são relatados com o 3-aminofenol (3AMF), sendo seu mecanismo de polimerização ainda controverso [47,48,49]. A sua detecção foi viabilizada seletivamente em relação aos seus isômeros, através de nanotubos de carbono modificados com 4-aminopiridina [50]. O 3AMF eletropolimerizado para aplicação em sensor foi estudado para detecção de peróxido de hidrogênio [51], dopado com ácido sulfúrico para mensurar teor de álcool [52], co-polimerizado com a anilina [49] para detecção de bactérias [53] e de peróxido de hidrogênio [54].

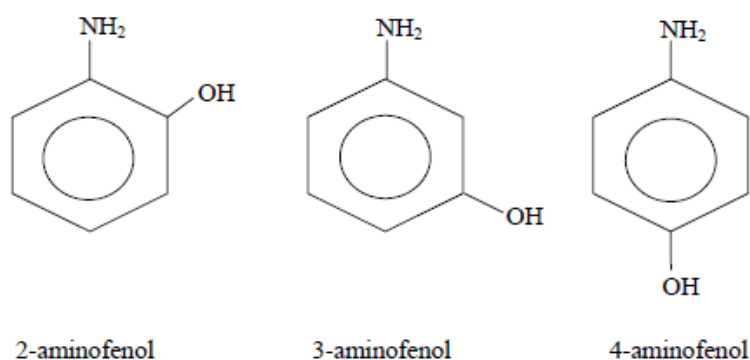


Figura 4: Isômeros planos de aminofenóis.

1.6 Polímeros não condutores

Polímeros não-condutores são matrizes suporte e podem ser utilizadas para a imobilização de biomoléculas. Esses polímeros normalmente apresentam grande resistência elétrica, sendo o filme formado muito mais fino do que os filmes poliméricos condutores. Devido à sua fina espessura, os substratos e produtos difundem-se mais rapidamente [51,55]

Polímeros não-condutores formados, a partir de diaminobenzenos e dihidroxibenzenos mostraram-se eficientes na construção de biossensores enzimáticos [56, 57].

A formação de filmes poliméricos pode ser viabilizada por vários métodos, sendo a síntese química preferencial [58,59,60,61] e a eletropolimerização mais relatada [62,63].

1.7 Eletropolimerização

O mecanismo de polimerização mais aceito [62,64,65] propõe a oxidação do monômero, produzindo um cátion-radical, seguido do acoplamento de dois cátions radicais, com desprotonação e reconstituição do sistema aromático, conforme pode ser observado na Figura 5. A continuidade da reação ocorre com acoplamento de cátions radicais do monômero e cátions radicais dos oligômeros que se formam.

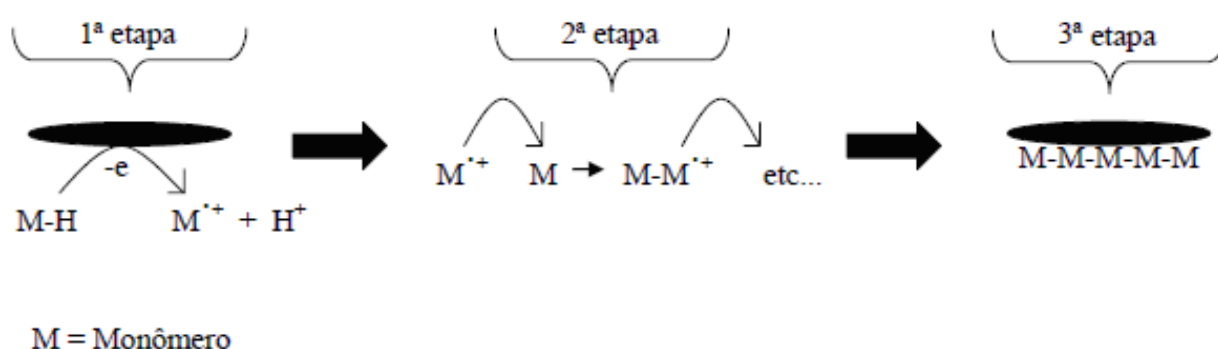


Figura 5: Esquema geral de eletropolimerização [64].

A estabilidade do cátion radical do monômero é um dos fatores determinantes para obtenção de um polímero com elevado grau de conjugação. Um cátion radical muito estável pode difundir do eletrodo dando origem a oligômeros solúveis, enquanto que um muito reativo pode sofrer reações colaterais. As propriedades elétricas e físico-químicas do material eletrossintetizado dependem fortemente das condições de síntese, tais como: concentração do monômero, natureza do meio eletrolítico e temperatura [66]. A síntese eletroquímica de monômeros pode ser feita por diferentes técnicas,

como a voltametria cíclica, a potenciostática, ou ainda a galvonostática, em que os produtos da reação no eletrodo são poliméricos e insolúveis no solvente usado, podendo proporcionar ao eletrodo propriedades elétricas e analíticas interessantes.

Vários eletrodos quimicamente modificados (EQM) estão sendo aplicados a eletroanálise, dentre os materiais convencionais estão o ouro, platina, grafite, carbono vítreo e pasta de carbono. Carbono vítreo reticulado, fibras de carbono, material plástico condutor e vidros condutores como óxido de estanho dopado com índio (ITO) e o óxido de estanho dopado com flúor (FTO) estão incluídos entre os substratos menos usuais [67].

O Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia já explorou eletropolimerizações sobre eletrodos de platina, ouro, carbono vítreo e grafite, todavia o FTO, até este momento, havia sido testado em pequena escala.

1.8 Óxido de Estanho IV

Óxido de estanho IV (SnO_2), conhecido como cassiterita, é a forma mais comum em que se encontra o estanho (Sn) na natureza. Este material é um semicondutor natural do tipo-n, com um gap de energia largo, com aproximadamente 3,6 eV, apresentando sua estrutura cristalina tetragonal, grupo espacial $P4_2/mnm$, cujos parâmetros de célula unitária são: $a = 4,737 \text{ \AA}$ e $c = 3,186 \text{ \AA}$ [68].

O SnO_2 tem a mesma estrutura de octaedro que o SnO_6 , em que quatro das ligações Sn-O estão separadas a 0,205 nm enquanto as outras duas ligações são de 0,206 nm. O SnO_2 tem duas moléculas por célula unitária (Figura 6), com as posições definidas abaixo:

Sn	(2 átomos)	em	(0 , 0 , 0)	e	(½ , ½ , ½)
O	(4 átomos)	em	+/- (u , -u , 0)	e	+/- (u+ ½ , ½ -u , ½)

Onde $u = 0,307\text{nm}$

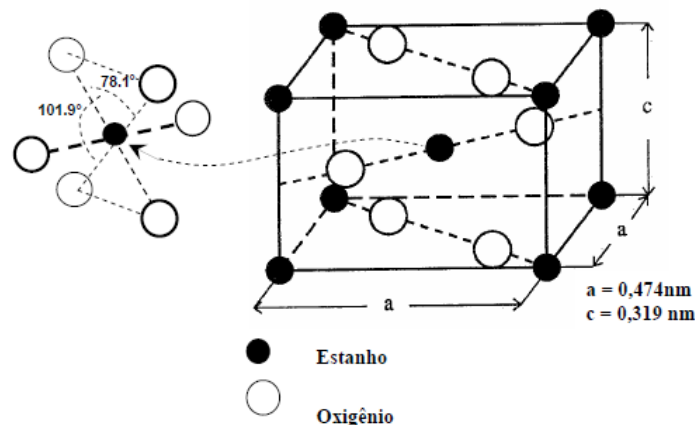


Figura 6: Estrutura Cristalina do SnO_2

Os ângulos entre o átomo central de Sn e os quatro átomos de oxigênio que estão a $2,05 \text{ \AA}$ são 78.1° e $101,9^\circ$. Em uma amostra de SnO_2 , aproximadamente metade de todos os cátions Sn^{+4} está pentacoordenada com os íons O^{-2} do plano, enquanto a outra metade está hexacoordenada com os íons O^{-2} ligados em ponte. Todos esses íons O^{-2} ligados em ponte e mesmo alguns do plano podem ser removíveis ou substituídos para dopagem [70].

Dopar o SnO_2 é uma técnica muito utilizada, principalmente para que haja um aumento da condutividade dos filmes finos. Devido à similaridade entre os raios iônicos do F^- e do O_2^- ($\text{F}^- = 0,117 \text{ nm}$ e $\text{O}_2^- = 0,122 \text{ nm}$), o flúor pode substituir o oxigênio produzindo um nível de impureza raso no SnO_2 , configurando o $\text{SnO}_2:\text{F}$ (FTO). Geralmente a dopagem é usada no intuito de diminuir a resistividade dos filmes, que pode passar de 10^{-3} para até $10^{-4} \Omega\cdot\text{cm}$.

Muito utilizado como filme fino em substratos de vidro, o $\text{SnO}_2:\text{F}$ tem como suas principais características: boa condutividade elétrica; alta transparência (acima de 80% em média e até maior que 90% para certas dopagens) à radiação eletromagnética no visível; alta reflexão à radiação infravermelha; praticamente inerte quimicamente; além de uma boa reprodutibilidade e aderência ao vidro, possuindo uma elevada temperatura de fusão ($>1930^\circ\text{C}$) [70].

Em função destas propriedades, os óxidos têm sido reconhecidos como materiais promissores e apresentam um diversificado número de aplicações

tecnológicas, como por exemplo, na produção de células solares [69] e de sensores óticos, sendo amplamente utilizados na tecnologia de sensores de gás [70].

Óxido de estanho dopado com flúor (FTO) e óxido de estanho e índio (ITO) depositados em superfícies vítreas vem sendo modificados com filmes poliméricos, para uso na construção de sensores e biossensores, atuando como transdutores ópticos e eletroquímicos [71,72,73,74].

Neste contexto, para a produção de imunossensores utiliza-se normalmente a especificidade entre antígenos e anticorpos, cuja constante de afinidade está na ordem de 10^4 a 10^{12} mol.L⁻¹. Pelo fato destas proteínas serem inertes eletroquimicamente, técnicas como a espectroscopia de impedância e a fotoluminescência passam a ser interessantes no desenvolvimento de imunossensores com detecção direta livres de marcadores "*label free*" e imunossensores com marcadores "*label*" com detecção indireta de fluoróforos, respectivamente.

1.9 Imunossensores impedimétricos livres de marcadores "*label free*"

Nos imunossensores impedimétricos, a transdução do sinal biológico é realizada através de medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). Medidas de impedância não requerem reagentes especiais e é receptiva para operação "*label free*" [75].

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) é uma das técnicas mais poderosas e sensíveis para investigação das propriedades elétricas da superfície de eletrodos modificados. Vários tipos de imunossensores, com detecção por medidas de EIE, têm sido desenvolvidos e descritos na literatura [76,77]. Estes imunossensores são baseados em mudanças das propriedades elétricas resultantes da interação antígeno/anticorpo sobre a superfície dos eletrodos. É uma técnica não-destrutiva e informativa na qual pode ser usada para estudar as propriedades elétricas da interface do dispositivo sensível e investigar as reações que ocorrem nele [78,79].

Entretanto, um problema normalmente encontrado na EIE é a dificuldade em determinar o significado físico da resposta no domínio das frequências, frente ao sistema investigado [80].

A EIE tem ampla aplicação na área de caracterização dos materiais, sendo utilizada rotineiramente na caracterização de: revestimentos modificadores de superfície, pilhas, células combustíveis, fenômenos de corrosão, eletrocatalise heterogênea, dentre outras. Também tem sido extensivamente utilizada como ferramenta para estudar mecanismos em eletrodeposição, eletrodissolução, passividade, corrosão, difusão de íons através de membranas, estudos de interface de semicondutores e biossensores.

A EIE fornece informações importantes relativas às características eletroquímicas de um sistema, como capacitância da dupla camada, resistência de transferência de carga, impedância de difusão e resistência da solução. Também consiste num método eficiente para avaliar a velocidade de transferência eletrônica no eletrodo quando na presença de espécies redox em solução. A técnica de EIE é uma ferramenta que pode prever a maneira como o revestimento dos eletrodos se comportará com o tempo, em relação a processos corrosivos ou outros processos [78].

Nosso grupo de pesquisa tem utilizado esta técnica como ferramenta para efetuar detecções em sistemas de DNA [81,82] e para monitorar interações entre antígenos e anticorpos [66, 83] em plataformas de grafite modificadas. Neste trabalho, esta técnica será utilizada para plataforma de FTO modificada com poli(3-aminofenol). Informações mais detalhadas sobre a técnica de EIE estão dispostas nesta seção, item 1.11.

1.10 Imunossensores com marcadores "label"

Em geral, o antígeno e o anticorpo são espécies eletroquimicamente inertes e, portanto, o imunossensor pode requerer um marcador que viabilizará o monitoramento da reação de afinidade, ou seja, o anticorpo ou o antígeno deve ser marcado, constituindo então o conjugado. Os primeiros imunoensaios empregavam marcadores radioativos, mas a restrição quanto ao emprego de

radioisótopos conduziu ao desenvolvimento de ensaios com compostos fluorescentes ou enzimas, sendo o ELISA amplamente utilizado em análises clínicas e biológicas.

Estes marcadores são utilizados em diversas técnicas voltadas para sensores biológicos, como a eletroquímica, fotoeletroquímica e óptica. Nestas duas últimas, muitos fluoróforos vêm sendo empregados na construção de biossensores, como a cianina [84], rodamina [85] e o alexa flúor [86], mas com a inserção da nanotecnologia, os pontos quânticos vêm recebendo atenção especial dos pesquisadores em todo o mundo [87].

Pontos quânticos ou quantum dots (QDs) são nanopartículas de semicondutores em escala nanométrica (ideal 2 – 6 nm de diâmetro) que apresentam propriedades ópticas extraordinárias, como por exemplo, amplo espectro de absorção, estreito e simétrico espectro de emissão, elevada fotoestabilidade e tempo de decaimento [88].

As propriedades fotofísicas excepcionais ocorrem devido ao confinamento quântico que, por sua vez, é ocasionado em função da forte compactação atômica durante a síntese do material, tornando-o condensado e geralmente com diâmetros inferiores a 10nm.

Nesta escala, as nanopartículas são de grande interesse, devido às suas dimensões serem semelhantes às de macromoléculas biológicas (por exemplo, DNA e proteínas), ou seja, os pontos quânticos são suficientemente grandes para serem combinados com diferentes moléculas e suficientemente pequenos para serem introduzidos dentro das células [89].

Na escala nanométrica, pontos quânticos formados de mesmo material, por exemplo, o seleneto de cádmio (CdSe), podem emitir em amplo espectro de cores em função exclusiva da variação do seu tamanho (Figura 7).



Figura 7: Quantum dots de CdSe produzidos pela Evident Technologies [90].

As propriedades ópticas dos QDs levaram a construção de vários biossensores, por exemplo, para análise de hepatites B e C [91][92], câncer [93], botulismo [94] e câncer de mama [95], cujas detecções normalmente são por fotoluminescência (PL), ou seja, medidas das quantidades de fótons emitidos pelos QDs quando o elétron retorna da banda de condução para a banda de valência, proporcionais a concentração do alvo. Informações mais detalhadas sobre a técnica de PL estão dispostas nesta seção, item 1.11.

Nosso grupo de pesquisa ainda não havia trabalhado com detecções ópticas, sendo este trabalho o pioneiro no grupo em função da fotoluminescência, inclusive na exploração dos quantum dots, que embora seja um dos mais promissores materiais da era da nanotecnologia, possuem a desvantagem de ser extremamente caros, sendo que o preço do grama está ao redor de US\$2.000,00, ou seja, US\$/Kg é de aproximadamente 2 milhões, o que os torna um dos materiais mais caros do mundo, mais caros até do que os nanotubos de carbono [96].

Os pontos quânticos podem ser sintetizados ou adquiridos comercialmente de empresas especializadas como, por exemplo, a Invitrogen [97] e a Evident Technologies [90].

1.11 Técnicas de análise, experimentos de caracterização e detecção

Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (VC) requer um gerador de ondas para produzir o sinal de excitação, um potenciostato para aplicar esse sinal a uma célula eletroquímica, um conversor de corrente / voltagem para medir a corrente resultante e um registrador tipo X-Y para o registro dos voltamogramas ou um software específico que tenha a mesma função. Na voltametria cíclica aplica-se uma varredura linear num intervalo de potenciais a uma velocidade constante, portanto há uma variação constante do potencial com o tempo e observa-se a variação de corrente em função do potencial [98]. A voltametria é denominada cíclica, pois esta varredura linear é repetida várias vezes, partindo do potencial

inicial, indo para o potencial final e retornando ao potencial inicial e assim sucessivamente.

Espectroscopia de impedância eletroquímica

A EIE mede a resposta (corrente e sua fase) de um sistema eletroquímico a um potencial de oscilação aplicado em diferentes frequências sobre um potencial de circuito aberto (d.c).

A técnica tem como base a aplicação de um potencial ou corrente alternada, sendo uma delas a variável controlada, medindo-se a intensidade e diferença de fase da outra variável.

O espectro de impedância inclui uma porção de semicírculo a altas frequências, correspondendo ao processo limitante de transferência eletrônica e uma porção linear a baixas frequências, resultando da etapa limitante de difusão do processo eletroquímico, conforme Figura 8. O diâmetro do semicírculo exibe a magnitude da resistência à transferência de carga (R_{ct}) da camada a qual mostra seu comportamento isolante para o par redox. Assim, o diâmetro pode ser usado para descrever as propriedades de interface do eletrodo e seu valor crescente caracteriza exatamente a imobilização para cada etapa [99].

O outro parâmetro, disponível em imunossensores impedimétricos, é a capacitância, onde um decréscimo da capacitância total, devido ao aumento da distância entre as placas é assim esperado sobre a ligação do analito ao seu receptor específico [100].

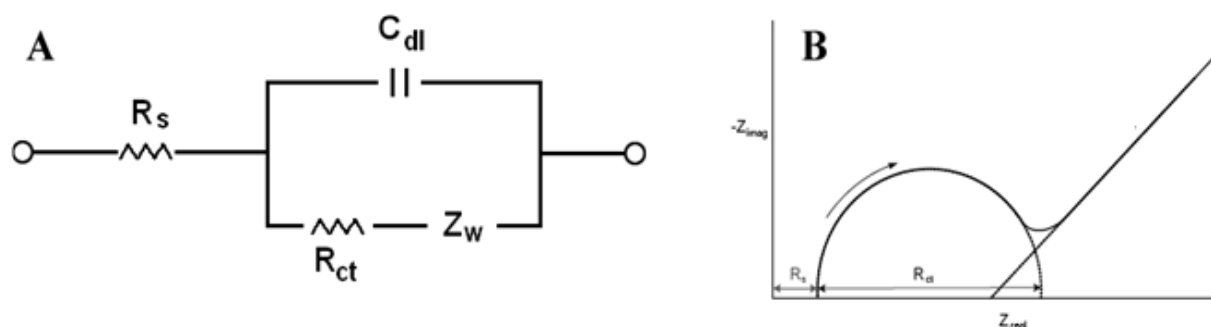


Figura 8: (A) Circuito equivalente de Randles para um sistema eletroquímico simples (B) Gráfico de Nyquist proveniente do circuito Randles mostrado em A.

Na figura 8: C_{dl} é a capacitância da dupla camada elétrica; R_s é a resistência total da solução e ZW é impedância de Warburg, que descreve a difusão linear semi-infinita. Se o analito afeta um ou mais desses parâmetros do circuito equivalente e esses parâmetros não são afetados por espécies interferentes, então o método de impedância pode ser usado para a detecção do analito. R_s surge primeiramente da resistência do eletrólito e é analiticamente útil, principalmente nos sensores de condutividade. A impedância de Warburg, a qual pode ser usada para medir efetivamente os coeficientes de difusão, é raramente usada para aplicações analíticas. Os elementos do circuito equivalente na Figura 8, que são normalmente usados para detecção de analito, são R_{ct} e C_{dl} . As medidas de capacitância normalmente surgem de uma série de combinações de vários elementos tais como ligação do analito a uma camada sensível sobre o eletrodo [101].

Espectroscopia de Fluorescência

A técnica de espectroscopia de fluorescência (EF) permite a identificação de amostras, sendo realizada uma análise química, que pode ser qualitativa e quantitativa. O sinal de fluorescência geralmente é analisado em soluções, todavia o rendimento quântico de fluorescência também pode ser medido em polímeros no estado sólido [102]. Este sinal ocorre, pois a energia que a molécula ganha na absorção de fótons pode ser perdida por vários mecanismos, e a emissão desta radiação por fluorescência é um deles, sendo que o processo normalmente ocorre em um intervalo de tempo de $0,00001$ s. A outra parte da energia recebida pela molécula normalmente é degradada por calor, contribuindo para o abaixando da energia molecular no momento em que a molécula volta ao nível fundamental [103].

Espectroscopia de Infra-Vermelho

Pela técnica de Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) a radiação infravermelha na faixa de 10000 a 100 cm^{-1} , quando

absorvida, converte-se em energia de vibração molecular [104]. Assim tem-se a leitura do número de onda (cm^{-1}), característico de cada ligação. Desta forma, é possível caracterizar a amostra em questão, obtendo a estrutura de uma substância desconhecida, através da comparação com espectros da literatura e análise de frequências características tabeladas [105], sendo a faixa de radiação de importância no espectro de infravermelho são as bandas de vibração-rotação que ocorrem entre 4000 e 400 cm^{-1} . O movimento dos átomos que constituem as moléculas resulta em rotações e vibrações moleculares. Consequentemente, além das transições entre níveis eletrônicos, deve-se levar em consideração também as transições devidas às rotações e vibrações. Todavia, como as energias envolvidas nas diferentes formas de rotação são muito semelhantes ($5 \times 10^{-5} \text{ eV}$), apenas as vibrações são geralmente consideradas.

Basicamente, as vibrações moleculares podem ser classificadas em dois tipos: vibrações de deformação axial (stretching) e deformação angular (bending). As deformações axiais, ou estiramento são oscilações radiais das distâncias entre os núcleos enquanto as deformações angulares envolvem mudanças nos ângulos entre as ligações ou, como o modo de deformação assimétrica fora do plano, alterações do ângulo entre o plano que contém as ligações e um plano de referência [106].

Espectroscopia de Ultra-Violeta

Espectrofotometria de ultra-violeta (UV/Vis) é uma das técnicas analíticas mais empregadas, em função de robustez, custo relativamente baixo e grande número de aplicações desenvolvidas [107].

Um espectrofotômetro deve conter um monocromador, uma fonte de radiação, um detector e meios eletrônicos para a apresentação dos dados apropriadamente. O monocromador permite selecionar faixas espectrais muito estreitas (alguns nm) e composto de fenda de entrada, lente colimadora, elemento de disposição, lente de foco e fenda de saída [108].

Na técnica de Espectroscopia de UV/Vis a fonte de radiação excita os átomos do estado fundamental para o estado excitado (fótons). Há conversão de energia radiante em energia elétrica que é medida e assim obtém-se o espectro de absorção da amostra analisada.

Normalmente as análises de UV/Vis são realizadas em soluções, todavia também podem ser realizadas medidas em fase sólida inclusive com incremento de sensibilidade [108].

Microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo

A microscopia eletrônica de varredura (SEM) é uma técnica versátil e não destrutiva, que revela informações detalhadas sobre a aparência tridimensional característica, e são úteis para avaliar a estrutura superficial de uma dada amostra.

Seu funcionamento baseia-se na incidência de um feixe fino de elétrons de alta energia na superfície da amostra, ocorrendo à interação, onde parte do feixe é refletida e parte é coletada por um detector, que converte este sinal em imagem de elétrons retroespalhados. Nesta interação, a amostra emite elétrons, produzindo a chamada imagem de elétrons secundários [109]. A razão principal de sua utilização está associada à alta resolução que pode ser atingida, atualmente da ordem de 300 mil vezes melhor que a do microscópio óptico (MO), resultando em imagens com aparência tridimensional. Enquanto, que no foco MO, a profundidade de foco decresce sensivelmente para aumentos crescentes, com o SEM, qualquer superfície boa condutora elétrica e estável em vácuo pode ser analisada com boa profundidade de foco. Caso contrário em materiais não condutores é necessário uma cobertura com uma fina camada de material condutor, por exemplo, ouro [110,111]. Na microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo (FE-SEM) a aplicação de um campo elétrico local aumenta a probabilidade dos elétrons tunelarem do sólido para o ultra-vácuo, isto proporciona altas resoluções gráficas exigentes no campo da nanotecnologia [112].

Microscopia de força atômica

A microscopia de força atômica (AFM) é a mais versátil integrante da família das microscopias de sonda e seu grande diferencial é a visualização dos objetos em três dimensões. A AFM utiliza um microscópio composto basicamente por uma ponta (ou sonda) que varre a superfície da amostra em estudo. Assim mede-se a força de interação entre os átomos da ponta e os da superfície, e os resultados são transformados em imagens da amostra, através de recursos computacionais [113].

São várias as forças envolvidas nessa varredura, mas fundamentalmente resumem-se em dois tipos: as de atração e as de repulsão. As primeiras são chamadas de forças de van der Waals, cuja origem é química e atuam a distâncias que variam de 100nm a algumas unidades dessa escala. Já as forças repulsivas agem quando a ponta entra em contato com a superfície e têm sua origem no princípio de exclusão de Pauli, que em termos práticos impede que dois corpos ocupem o mesmo lugar no espaço [113].

A ponta ou (sonda) é suportada por um braço de apoio, chamado de cantilever. Nesse braço, incide a luz de um laser, que se reflete na superfície do cantilever, indo para um espelho e finalmente alcança um fotodetector de quatro secções. O fotodetector mede as deflexões do braço, causadas pelas rugosidades da amostra quando ela é varrida pela ponteira. Os resultados dessas medidas são transferidos para um computador que, utilizando um software especificamente feito para isso, transforma a informação em uma imagem da superfície. Com este tipo de microscopia, pode-se estudar a topografia e as propriedades mecânicas de superfícies [113].

Caracterização de troca iônica

O termo eletrodo quimicamente modificado (EQM) foi introduzido no jargão eletroquímico por Murray e colaboradores em 1975 para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas, deliberadamente imobilizadas em

suas superfícies, com o objetivo de pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução.

Vários métodos de imobilização do modificador são reportados, como adsorção, formação de compósitos, formação de ligações covalentes, recobrimento de membranas (filmes) poliméricas que devem ser condutores ou permeáveis ao eletrólito de suporte e à espécie de interesse. Dependendo da aplicação pode ser escolhido um polímero quimicamente ativo que tenha propriedades ligantes ou de troca iônica.

A caracterização de troca iônica do (EQM) pode fornecer informações importantes em relação à estrutura do modificador, como por exemplo, a distribuição de cargas em sua superfície. Algumas sondas são reportadas na literatura derivadas de complexos orgânicos, como os ferrocenos, ftalocianinas, compostos de rutênio e metaloporfirinas [67].

Interferometria a Laser

Normalmente as superfícies, por mais perfeitas que sejam, apresentam irregularidades, que podem ser classificadas em dois grupos: as macrogeométricas e as microgeométricas. As irregularidades macrogeométricas são provenientes da "forma", que inclui divergências de ondulações, ovalizações, reticidade, planicidade, circularidade etc. Já as irregularidades microgeométricas são provenientes da "rugosidade", que pode ser calculada dividindo o número de picos pelo número de vales.

Existem dois métodos para medir a topografia de uma superfície: o apalpamento e a reflexão ótica, sendo que esta última é aplicada na interferometria a laser (IL) configurando um dos métodos mais utilizados sem necessitar do contato com a amostra, ou seja, é um método não destrutivo.

Um esquema representado na Figura 9 mostra um perfilômetro óptico interferométrico.

Nesta técnica, a luz refletida da superfície sendo medida interfere com a luz refletida da superfície de referência. Variações verticais da superfície (rugosidade) da ordem de 1nm são possíveis de serem percebidas pela medição

da diferença de fase entre os feixes de referência e de medição. Isto é feito através da detecção da variação da intensidade do padrão de franjas detectada por cada fotossensor, quando a lente objetiva e o plano de referência são deslocados verticalmente por um transdutor piezoelétrico em relação à superfície de medição que permanece fixa. Com uma análise computacional apropriada isto pode ser utilizado para caracterizar uma superfície [114].

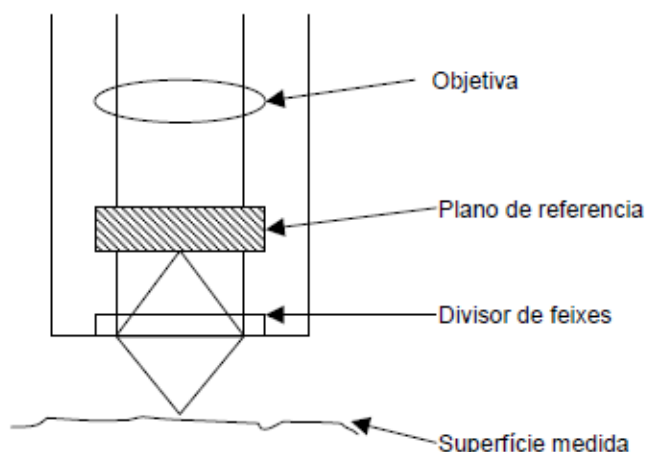


Figura 9: Esquema representativo de um perfilômetro de Mireau.

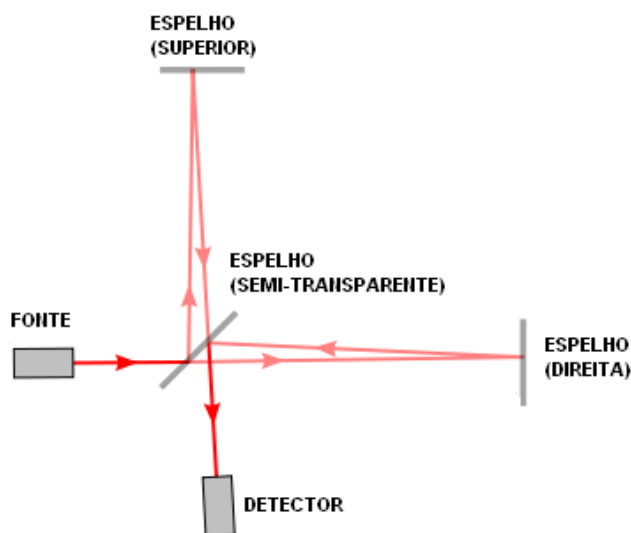


Figura 10: Esquema representativo de um interferômetro de Michelson.

Na detecção, o feixe de luz atravessa um espelho semi-transparente, que por sua vez, faz com que o feixe incidente seja dividido em dois: uma parte da luz atravessa o divisor de feixe até o espelho a direita (Figura 10), é refletido de

volta para o espelho semi-transparente e então refletido para o detector; a outra parte é refletida pelo espelho semi-transparente até o espelho superior, então é novamente refletida passando através do espelho semi-transparente até o detector.

Quando os dois componentes são recombinados, existe uma diferença de fase entre eles já que eles percorreram caminhos diferentes, e então eles interferem construtivamente ou destrutivamente dependendo do tamanho da diferença de caminho. Se os dois caminhos percorridos diferirem por um número inteiro de comprimento de onda (incluindo 0) ocorre uma interferência construtiva e um sinal forte no detector. Se eles diferirem por um número inteiro e meio (por exemplo, 0,5, 1,5, 2,5...) ocorre uma interferência destrutiva e um sinal fraco [115].

Propriedades elétricas

As medidas elétricas consistem da investigação do processo de injeção e transporte de cargas nas amostras, determinando-se o comportamento da corrente elétrica (I) em relação ao potencial (V). O processo de condução em dispositivos pode ser determinado pelo material semicondutor ao invés da injeção pelos contatos. Considerando um material com baixos níveis de aprisionamento de cargas e uma mobilidade de portadores de carga independente do campo aplicado, a densidade de corrente é dada pela equação (1), sendo que se a $\partial V/\partial J$ for constante, o contato é ôhmico.

$$J = q n_0 \mu E = q n_0 \mu V/d \quad (1)$$

Onde,

J = densidade de corrente (razão entre a corrente e a área) ; q = carga do portador ; n_0 = densidade de cargas livres ; V = tensão aplicada ; μ = mobilidade ; E = campo elétrico ; d = espessura do filme.

A carga espacial é geralmente entendida como sendo uma região preenchida por cargas positivas ou negativas. Por exemplo, se o contato negativo do dispositivo (cátodo) emite mais elétrons por segundo do que o material semicondutor pode aceitar, o excesso formará uma região de carga espacial negativa dentro do material. Esse acúmulo de cargas criará um campo elétrico que dificultará a injeção de elétrons pelo cátodo. Assim, a corrente de elétrons é dita limitada por carga espacial. Analogamente, a corrente de buracos pode ser limitada pela presença de cargas espaciais formadas por portadores positivos [116].

Imobilização por Adsorção Física

A adsorção física da biomolécula baseia-se na formação de forças atrativas de van der Waals, ligações iônicas e de hidrogênio entre as biomoléculas e o eletrodo. Este método não exige qualquer modificação química e possui a vantagem da simplicidade, requerendo apenas uma solução contendo a biomolécula a utilizar. Todavia, poderá ocorrer uma perda da biomolécula adsorvida se ocorrem alterações do meio durante as medições como, por exemplo, variações de pH, força iônica ou até mesmo temperatura [117].

Imobilização por ligação covalente via carbodiimida

Carbodiimidas são utilizadas para mediar a formação de ligações amida entre carboxilatos e aminas ou ligações fosforamidas entre os fosfatos e aminas. Eles são, provavelmente, o mais popular tipo de mediador em uso, sendo eficaz na formação de conjugados entre duas moléculas de proteína, entre um peptídeo e uma proteína, entre um oligonucleotídeo e uma proteína, entre uma biomolécula e uma superfície, ou qualquer combinação destas. As carbodiimidas podem ser insolúveis ou solúveis em água, sendo estas últimas escolhidas preferencialmente para conjugações bioquímicas, porque a maioria das macromoléculas biológicas são solúveis em soluções tampão aquosas,

sendo que o subproduto gerado, uma isouréia, também é solúvel em meio aquoso, facilitando a purificação por diálise ou filtração em gel.

Cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) é a carbodiimida mais usada para conjugar substâncias biológicas contendo carboxilatos e aminas. A sua aplicação nos procedimentos de conjugação entre biomolécula e superfície com o NHS (N-hidroxissuccinimida) ou sulfo-NHS (N-hidroxissuccinimida sulfonada) é quase universal e este fato torna esta bioconjugação uma das mais usadas atualmente [118].

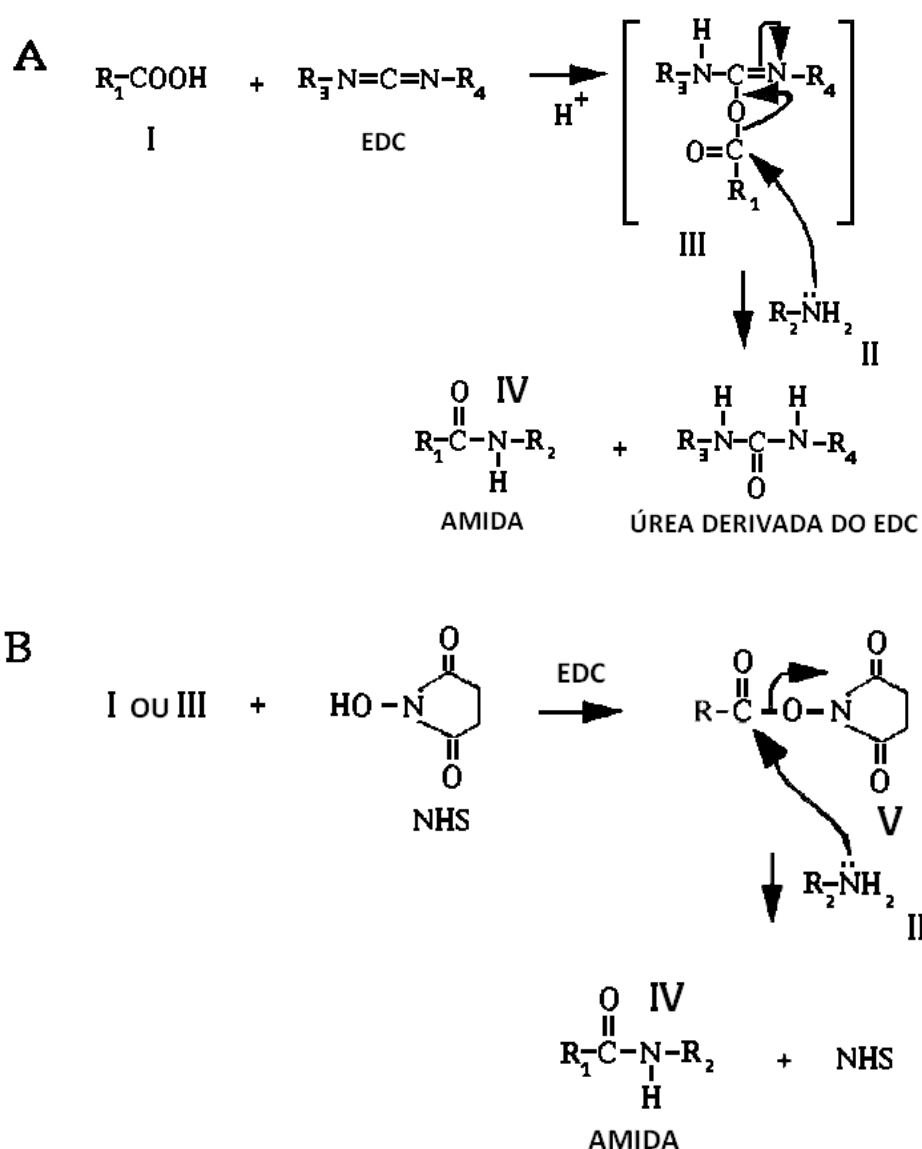


Figura 11: Mecanismo de bioconjugação por ligação de amida. (A) mediado por EDC (B) mediado por EDC com assistência de NHS [119].

A vantagem da adição de NHS ou sulfo-NHS nas reações de EDC é o aumento da solubilidade e estabilidade do intermediário ativo que é atacado pela amina na última etapa da reação (Figura 11). Na Figura 11A o EDC reage com um grupo carboxilato (I) para formar um éster mais reativo, o-acil isoUréia (III). Todavia, o ataque da amina neste complexo intermediário é lento e pode hidrolisar em soluções aquosas (especialmente quando a molécula-alvo está em baixa concentração em relação à água, como no caso de moléculas de proteínas) e o acoplamento desejado pode não ocorrer. A assistência do NHS (Figura 12B) proporciona a formação de um anidrido do acil isoUréia, um éster intermediário bastante reativo que aumenta o rendimento de formação da ligação amida [119].

Biotinilação de Proteínas (Anticorpos)

A Biotina é um componente fundamental em inúmeros processos vitais envolvendo reações de carboxilação, funcionando como um co-fator e transportador de CO₂ (coenzima R). A biotina é encontrada principalmente ligada covalentemente à lisina através da sua cadeia de ácido valérico.

A interação da biotina com proteínas contendo estreptavidina ou avidina está entre as mais fortes afinidades não covalentes conhecidas ($K_a = 10^{15}$ mol.L⁻¹). A ligação ocorre entre o anel bicíclico de biotina, sendo que a porção de ácido valérico não é diretamente envolvida na interação com avidina e estreptavidina, ou seja, esta característica permite modificar a cadeia de ácido valérico, sem afetar o potencial de ligação com a avidina ou estreptavidina.

O carboxilato de ácido valérico da D-biotina pode ser ativado a um éster do NHS, para modificação direta de grupos amina em proteínas e outras moléculas (Figura 12). O grupamento amina de uma biomolécula funciona como um nucleófilo atacando ésteres-NHS liberando o grupo NHS e formando uma ligação amida estável. NHS-biotina é o reagente mais simples para reações de biotinilação realizada sob condições levemente alcalinas, proporcionando altos rendimentos reacionais [118].

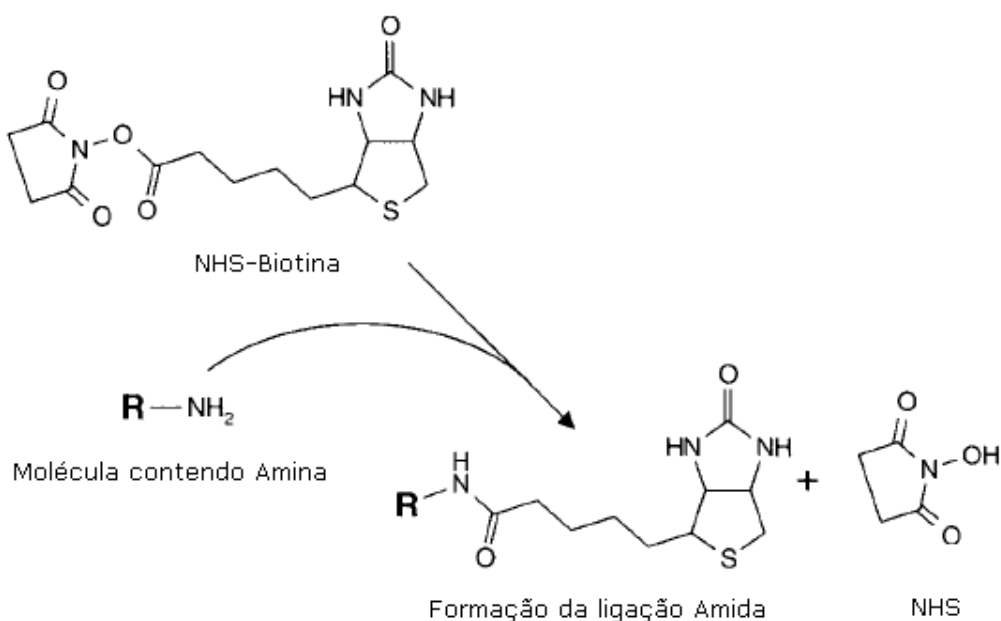


Figura 12: Mecanismo geral de biotinilação de proteínas.

"Dot Blot"

Um "dot blot" (ou slot blot) é uma técnica que pode ser usada na biologia molecular e na imun química para detecção de biomoléculas normalmente em plataformas constituídas de membrana de nitrocelulose (Figura 13).

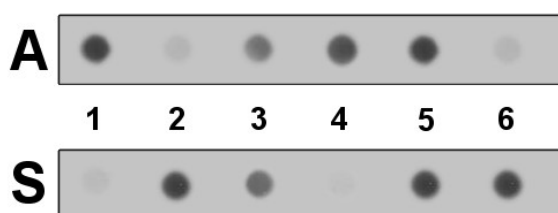


Figura 13: Esquema de "dot blot" usando o "A" ou "S" oligonucleotídeo alelo-específico.

A técnica de "dot blot" oferece uma possibilidade real em curto tempo de confirmar a presença ou ausência de uma biomolécula como, por exemplo, para detecção de anticorpos anti HIV [120,121], herpes [122] e algumas drogas [123].

Fotoluminescência

O processo de emissão espontânea em um semiconductor ocorre em quatro etapas: excitação, relaxação, termalização e recombinação. A excitação é a incidência de luz com energia maior que o “gap” de um semiconductor, que cria pares elétron-buraco mediante a promoção de elétrons de seus estados fundamentais na BV, para níveis desocupados na BC. Em seguida, ocorre a relaxação, na qual o excesso de energia adquirido pelos portadores é cedido à rede cristalina por emissão de fônons. Com a termalização que ocorre em seguida, os pares elétron-buraco tendem a ocupar os estados de mais baixa energia possível das bandas. Depois de um intervalo de tempo que é, em geral, extremamente curto (entre 10^{-9} e 10^{-12} segundos), o elétron retorna para seu nível fundamental, recombina com o buraco, e a recombinação radiativa gera um fóton (luz). É nesse processo geral que se baseia a técnica de fotoluminescência. A emissão espontânea de poços quânticos semicondutores é produzida mediante o mesmo processo. No entanto, como o nível fundamental para o elétron é o primeiro nível de energia do poço na banda de condução, e para o buraco é o primeiro nível de energia do poço na banda de valência, a recombinação ocorre quando os portadores relaxam para estes níveis de energia fundamentais. O confinamento do elétron e do buraco em uma região espacialmente restringida aumenta a interação entre eles via força de Coulomb, reduzindo ainda mais a energia de emissão (Figura 14).

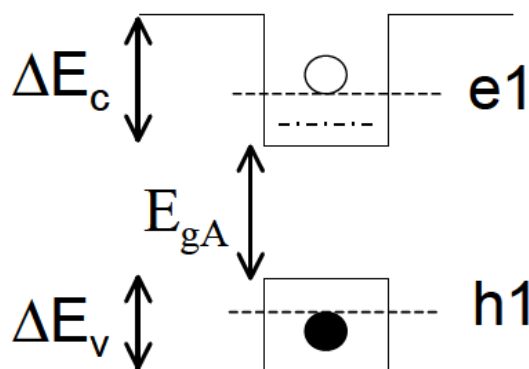


Figura 14: Forma do potencial em uma estrutura tipo poço quântico.

O par elétron-buraco ligado via interação Coulombiana é conhecido como éxciton. Estudos experimentais indicam que a emissão espontânea de poços quânticos semicondutores de boa qualidade tem natureza essencialmente excitônica até mesmo a temperatura ambiente [124].

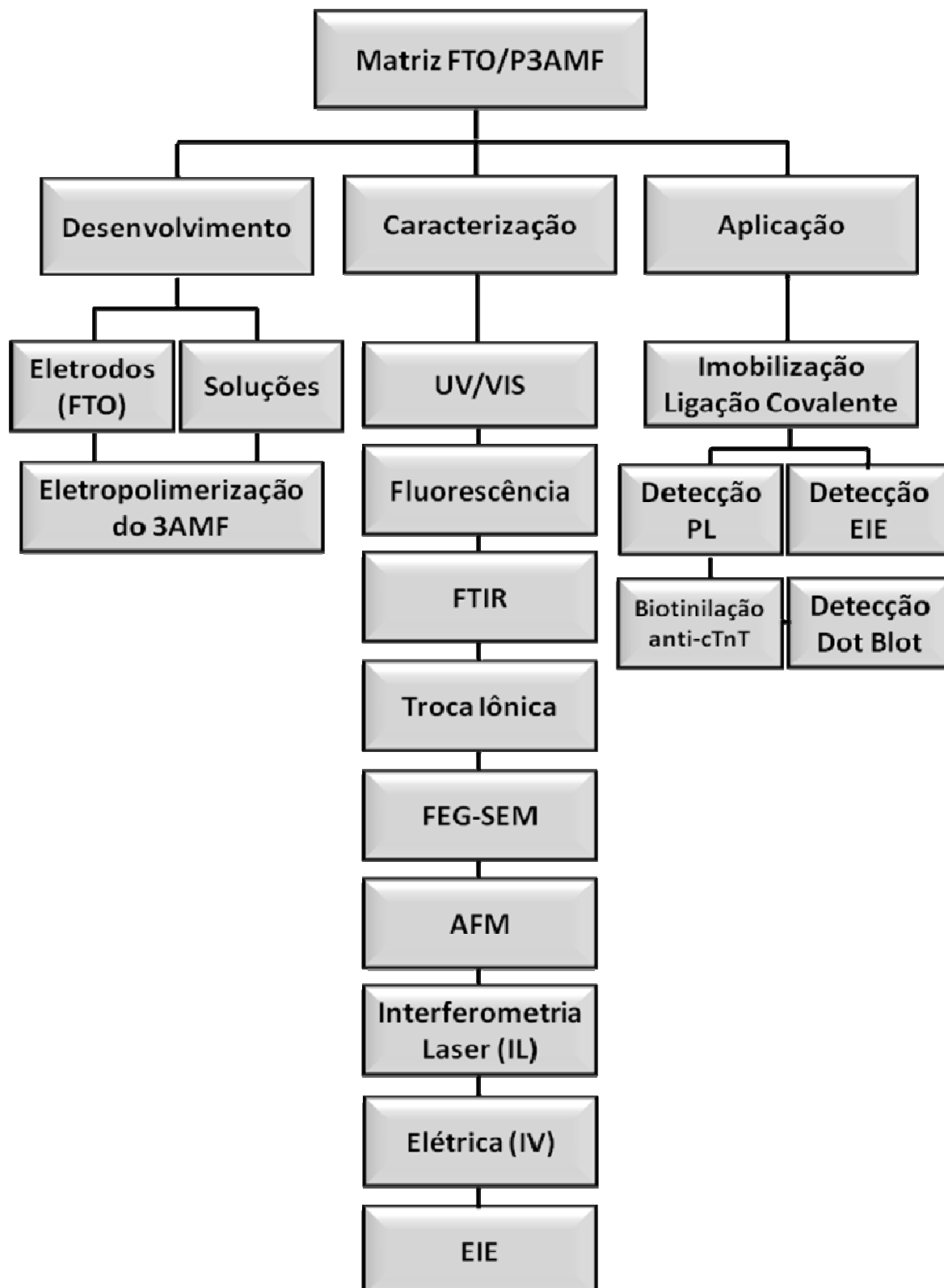
2 – Objetivos

Devido à necessidade do desenvolvimento de plataformas diagnósticas para a detecção de marcador de lesão cardíaca, propomos nesse trabalho a construção de biossensores baseados na imobilização de anticorpos em superfície de FTO modificada com filmes poliméricos derivados de aminofenóis. Desta forma os pontos a serem trabalhados são descritos, abaixo:

- Eletropolimerização de um derivado de aminofenol em eletrodo vítreo de FTO;
- Caracterização química, física, eletroquímica e morfológica do material eletrodepositado;
- Imobilização do anti-troponina T na matriz FTO modificado com poli(3-aminofenol) FTO/P3AMF;
- Modificação do anti-troponina T com biotina;
- Detecção do troponina T direta por EIE "*label free*" e indireta por fotoluminescência (PL) de quantum dots "*label*";
- Estudo de seletividade do biossensor (interferente anti-troponina I – disponível em amostra real de soro sanguíneo de pacientes com lesão cardíaca).

3 - Procedimento experimental

3.1 Fluxograma do procedimento experimental



3.2 Equipamentos, Materiais e Reagentes

3.2.1 Equipamentos

Aagitador magnético 702A Fisatom

Balança analítica Shimadzu d=0,1 mg / 0,01 mg

Bomba de vácuo 48/56 KOHLBACH

Centrífuga mod 5804R Eppendorf

Espectrômetro iHR, marca Horiba - Jobin Yvon

Espectrofotômetro ultra-visível 1650PC Shimadzu

Estufas de hibridação, Hybaid

Filtro passa banda Schott GG-495

Fluorímetro F-4500 Hitachi

Fonte IV programável E3646A Agilent

Fotomultiplicadora UV VIS Horiba - Jobin Yvon, modelo DPM-HV

Infra-Vermelho Perking Elmer spectrum 1000

Interferômetro laser UBM microfocus expert IV UBM

Laser de diodo 405nm 5mW

Microscópio de força atômica Veeco Innova

Microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo Supra 40 Zeiss

Microscópio metalográfico Olympus BX51

Paquímetro

pHmetro digital PG1800 Gehaka

Potenciostato AUTOLAB system model PGSTAT302N mod FRA2 Eco Chemie BV

Potenciostato model 420A CH Instruments

Ultra purificador microprocessado Master System Gehaka

Ultrasonic cleaner USC 1450 Unique

3.2.2 Materiais

Cela eletroquímica de três compartimentos

Cortador de Vidro

Dessecador a vácuo 160mm Vidrolabor
 Dispositivo de Ultrafiltração Millipore
 Eletrodo auxiliar (contra-eletrodo) de platina (área 1cm²)
 Eletrodo de referência de Ag/AgCl 3M saturado
 Eletrodo de trabalho de FTO (área 2,5cm²)
 Material de rotina de laboratório
 Membrana de nitrocelulose 0,22µm (Hybond ECL, Amersham Biosciences)
 Vidrarias de rotina de laboratório

3.2.3 Reagentes

Acetona (CH₃)₂CO P.A Impex Massa molar:58,08 g.mol⁻¹
 Ácido Bórico (H₃BO₃) (98,5%) Aldrich Massa molar:61,83 g.mol⁻¹
 Ácido nítrico (HNO₃) P.A (65%) Synth Massa molar:63,01 g.mol⁻¹
 Ácido perclórico (HClO₄) P.A (70%) A.C.S Massa molar:100,46 g.mol⁻¹
 Ácido sulfúrico (H₂SO₄) P.A (98%) Merck Massa molar:98,08 g.mol⁻¹
 Albumina Soro Bovina Gold Lab
 3-aminofenol (C₆H₇NO) P.A (98%) Aldrich Massa molar:109,13 g.mol⁻¹
 Anticorpo monoclonal anti-troponina T – Sigma - Aldrich
 Antígeno troponina T pureza ≥ 98% - Calbiochem M. W. 34.459 Da
 Anticorpo monoclonal anti-troponina I – Abcan M. W. 24000 Da
 Borato de sódio decahidratado (Na₂B₄O₇ · 10H₂O) 99,5% Aldrich
 Massa molar: 381,37 g.mol⁻¹
 Biotina-N-hidroxi-succinimida (C₁₄H₁₉N₃O₅S) P.A (≥98%) Aldrich
 Massa molar:341,38 g.mol⁻¹
 Brometo de Potássio (KBr) (99,99%) Aldrich Massa molar: 119 g.mol⁻¹
 Cloreto de Amônio (NH₄Cl) (99,99%) Aldrich Massa molar: 53,49 g.mol⁻¹
 Cloreto de Hexaminrutênio (Ru(NH₃)₆Cl₂) Massa molar:274,16 g.mol⁻¹
 Cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (99 %) Aldrich
 C₈H₁₇N₃·HCl 191,70 g.mol⁻¹
 Cloreto de potássio (KCl) P.A (99,6%) J.T.Baker Massa molar:74,55 g.mol⁻¹
 Cloreto de sódio (NaCl) P.A (99%) Vetec Massa molar:58,44 g.mol⁻¹

Conjugado Quatum Dot-Estreptavidina 525 nm (Q10141MP) Invitrogen
Tetracloroeto de 3,3-diaminobenzidina $(\text{NH}_2)_2\text{C}_6\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_3(\text{NH}_2)_2 \cdot 4\text{HCl}$ P.A (99%)
Massa molar: $360,11 \text{ g.mol}^{-1}$
Éter de petróleo P.A Vetec $d=0,64 \text{ g.cm}^{-3}$
Ferricianeto de potássio $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ P.A Reagen Massa molar: $329,25 \text{ g.mol}^{-1}$
Ferrocianeto de potássio $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6]$ P.A Vetec Massa molar: $422,39 \text{ g.mol}^{-1}$
Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) P.A (98%) J.T.Baker
Massa molar: $136,09 \text{ g.mol}^{-1}$
Fosfato de sódio dibásico $(\text{Na}_2\text{HPO}_4)$ P.A (99%) Vetec
Massa molar: $141,96 \text{ g.mol}^{-1}$
Glicina $(\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2)$ P.A (98,5%) Aldrich Massa molar: $75,07 \text{ g.mol}^{-1}$
N-hidroxi-succinimida $(\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3)$ P.A (98%) Aldrich Massa molar: $115,09 \text{ g.mol}^{-1}$
Nitrogênio ultra puro (N_2)
Polímero Estreptavidina-Peroxidase Ultra-sensível $(1,0 \text{ mg.mL}^{-1} \text{ pH } 7,4)$ Aldrich
Monolaurato de polioxietileno sorbitano - Tween 20 $(\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26})$
Massa molar: $346,45 \text{ g.mol}^{-1}$

3.3 Metodologia

3.3.1 Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada ($18,2 \text{ M}\Omega.\text{cm}$, Milli-Qplus) obtidas de um Ultra purificador. Quando necessário medidas de pH foram realizadas utilizando um pHmetro e as soluções foram sonicadas de 3 a 5 minutos para homogeneização, usando um banho de ultrassom, para os reagentes sólidos a massa foi mensurada em uma balança analítica. As soluções de eletrólito suporte, assim como as soluções monoméricas foram deaeradas por passagem de fluxos de N_2 ultra-puro por 30 minutos.

3.3.2 Preparação das soluções e utilização

Soluções monoméricas de 3AMF $2,5 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ e $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$

Preparação: as soluções foram preparadas a partir de 0,0696 g e 0,00696 g de 3AMF solubilizadas em eletrólito suporte (HClO_4 e H_2SO_4), ambos em duas concentrações, sendo elas: $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, respectivamente.

Utilização: como solvente na síntese de formação do P3AMF por eletropolimerização.

Soluções de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e ácido perclórico (HClO_4) $0,5$ e $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$

Preparação: (H_2SO_4 $0,5$ e $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$): transferiu-se 2,8 mL e 14,0 mL para balões volumétricos de 100 mL. (HClO_4 $0,5$ e $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$): transferiu-se 3,02 mL e 15,1 mL para balões volumétricos de 100 mL.

Utilização: como eletrólito suporte na síntese do P3AMF por eletropolimerização.

Solução de $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ / $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5 mmol.L^{-1}

Preparação: a solução foi preparada a partir de 0,823 g de $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 1,056 g de $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e 7,7244 g de KCl. Os reagentes foram transferidos quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL e completado o volume com água deionizada.

Utilização: caracterização iônica do P3AMF e na detecção do antígeno troponina T por EIE.

Solução de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_2$ 5 mmol.L^{-1}

Preparação: a solução foi preparada a partir de 0,01371 g de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_2$, e 0,15449 g de KCl. Os reagentes foram transferidos quantitativamente para um balão volumétrico de 10 mL.

Utilização: sonda positiva na caracterização iônica do P3AMF.

Solução tampão PBS 10 mmol.L⁻¹ com NaCl (pH7,4)

Preparação: a solução foi preparada a partir de 0,05 g de KCl, 2,0 g de NaCl, 0,06 g de KH₂PO₄ e 0,36 g de Na₂HPO₄. Os reagentes foram transferidos quantitativamente para um balão volumétrico de 250 mL.

Utilização: para diluição dos anticorpos monoclonais anti-troponina T (anti-cTnT) e anti-troponina I (anti-cTnI) e do troponina T (cTnT).

Solução tampão PBST

Preparação: a solução foi preparada acrescentando o detergente tweem 20 a 0,1% (v/v) ao PBS com NaCl (7,4).

Utilização: lavagens do "*dot blot*"

Solução tampão borato de sódio 0,1 mol.L⁻¹ (pH8,8)

Preparação: Transferiu-se 10,22 g borato de sódio decahidratado e 0,3 mL de ácido bórico para balão volumétrico de 100 mL, avolumou-se com água deionizada até o menisco.

Utilização: na biotinilação do anticorpo anti-troponina T.

Solução de anti-cTnT (300 ng/cm²)

Preparação: De uma suspensão de concentração 3 mg.mL⁻¹ foram retirados 1 µL e avolumados para 500 µL com solução tampão PBS com NaCl em eppendorf usando micropipeta.

Utilização: imobilização sobre FTO/P3AMF (sonda).

Solução de cTnT (900 ng/cm²)

Preparação: Uma amostra liofilizada de 100 µg do antígeno troponina T foi ressuspendida em 1 mL de solução tampão PBS com NaCl. Foram retirados 100 µL desta solução e acrescentados 455,5 µL de solução tampão PBS com NaCl em eppendorf usando micropipeta.

Utilização: como alvo (controle positivo).

Solução de anti-cTnI (900 ng/cm²)

Preparação: De uma suspensão de concentração 3,2 mg.mL⁻¹ foram retirados 1 µL e avolumados para 177,78 µL com solução tampão PBS com NaCl em eppendorf usando micropipeta.

Utilização: como proteína irrelevante (controle negativo).

Solução de anti-cTnT-B (300 ng/cm²)

Preparação: Da solução de anti-cTnT-B 450 ng/µL foi retirado 2 µL e acrescentados 148 µL de solução tampão PBS com NaCl em eppendorf usando micropipeta.

Utilização: como anticorpo complementar.

Solução de NHS-Biotina (NHSB) em DMSO

Preparação: Transferiu-se 0,0051 g de NHSB para um eppendorf adicionando 500 µL de DMSO com micropipeta.

Utilização: na biotinilação do anticorpo anti-troponina T.

Solução de Cloreto de Amônio 1 mol.L⁻¹

Preparação: Transferiu-se 0,5403 g de NH₄Cl para um balão volumétrico de 10 mL.

Utilização: na biotinilação do anticorpo anti-troponina T.

Conjugado quantum dot-estreptavidina (S-QDs)

Preparação: A solução de S-QDs 1 µM foram centrifugados a 5000G por 3 minutos. Do sobrenadante foram retirados 1 µL e diluído para um volume final de 50 µL de tampão PBS para obter uma concentração final de 20 nM.

Utilização: na detecção do troponina T por fotoluminescência.

Pontos quânticos de seleneto de cádmio (CdSe) "core" com um encapsamento adicional de sulfeto de zinco (ZnS) "shell" foram acoplados diretamente a estreptavidina pela Invitrogen [125].

3.3.3 Eletrodos

Eletrodo auxiliar (contra-eletrodo) de platina

Foi confeccionado em platina com uma área útil correspondente a 2cm^2 (figura 16A). Antes de sua utilização os mesmos foram flambados até atingir a coloração avermelhada, indicando a remoção de resíduos orgânicos na superfície.

Eletrodo de referência de Ag/AgCl 3M saturado

Uma lâmina retangular de prata foi utilizada na confecção deste eletrodo que é acondicionado imerso em KCl 3 mol.L⁻¹ conforme figura 16B.

O eletrodo de trabalho de FTO

Foi adquirido da empresa Flexitec em lâminas de dimensões de 2,5 x 7,5 cm, produzido por pirólise de spray, a partir de uma suspensão em ar, em que gotas de solução de cloreto estanhoso hidratado e fluoreto de amônia em água produzidas por ultra-som, foram direcionadas por arraste ao substrato vidro (SiO₂) previamente aquecido à temperatura entre 450 e 550 °C. Utilizando um cortador de vidro e um paquímetro as lâminas foram reduzidas em eletrodos com dimensões de 1 x 2,5 cm.

Muitas sugestões são reportadas na literatura quanto à limpeza de FTO, como por exemplo, a limpeza com acetona e posteriormente secagem com papel absorvente [126], ou ainda, em banho ultra-som por dez minutos sequencialmente, soluçãoalconox 0,8 % (detergente comercial), 2-propanol e água [127], a sugestão do fabricante seria sequencialmente acetona, isopropanol, água, solução sulfonítrica e água, todavia nosso grupo optou por fazer uma limpeza constituída de três etapas com intervalo de tempo de 3 minutos cada uma delas em banho ultrassom, são elas sequencialmente: éter de petróleo, acetona e água, e posterior secagem em nitrogênio ultra-puro (N₂). Pontas de prova (garra jacaré) e teflon foram utilizados para o contato elétrico.

3.3.4 Eletropolimerização de P3AMF por Voltametria Cíclica

A cela eletroquímica de três compartimentos foi previamente limpa em HNO_3 por 24 h, comportando aproximadamente 25 mL de solução monomérica. Agregando-se os três eletrodos (trabalho, referência e contra-eletrodo) obteve-se o sistema, que por sua vez foi alimentado por um potenciostato, sendo utilizada a voltametria cíclica para realização dos estudos de eletropolimerização. Testes foram realizados para otimização da eletropolimerização, proporcionando variações na: velocidade de varredura, 5, 25 e 50 mV.s^{-1} ; concentrações monoméricas, $2,5 \times 10^{-2}$ e $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; concentrações e soluções de eletrólito suporte, HClO_4 , H_2SO_4 , 0,5 mol.L^{-1} e 2,5 mol.L^{-1} . Para estudar a janela eletroquímica adequada foram realizados 100 ciclos de potencial com velocidade de varredura de 50 mV.s^{-1} , na faixa de potencial de -0,2 V à: +0,9 V; +1,1 V; +1,3 V e +1,6 V em solução eletrolítica de ácido sulfúrico 2,5 mol.L^{-1} contendo 3AMF $2,5 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ a temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$).

3.3.5 Caracterização por ultra-violeta visível

Os filmes de P3AMF, eletrodepositados em FTO foram caracterizados entre 300 e 900 nm, usando um espectrofotômetro de feixe duplo.

3.3.6 Caracterização por Espectroscopia de Fluorescência

Filmes de P3AMF, eletrodepositados em FTO foram caracterizados na região do visível usando um fluorímetro.

3.3.7 Caracterização por infra-vermelho

Espectros de FTIR foram obtidos para o 3AMF e para o P3AMF, eletrodepositados em FTO em faixa de número de onda de 500 a 4000 cm^{-1} , em

pastilhas de KBr, 32 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} , utilizando-se o equipamento Perking Elmer.

3.3.8 Caracterização de troca iônica

As propriedades de troca iônica para o eletrodo FTO e FTO modificado com P3AMF (FTO/P3AMF) foram investigadas pelo estudo da reação de transferência eletrônica nas superfícies modificadas utilizando-se dois diferentes pares redox: ferrocianeto/ferricianeto de potássio (sonda redox negativa) e cloreto de hexaminrutênio (II) (sonda redox positiva). Medidas por VC foram conduzidas em $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ na faixa de potencial de -0,2 V a +0,7 V e de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_2$ na faixa de potencial de -0,4 V a +0,2 V. Estudos também foram conduzidos somente em solução do eletrólito suporte (solução aquosa de KCl), na mesma faixa de potencial utilizada na investigação dos pares redox.

3.3.9 Caracterização por microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo

As características superficiais do eletrodo de FTO e FTO/P3AMF foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo, onde ampliações de 10.000, 25.000 e 50.000 X foram registradas. As amostras foram metalizadas com ouro por uma metalizador EMITECH K575X durante 38 s com uma corrente de 10 mA sob um vácuo de 7×10^{-5} mBar.

3.3.10 Caracterização por microscopia de força atômica

O estudo da morfologia da superfície dos eletrodos de FTO e FTO/P3AMF foram realizados utilizando um microscópio de força atômica. As imagens foram obtidas no "tapping" gravadas simultaneamente em temperatura ambiente. Foi utilizado um cantilever comercial de antimônio (n) dopado com silício com constante de mola na faixa de 1-5 N/m que oscilou em sua frequência

ressonante fundamental entre 60-100 kHz. Os valores de R_a e R_s foram calculados usando o software SPMLabAnalysis V 7.00.

3.3.11 Caracterização da espessura por interferometria a laser

A espessura do P3AMF eletrodepositado em FTO foi determinada usando um Interferômetro. As imagens foram processadas através do software Digital Surf Mountains Map Universal® [128]. A amostra foi metalizada com ouro por uma metalizador EMITECH K575X durante 38 s com uma corrente de 10 mA sob um vácuo de 7×10^{-5} mBar. Adicionalmente, a amostra foi submetida a uma análise de microscopia metalográfica através de um microscópio metalográfico Olympus BX51.

3.3.12 Caracterização das propriedades elétricas

Resistor, FTO, FTO/P3AMF, FTO/PANI obtidos após 50 ciclos de potencial com velocidade de varredura de 50 mV.s^{-1} na faixa de potencial de -0,2 à +0,9 V em solução eletrolítica de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ contendo 3AMF $1 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ a temperatura ambiente ($25 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$), foram submetidos à caracterização IV (corrente x potencial) realizada por uma fonte após sua secagem á vácuo.

3.3.13 Caracterização do FTO/P3AMF e detecção do troponina T por espectroscopia de impedância eletroquímica

Os espectros de impedância eletroquímica do eletrodo de FTO, FTO/P3AMF, FTO/P3AMF/anti-cTnT (Sonda), FTO/P3AMF/anti-cTnT/cTnT (controle positivo) e FTO/P3AMF/anti-cTnT/anti-cTnI (controle negativo) foram obtidos em solução aquosa de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em potenciostato AUTOLAB. A solução de análise foi deaerada com N_2 ultra puro por cerca de 40 minutos, os eletrodos modificados permaneceram em contato com a solução por cerca de 30 minutos. O intervalo de frequência investigado foi de 10^6 a 10^{-2}

Hz. A amplitude de excitação senoidal foi de 10 mV (p/p) sendo potencial aplicado de +0,24 V. O ajuste dos resultados experimentais, a um circuito equivalente apropriado foi realizado com software provido pelo equipamento.

3.3.14 Biotinilação do anti-cTnT

A conjugação do anticorpo monoclonal anti-cTnT à biotina (anti-cTnT-B) foi viabilizada segundo protocolo [129] no Laboratório de Nanobiotecnologia do INGEB-UFU. Preparou-se uma solução de N-hidroxissuccimida-biotina a 10 mg.mL⁻¹ em dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida preparou-se uma solução de anticorpo de 0,25 mg.mL⁻¹ em Na₂B₄O₇·10H₂O 0,1 mol.L⁻¹, pH 8,8. Adicionou-se 62,5 µg do biotina-éster ao anticorpo, sendo que mistura foi incubada por 4 horas, sob agitação lenta, à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 5 µL de solução de NH₄Cl 1 mol.L⁻¹ realizando incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. Utilizando um sistema de ultra filtração Amicon Millipore (diâmetro médio de 3 KDa) foi removida a biotina não ligada. Aproximadamente 500 µL da solução de anticorpo marcado com biotina contra 4 mL de tampão PBS levados a centrifuga 7500.g por 30 minutos, com pelo menos (3 trocas de tampão). O anticorpo modificado foi dividido em alíquotas e mantido a 4 °C quando em uso ou a - 20 °C quando estocado.

3.3.15 Imobilização do anti-cTnT na matriz de P3AMF

Adsorção Física

Eletrodos de FTO/P3AMF foram utilizados para imobilizar anticorpos do anti-cTnT por adsorção física. Após a eletropolimerização os eletrodos de FTO modificados com P3AMF foram submetidos à VC (5 a 10 varreduras, término do último ciclo em +1,6 V) no eletrólito suporte (H₂SO₄ 2,5 mol.L⁻¹). Posteriormente foram lavados com água deionizada e secos com N₂ ultra puro.

Um volume de 50 µL de solução do anti-cTnT foi adicionado sobre a área útil do eletrodo, formando um filme fino que permaneceu em temperatura

ambiente até a secagem completa. Na sequência o sistema foi submetido à nova lavagem em PBS.

Ligação Covalente

Eletrodos de FTO/P3AMF foram utilizados para imobilizar anticorpos do anti-cTnT por ligação covalente, via carbodiimida. Após a eletropolimerização, os eletrodos de FTO modificados com P3AMF foram submetidos à VC (5 a 10 varreduras) no eletrólito suporte (H_2SO_4 2,5 mol.L⁻¹). Posteriormente, foram lavados com água deionizada e secos com N_2 ultra puro. Duas soluções foram adicionadas à solução de anti-cTnT, sendo elas: solução de cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e solução de N-hidroxi-succinimida (NHS), ambas a 10 mmol.L⁻¹, na proporção 2:1:1. Foram gotejados com micropipeta 100 µL em cada eletrodo acondicionados a 4 °C "overnight". Para retirada dos anticorpos não ligados foi realizada uma lavagem em PBS. Em seguida adicionou-se 100 µL de glicina a 5 mmol.L⁻¹ por 30 minutos para desativar os grupos succinimidas ainda ativos no anticorpo. O sistema foi submetido à nova lavagem em PBS. Na sequência 100 µL de solução de BSA 0,5 % foram adicionados durante 30 minutos ao sistema para bloqueio de sítios inespecíficos, configurando assim a sonda do biossensor.

3.3.16 "Dot blot"

O ensaio foi realizado em dois momentos. No princípio para verificar a eficiência da biotinylation e num segundo momento para verificar a funcionalidade do biossensor tipo "sanduíche".

Teste de eficiência da biotinylation: Em um círculo de aproximadamente 2,5cm de diâmetro de membrana de nitrocelulose 0,22 µm (Hybond ECL, Amersham Biosciences) foram separadas 3 regiões e gotejados consecutivamente aproximadamente 2µL contendo 1,5µg de anti-cTnI(1), cTnT(2) e anti-cTnT(3), respectivamente, e deixados secar à 37°C em estufa.

Em seguida, a membrana foi bloqueada com uma solução de BSA 5% em PBS e incubada à temperatura a 37°C durante 1 hora. Na sequência a membrana foi lavada, rapidamente, por 3 vezes com PBST 0,1%. Posteriormente adicionou-se a anti-cTnT-B solubilizada em PBS/BSA (1:1000) imergindo a membrana nesta solução, sob agitação, por 1 hora. Em seguida, a membrana foi submetida à lavagem por 3 vezes com PBST 0,1%. Na última etapa foi inserido o S-HRP na proporção de (1:1000) diluído em BSA 5% incubado por 1 hora, sob agitação a temperatura de 37°C. Na sequência, a membrana foi lavada por 3 vezes, rapidamente, com PBST 0,1%. O ensaio foi revelado com a adição do cromógeno tetracloreto de 3,3-diaminobenzidina (DAB) (Sigma Fast™ DAB) e Uréia/H₂O₂/NaCl. Para parar a reação, a membrana foi lavada em água destilada.

Funcionalidade do biossensor tipo "Sanduíche": Em dois quadrados separados de área aproximada de 1cm² de membrana de nitrocelulose 0,22µm (Hybond ECL, Amersham Biosciences) foram sensibilizados anti-cTnT. Em (1) foi adicionado o alvo específico (cTnT) (controle positivo), já em (2) foi adicionado à proteína irrelevante (anti-cTnI) (controle negativo). Ambas as membranas foram sondadas com anti-cTnT biotinilado (anti-cTnT-B) e conjugado estreptavidina-peroxidase (S-HRP). O produto da reação foi revelada com adição do cromógeno tetracloreto de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Sigma Fast™ DAB w/Co) e Uréia/H₂O₂/NaCl. Os bloqueios das membranas, as concentrações de biomoléculas e dos demais reagentes, assim como os tempos de reação e das lavagens não foram modificados em relação ao ensaio de "dot blot" para verificar a eficiência da biotinilação.

3.3.17 Detecção do troponina T por fotoluminescência

A sonda (FTO/P3AMF/anti-cTnT) foi submetida aos seguintes passos consecutivamente:

Solução do troponina T (controle positivo); Solução do anti-cTnT-B;
Solução do S-QDs.

Entre todas as etapas descritas acima ocorreu uma lavagem através da imersão da sonda em PBS, e posterior secagem em N₂ ultra-puro.

Um controle negativo foi realizado utilizando o anti-troponina I.

Embora os pontos quânticos possam ser excitados numa ampla faixa do espectro, o fornecedor [125] recomenda dois comprimentos de onda, a saber: 633 nm e 400 nm. Para obter rendimentos máximos os QDs de core CdSe e shell ZnS (Qdot-525) foram excitados a 405 nm.

Um arranjo óptico foi ajustado com lentes e suportes, de modo a se obter a melhor intensidade emitida de forma que a excitação da amostra pelo laser ficou em um ângulo aproximado de 45 °C da fenda do Espectrômetro acoplado a fotomultiplicadora UV/VIS. Um Filtro passa banda Schott GG-495 foi colocado entre a amostra e a fenda espectrométrica suprimindo a emissão do laser na detecção do sinal das amostras (Figura 15).

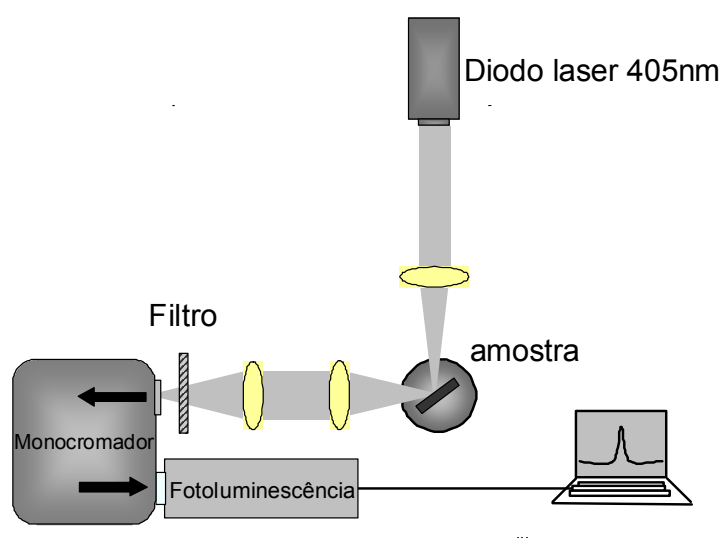


Figura 15: Esquema ilustrativo do arranjo óptico utilizado na detecção do troponina T por fotoluminescência.

Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Ótica e Fototérmica (GOF) do Instituto de Física da Universidade Federal de Uberlândia (INFIS-UFU).

4 - Resultados e Discussão

4.1 Eletropolimerização de P3AMF por Voltametria Cíclica (VC)

Uma varredura inicial no eletrólito suporte HClO_4 $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ (sem monômero) foi realizada variando-se o potencial entre $-2,0 \text{ V}$ e $+2,0 \text{ V}$, onde se observou que abaixo do potencial de $-0,7 \text{ V}$ surgiram bolhas na superfície dos eletrodos, indicando que ocorreu nestas superfícies a redução de hidrogênio, não sendo observado mais picos de oxidação ou redução das espécies envolvidas neste intervalo de potencial.

Dificuldades iniciais foram encontradas para eletropolimerizar o 3AMF no FTO usando como eletrólito suporte o HClO_4 que foi substituído então por H_2SO_4 , já testado em aminofenóis por outro grupo de pesquisa [126].

Pode ser observado que as menores velocidades na VC e as maiores concentrações de monômero proporcionam a produção de uma maior quantidade de poli(3-aminofenol) (P3AMF), cuja massa depositada sobre o eletrodo foi mensurada, onde se obteve valores inferiores a $0,00001 \text{ g}$, ou seja, mesmo nestas condições mais favoráveis (baixas velocidades de ciclização e elevadas concentrações monoméricas), a quantidade de material eletrodepositado é muito baixa, apresentando rendimento após extração inferior a $0,014 \%$, o que pode ser explicado em função da superfície de contato, por que a eletropolimerização ocorre apenas na interface do eletrodo e de fato grande parte do material fica solubilizado no eletrólito devido à difusão.

A princípio a janela de potencial avaliada foi de $-0,2 \text{ V}$ a $+2,3 \text{ V}$. É válido ressaltar que este elevado potencial anódico para o P3AMF foi escolhido inicialmente em função da formação do seu isômero poli(2-aminofenol) (P2AMF) em FTO por cronopotenciometria (densidade de carga = 1250 mC.cm^{-2}) aproximadamente neste potencial [126]. Com intuito de evitar a sobre-oxidação do material polimérico, a janela de potencial foi pré-definida no intervalo de potencial de $-0,2 \text{ V}$ a $+1,6 \text{ V}$ (Figura 16). Já no grafite, o P3AMF foi formado numa janela de potencial entre $-0,2 \text{ V}$ e $+1,1 \text{ V}$ [130,131], sendo que a janela

de potencial mais ampla para o FTO (+0,5V) pode ser explicada pela diferença entre os dois substratos. Grafite é um material condutor ($R \approx 0 \Omega$) enquanto o FTO é um material com menor condutividade ($R = 5$ a 50Ω), ou seja, para oxidação do 3AMF em um material mais resistivo como o FTO é necessário um maior potencial anódico.

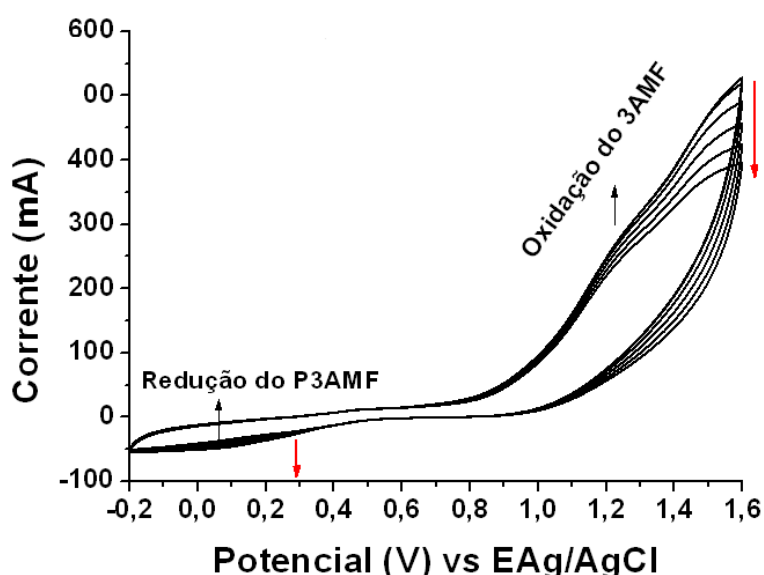


Figura 16: Voltamograma do P3AMF - Ciclos iniciais da eletropolimerização em FTO (3AMF - $2,5 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$; H_2SO_4 $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$; 50 mV.s^{-1})

Semelhanças e diferenças podem ser detectadas nos voltamogramas de eletropolimerização do 3AMF em FTO e em grafite [131], neste último, o pico de oxidação que evidencia a formação do cátion-radical ocorre em (+0,89 V), uma onda de redução do P3AMF aparece em (+0,31 V) e uma complementar de oxidação em (+0,37 V).

Já no eletrodo de FTO pode ser observado um ombro em +1,23 V associado à formação do cátion-radical, bem como um pico de redução entre (+0,25 V e -0,2 V) com uma corrente muito baixa, assim como observado no eletrodo de grafite.

Uma semelhança que pode ser evidenciada nas eletropolimerizações em ambos os substratos está associada à queda de corrente do pico anódico, nas

sucessivas varreduras de potencial para formação do cátion-radical que somado a não observação de picos redox associados à formação de material eletroativo sugere a formação de P3AMF no FTO tem caráter passivante.

Os voltamogramas obtidos nas eletropolimerizações do 3AMF em FTO apresentam perfis semelhantes aos voltamogramas obtidos para outros polímeros em substratos vítreos condutores, como por exemplo, o polipirrol em FTO [71] e um derivado do politiofeno em ITO [73], diferindo no que tange as correntes, tanto o politiofeno quanto o polipirrol, que tem suas correntes de oxidação aumentadas nas sucessivas ciclizações, todavia no P3AMF ela decresce.

Amostras resultantes dos estudos de janelas de potenciais realizados para a eletropolimerização do 3AMF em FTO (Figura 17a) apresentaram voltamogramas (Figura 17b) com perfis que indicam que a região de redução aumenta com o aumento da faixa de potencial, sugerem maior quantidade de P3AMF formado.

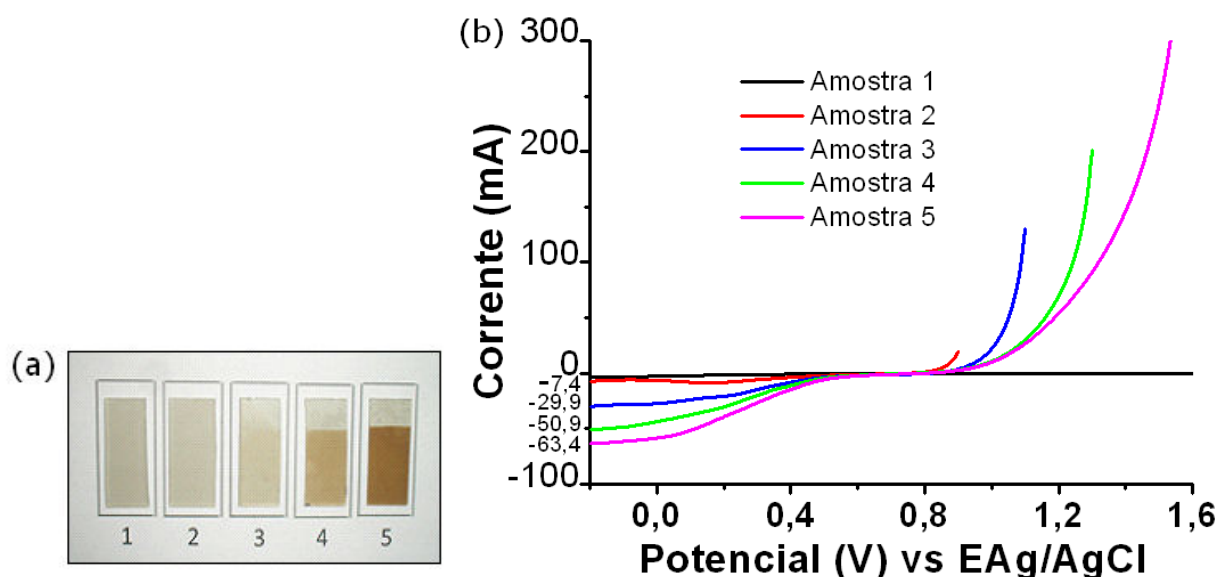


Figura 17: (a) Fotos dos eletrodos de FTO modificados com P3AMF ($2,5 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹) após 100 sucessivos ciclos de potencial variando entre: -0.2 V e: +0.9 V (2); +1.1 V (3); +1.3 V (4); +1.6 V (5). (FTO) (1); (b) Última varredura de redução obtida nos voltamogramas de formação do P3AMF.

4.2 Espectros de UV/VIS e EF

O espectro UV/Vis do FTO/P3AMF não mostrou absorção na região do visível, mas ocorreu o surgimento de uma pequena banda entre 300 – 350 nm (Figura 18), onde se observou que o P3AMF formado a 25 mV.s^{-1} teve absorbância em 310 nm (0,44 %) aproximadamente, o dobro (0,21 %) do P3AMF formado a 50 mV.s^{-1} , conforme esperado uma vez que a velocidade de varredura e a quantidade de material sobre a superfície do eletrodo são inversamente proporcionais, ou seja, quanto maior a velocidade de varredura, menos tempo as espécies tem para sofrer oxidação sobre o eletrodo e reagirem entre si, formando assim menor quantidade de material polimérico.

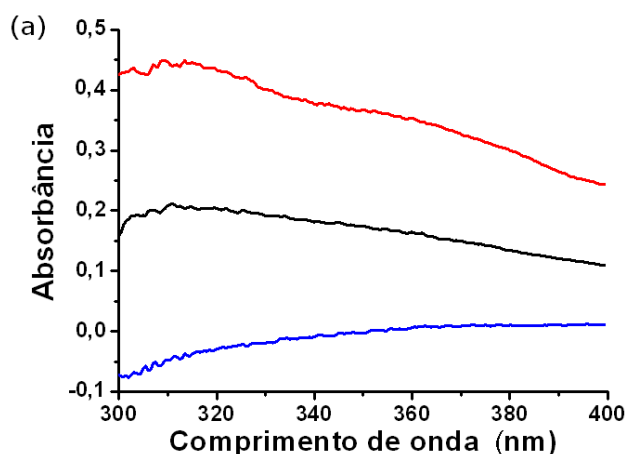


Figura 18: Espectros UV/Vis (a) FTO (—); FTO/P3AMF por VC a (—) 25 mV.s^{-1} e a (—) 50 mV.s^{-1}

Evrin Hür e colaboradores [132] eletropolimerizaram PANI e P3AMF em aço carbono e após a extração em DMSO, realizaram a caracterização UV/Vis, que apresentou resultados equivalentes, ou seja, o P3AMF em solução apresentou curva semelhante ao eletropolimerizado em FTO (fase sólida). Todavia, diferentemente dos espectros do P3AMF, o trabalho de Evrim Hür mostrou no espectro do filme de PANI, absorção em duas bandas largas, 275-300 nm (pico 1) e 525-625 nm (pico 2) [132], sendo que ao pico 1 Evrim Hür atribuiu às transições $\pi - \pi^*$ dos anéis benzênicos na estrutura linear, e ao pico

2 a transição do anel benzenóides para-quinóides (esmeraldina oxidada), sendo estes picos característicos de polímeros condutores.

A não observação da banda entre 525-625 nm no espectro do P3AMF (referente à transição do anel benzenóide para-quinóide) tanto em aço carbono quanto em FTO indicam que o material formado não apresenta característica condutora.

Os estudos de fluorescência do FTO/P3AMF mostraram que o P3AMF formado em ambas as velocidades de varredura não apresentaram fluorescência na região do visível, sendo este fator vantajoso para produção de biossensor com detecção por luminescência, evitando sobreposição de bandas.

4.3 Espectros de FTIR

Os espectros de FTIR do 3AMF (Figura 19) mostraram duas bandas, uma em 3360 e outra em 3295 cm^{-1} , referentes aos modos de deformação assimétrica (ν_{as}) e simétrica (ν_{s}) do -NH livre, característico de amins primárias. A deformação angular simétrica no plano de NH_2 é evidenciada em 1602 cm^{-1} [133]. As bandas 1257 e 1178 cm^{-1} são referentes à distorções de =C-O e das ligações OH, respectivamente [134]. Sinais de deformação angular simétrica de -NH fora do plano surgem em 686 cm^{-1} [104].

O espectro de FTIR do P3AMF mostra a conservação das bandas em 3360 e outra em 3295 cm^{-1} (-NH livre) e também da banda em 1602 cm^{-1} (tesoura fundamental do NH_2) mostrando que parte do polímero forma-se através da oxidação do oxigênio da hidroxila permitindo que parte dos grupamentos - NH_2 permaneçam livres na malha polimérica.

Surge uma intensa e larga banda entre 3550 e 3200 cm^{-1} correspondente às distorções de ligação de hidrogênio intramoleculares de -OH [104], indicando que uma parcela de hidroxilas (-OH) podem estar livres no polímero, o que pode ser reforçado através das bandas 1257 e 1178 cm^{-1} que foram preservadas, indicando que parte do polímero forma-se pela oxidação do nitrogênio como ocorre na PANI.

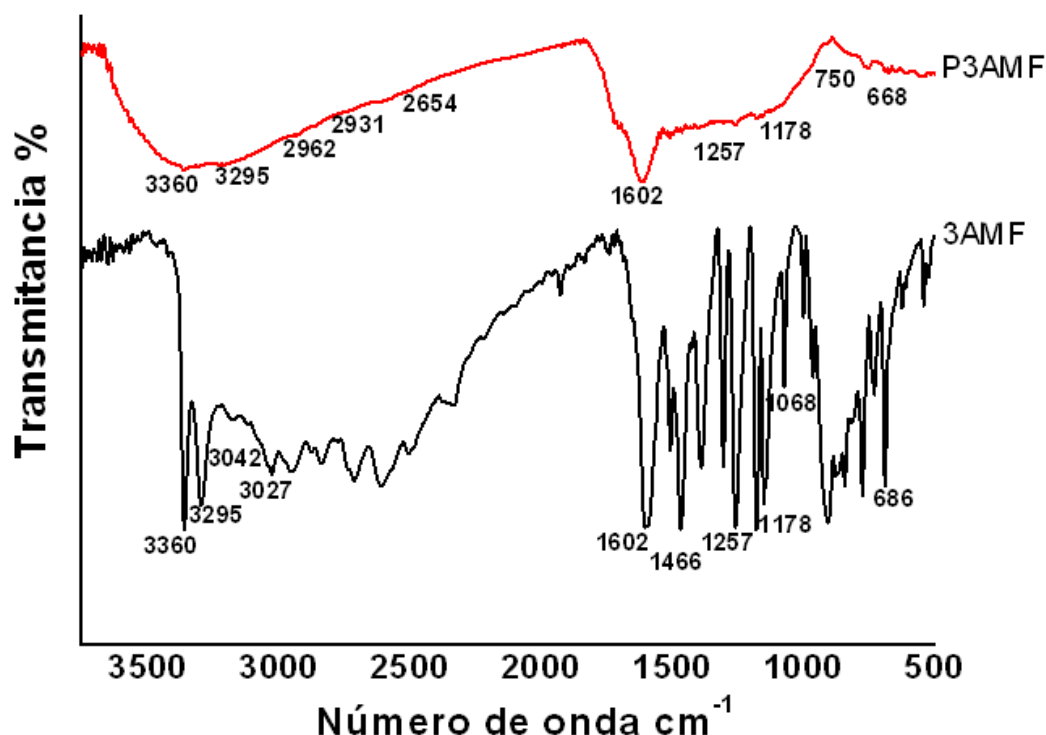


Figura 19: Espectros sobreposto de FTIR para o 3-aminofenol (3AMF) e poli(3-aminofenol) (P3AMF).

Embora as harmônicas ($2000\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$) não possam ser observadas no espectro do P3AMF, a presença de aromaticidade no polímero pode ser evidenciada em função de bandas características em 750 e 668 cm^{-1} , referentes à deformação angular fora do plano da ligação (C-H) de aromático.

4.4 Transporte iônico

Os voltamogramas cíclicos do FTO/P3AMF submetido às caracterizações eletroquímicas em soluções contendo $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_2$ (sonda positiva) e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (sonda negativa) demonstraram que o P3AMF facilita a oxirredução da espécie $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+}$ e dificulta a transferência de carga da espécie $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (Figura 20).

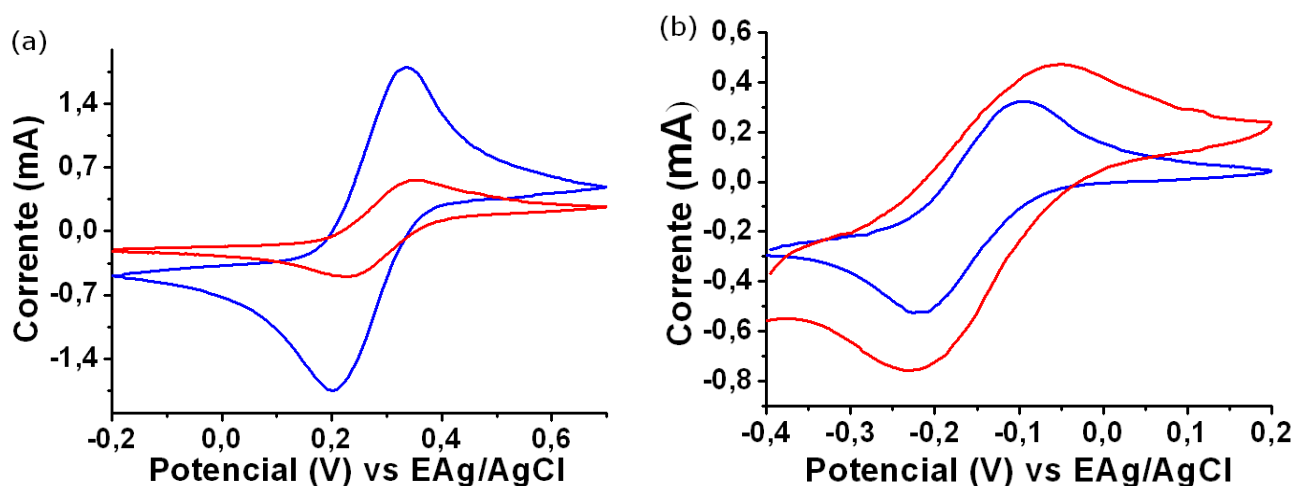


Figura 20: Respostas voltamétricas em KCl (—) FTO e (—) FTO/P3AMF: (a) 5 mmol.L⁻¹ de K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆; (b) 5 mmol.L⁻¹ de Ru(NH₃)₆Cl₂.

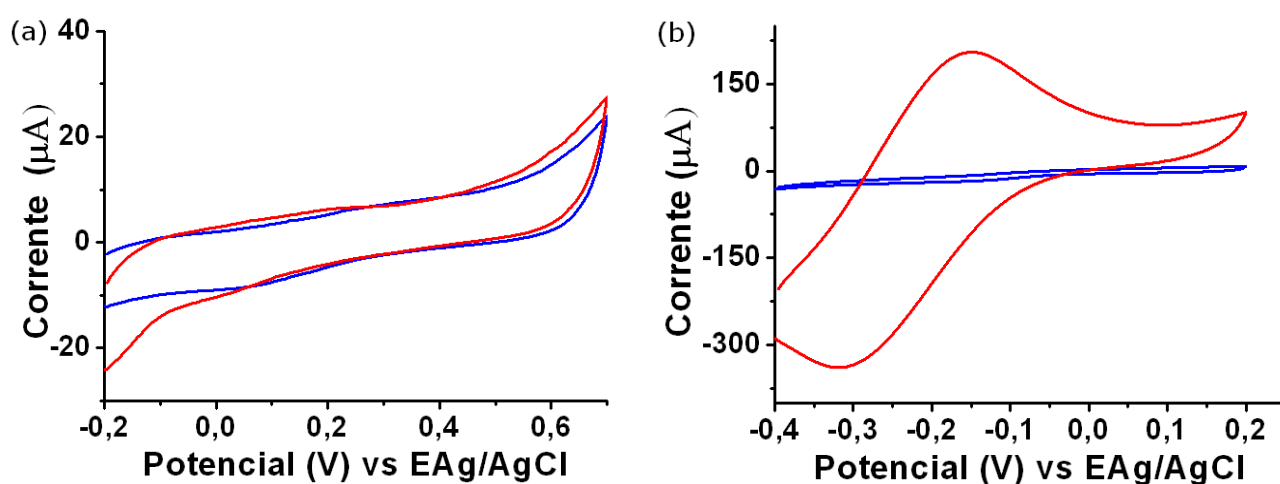


Figura 21: Respostas voltamétricas em KCl do FTO/P3AMF (—) antes e (—) após imersão 30 minutos em solução contendo: (a) 5 mmol.L⁻¹ de K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆; (b) 5 mmol.L⁻¹ de Ru(NH₃)₆Cl₂.

Os estudos realizados somente em KCl mostraram que ocorre retenção da espécie Ru(NH₃)₆²⁺ no polímero, ao contrário das espécies Fe(CN)₆³⁻ e Fe(CN)₆⁴⁻ (Figura 21) que não permanecem no polímero após lavagem. Ambos os fatos associados indicam que o P3AMF eletrodepositado em FTO apresenta uma relação de afinidade por estruturas catiônicas e de repulsão por estruturas aniônicas, ou seja, em pH neutro o P3AMF apresenta caráter aniônico, o que

pode ser explicado em função da nuvem de elétrons dos anéis aromáticos e do par de elétrons livres nos átomos de oxigênio e nitrogênio dos grupamentos hidroxila e amina livres.

4.5 Medidas topográficas de IL

Divergências nítidas de reflexão de luz, localizadas na interface gerada entre o filme (P3AMF) e o substrato (FTO) conforme pode ser observado na Figura 22. Embora ocorra boa distinção na reflexão, os valores de rugosidade média (S_a) do FTO e do FTO modificado são muito próximos, sendo eles 89,8 e 80,9 nm, respectivamente.

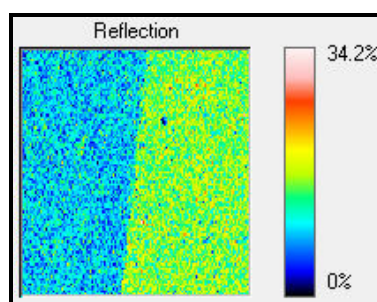


Figura 22: Reflexão de luz na Interface FTO / FTO/P3AMF.

Para avaliar a topografia com intuito de determinar a espessura do degrau foi necessário usar alguns filtros que removessem os pequenos defeitos, denominados de forma, sendo que a Figura 23 mostra uma região de 1mm^2 na interface, ou seja, $0,5\text{ mm}^2$ de FTO e $0,5\text{ mm}^2$ de FTO/P3AMF.

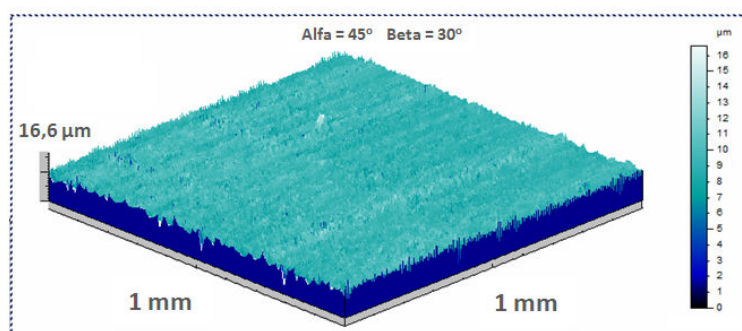


Figura 23: Topografia na Interface FTO / FTO/P3AMF após remoção da forma.

Visualmente não é possível observar o degrau que ocorre em função da interface gerada filme/substrato, localizada na região de corte em aproximadamente 0,5 mm, indicando que o filme de P3AMF depositado é fino.

Um artifício bastante útil é a análise dos 100 perfis medidos levando em consideração apenas a ondulação e a rugosidade (Figura 24) permite dizer que a espessura aproximada do filme é de 375 ± 75 nm, sendo que este mesmo monômero eletropolimerizado em grafite apresentou espessura de 180nm [131]. Esta diferença se deve principalmente em função das concentrações utilizadas, $2,5 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ (FTO) e $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ (grafite).

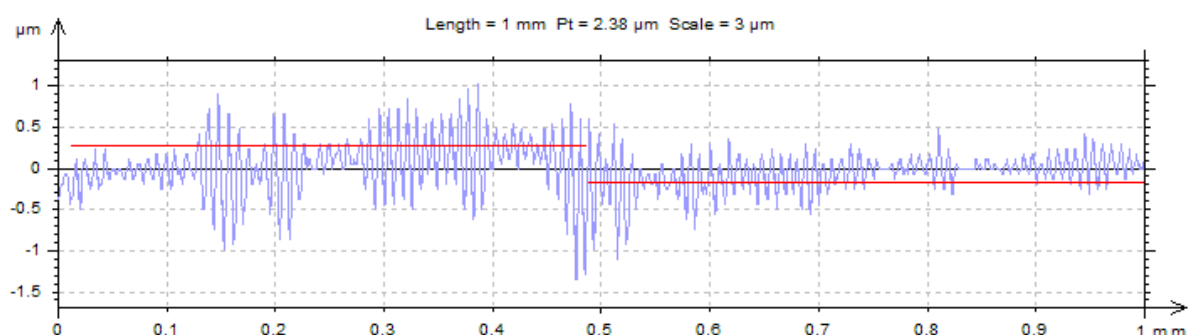


Figura 24: Média dos 100 perfis restritos a ondulação e rugosidade.

A microscopia metalográfica mostrou claramente o degrau entre o FTO e o FTO/P3AMF (Figura 25), todavia as dimensões de altura não são reais.

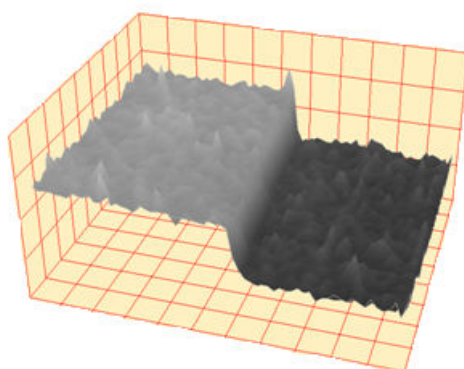


Figura 25: Imagem tridimensional da interface FTO e FTO/P3AMF

4.6 Imagens de FE-SEM

As amostras 1-5 (Figura 17a, seção 4.1) foram caracterizadas FE-SEM em ampliações de 10, 25 e 50 KX.

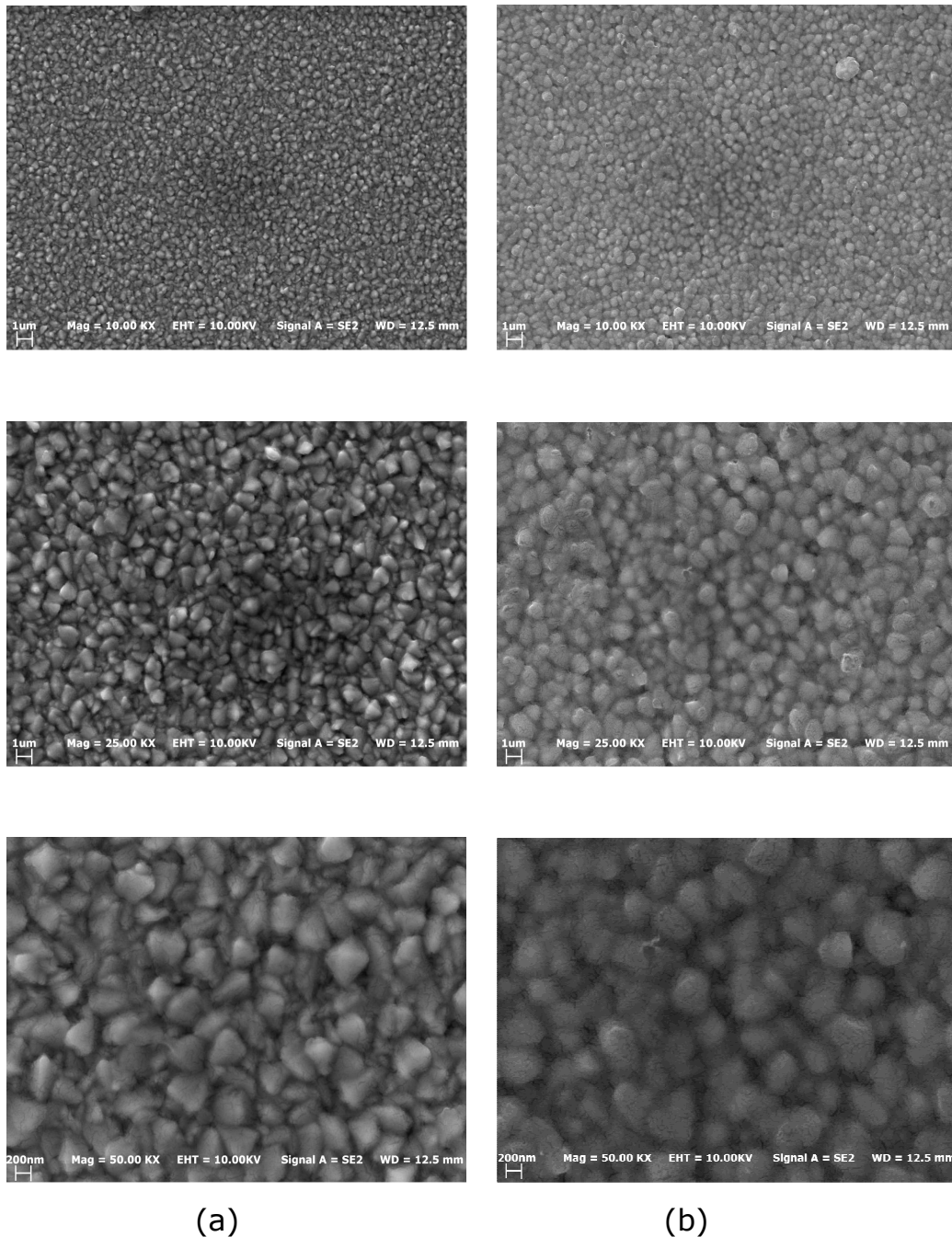


Figura 26: Micrografias de FE-SEM;
(a) FTO (amostra 1) (b) FTO/P3AMF (amostra 5).

As ampliações de 10 KX permitiram a verificação da granulometria, as ampliações de 25 e 50 KX possibilitaram a visualização do material formado, todavia isto é evidente apenas para a amostra 5 (Figura 26b). As micrografias de 50 KX mostram que o material formado está depositado nos sulcos e na superfície, mas principalmente nos sulcos, isto porque a visualização geométrica do FTO (Figura 26a) é degenerada em (Figura 26b), ou seja, ocorre que na região amostrada a cobertura parece ser completa do FTO pelo P3AMF.

4.7 Estudos morfológicos de superfície por AFM

As imagens por AFM de FTO e FTO/P3AMF (Figura 27) mostraram que a rugosidade média (R_a) para o FTO foi de 33,9 nm e o valor do desvio quadrático médio da rugosidade (R_{ms}) foi de 44,4 nm. Geralmente, quando R_a e R_{ms} são similares à superfície possui como característica a planaridade. Se a superfície possui consideráveis números de vales e picos, o valor de R_{ms} é maior que o R_a [135]. Desta forma, a superfície do FTO pode ser considerada estatisticamente e visualmente rugosa. Para a superfície do FTO/P3AMF obteve-se um valor para R_a e R_{ms} equivalente a 40 nm e 50,2 nm, respectivamente. Conclui-se que as duas superfícies analisadas por AFM apresentam superfícies com grande número de ilhas e vazios.

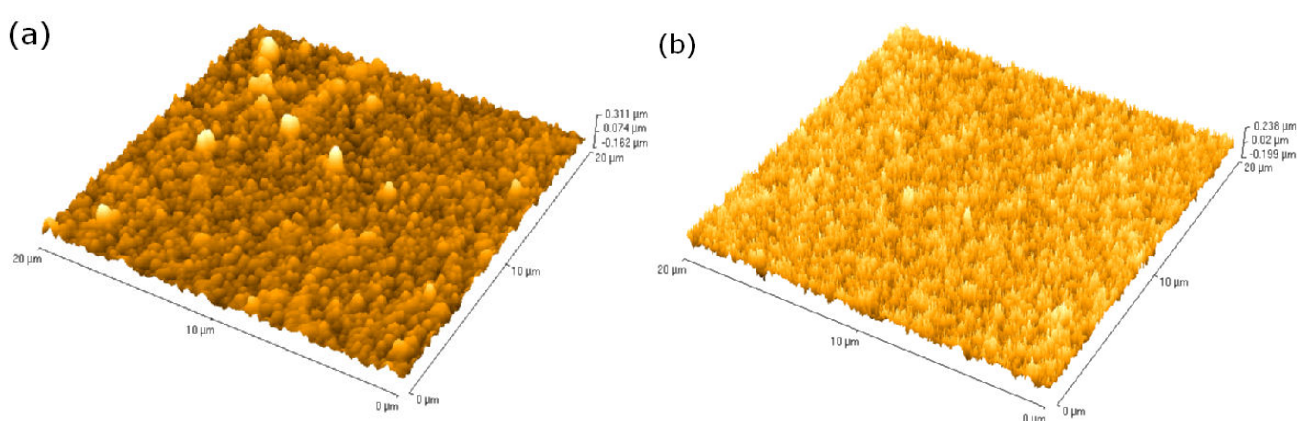


Figura 27: Imagens da topografia por AFM (a) FTO (b) FTO/P3AMF.

A deposição de P3AMF no eletrodo sugere que o filme provavelmente acompanha a topografia do FTO nas primeiras camadas de P3AMF, todavia, após sucessivos ciclos de deposição ocorre o aumento da espessura do filme, sendo possível que as depressões do FTO sejam preenchidas, sem vales para ocupar. Acredita-se que novos e numerosos picos foram formados e, em relação a estes novos picos, novas depressões apareceram, provocando um pequeno aumento na rugosidade, característica esta que pode ser vantajosa para imobilização de biomoléculas, pois aumenta a área útil no eletrodo.

A medida de contraste de fase em AFM é realizada por uma sonda que se aproxima da superfície da amostra até que a amplitude de oscilação seja metade do valor determinado na oscilação livre. Durante a varredura, estas condições são mantidas constantes, usando uma malha de realimentação. O sinal da sonda tende a se atrasar quando toca regiões mais macias, mais adesivas e tende a se adiantar em regiões mais duras [136]. Nas imagens de fase obtidas do FTO e FTO/P3AMF (Figura 28) o contraste de cor demonstra a heterogeneidade nas amostras. Observa-se uma imagem escura sem contraste de cor para o FTO, ou seja, este material não apresenta propriedades elastoméricas, pelo contrário, é um material de estrutura rígida e homogênea.

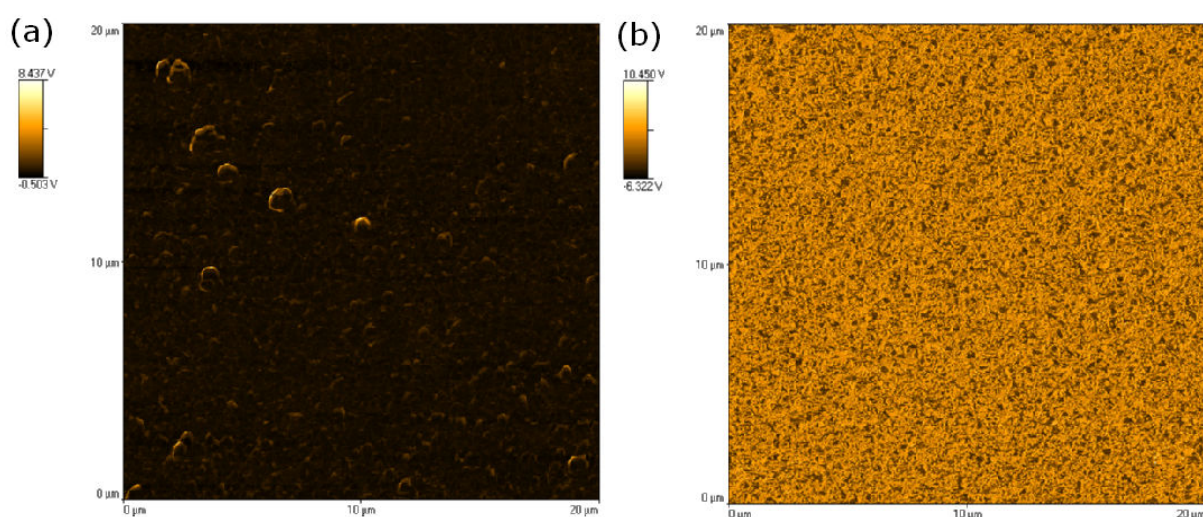


Figura 28: Contraste de fase (AFM) (a) FTO (b) FTO/P3AMF.

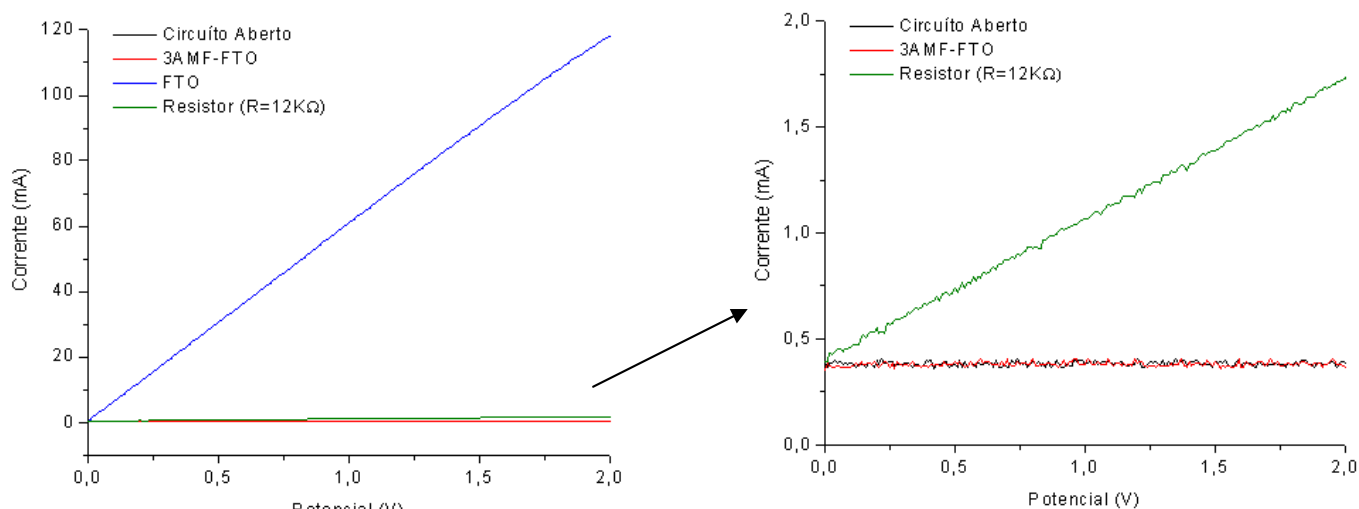
O FTO/P3AMF apresentou diferenças no contraste de cor, ou seja, é possível observar minúsculos e numerosos pontos escuros em toda superfície clara da amostra. Desta maneira, é possível observar uma heterogeneidade no material, as regiões mais claras (P3AMF) demonstram partes mais elastoméricas em contraste aos minúsculos pontos escuros que representam domínios mais rígidos, possivelmente de FTO, indicando que a camada do polímero depositado pode apresentar certa porosidade em relação ao substrato.

4.8 Medidas elétricas

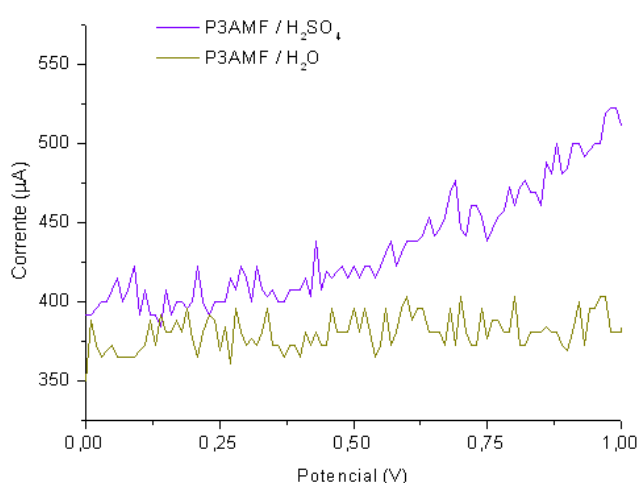
O FTO, FTO/P3AMF lavado em água e um resistor de $12\text{K}\Omega$ tiveram suas correntes monitoradas ao longo de 2V (Figura 29a).

Nota-se que o FTO e o resistor apresentam um comportamento corrente x potencial linear, todavia, na ampliação, podemos perceber que a corrente permanece constante na barreira imposta pelo P3AMF na mesma magnitude do circuito aberto, o que nos leva a concluir que nestas condições (pH neutro), este filme funciona como um isolante neste intervalo de potencial. Quando o FTO/P3AMF é lavado com solução eletrolítica de H_2SO_4 , percebe-se que ocorre um aumento de corrente ao longo de 1V (Figura 29b), ou seja, em pH ácido ocorre a protonação do filme, os contra-íons (SO_4^{2-}) estão agora inseridos na malha do polímero, sendo que estes fatores associados à porosidade do filme (seção 4.7) são justificativas da condutividade deste sistema.

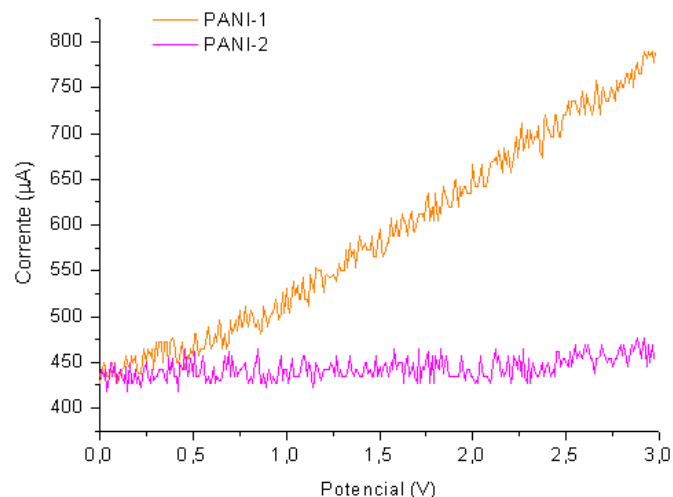
As medidas realizadas estão esquematizadas na legenda da Figura 29, e para comprovação da metodologia empregada para caracterização IV, alguns ensaios foram realizados com a polianilina (PANI) sintetizada sobre o FTO através de oxidação eletroquímica da anilina $0,1\text{ mol.L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,5\text{ mol.L}^{-1}$, por VC entre $-0,2\text{ V}$ e $0,9\text{ V}$, a 50 mV.s^{-1} . Durante a eletropolimerização da PANI, o eletrocromismo foi observado na superfície do FTO com transições de cor do amarelo para o azul, passando pelo intermediário de cor verde.



(a)



(b)



(c)

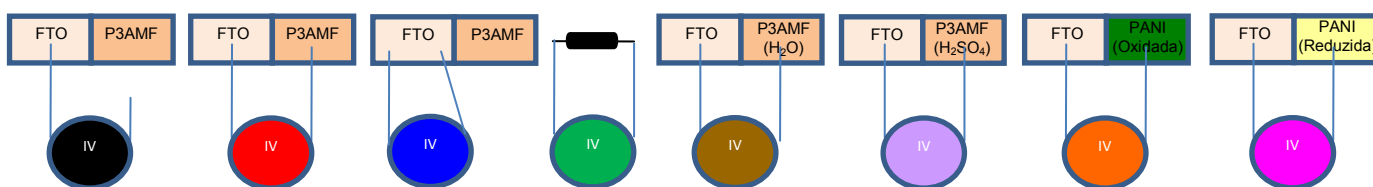


Figura 29: Caracterização elétrica IV dos filmes – (a) FTO / FTO/P3AMF / Resistor (R=12 KΩ); (b) FTO/P3AMF lavado em H_2O e solução eletrolítica de H_2SO_4 2,5 mol.L⁻¹; (c) FTO modificado com PANI; IV: Fonte.

As diferenças observadas na caracterização elétrica para ambas as amostras podem ser visualizadas na Figura 29c. A PANI-1 (verde-azulada) foi obtida finalizando a ciclização no potencial anódico superior (+0,9 V) e se mostrou condutora em um comportamento corrente x potencial linear, já a PANI-2 (amarela-esverdeada) foi obtida com a ciclização encerrada no potencial catódico inferior (-0,2 V) e se mostrou não condutora, ou seja, a corrente permaneceu constante ao aumentar o potencial de 0 a 3 V. A PANI na forma de base (não dopada) é representada por uma estrutura geral formada por y e $(1-y)$ unidades repetitivas das espécies reduzidas e oxidadas, respectivamente (Figura 30).

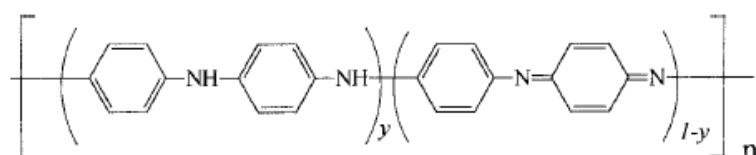


Figura 30: Estrutura da PANI na forma de base (não dopada).

A princípio, y pode variar de 0 até 1, mas duas formas extremas e uma forma intermediária são usualmente diferenciadas na literatura: a forma totalmente reduzida ($y=1$), conhecida por leucoesmeraldina (não condutora); a forma totalmente oxidada ($y=0$), a pernigranilina (não condutora), e a forma parcialmente oxidada ($y=0,5$), esmeraldina que pode ser dopada por protonação, isto é, sem que ocorra alteração no número de elétrons associados à cadeia polimérica. Logo, os nitrogênios imínicos e amínicos destas espécies podem estar total ou parcialmente protonados, dependendo do pH da solução ao qual o polímero foi exposto, obtendo-se o polímero na forma de sal (forma dopada). O sal esmeraldina é a forma estrutural onde a PANI alcança os maiores valores de condutividade [137].

Alguns estudos de PANI em FTO [138] relatam que, para ocorrer à transição da esmeraldina para pernigranilina, são necessários (+1,1 V). Sendo assim, os (+0,9 V) aplicados a PANI-1 (verde-azulada) não foram suficientes

para oxidação total, mas possibilitaram uma oxidação parcial. Em função do pH ácido de eletropolimerização, foi obtida a estrutura dopada, possivelmente a formação de sal de esmeraldina [137] o que explica a sua condução. Já a PANI-2 (amarela-esverdeada) foi encerrada de maneira reduzida (-0,2V) e se mostrou não condutora, provavelmente por estar na forma de leucoesmeraldina (totalmente reduzida).

A resistividade da superfície pode ser definida como a resistência da superfície do material à corrente elétrica em função de uma determinada área. Está medida, realizada para o FTO/P3AMF não apresentou resultados conclusivos. Todavia, Sankarapapavinasam [48] eletropolimerizou o 3AMF em platina e, usando o método das quatro pontas, determinou que a condutividade do P3AMF é da ordem de 10^{-6} a 10^{-8} S.cm⁻¹, classificando-o como um polímero semi-condutor no limiar de materiais isolantes.

4.9 Espectros de EIE

Os diagramas de Nyquist para o FTO e para o FTO/P3AMF são mostrados na Figura 31.

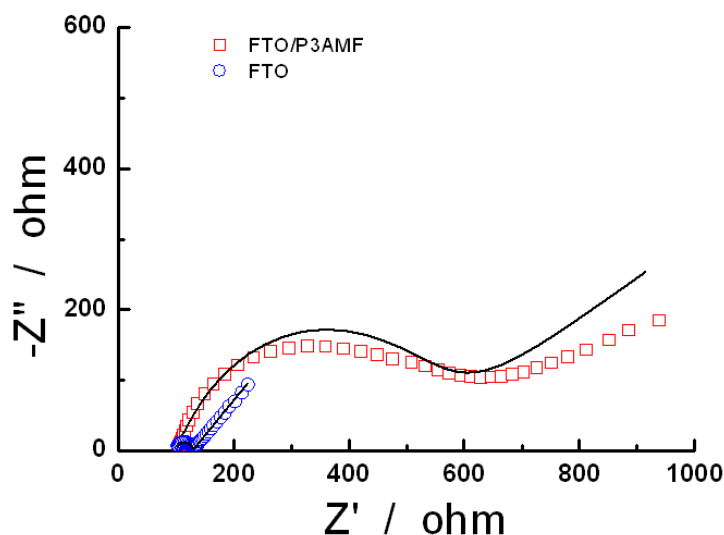


Figura 31: Diagrama de Nyquist (Z'' vs. Z') para medidas de impedância em $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 5 mmolL⁻¹/KCl 0,1 molL⁻¹ para o FTO e FTO/P3AMF;
(-) Simulação

A EIE permitiu a obtenção de resultados que possibilitou caracterizar comparativamente o FTO e o FTO/P3AMF mediante a confecção de circuitos elétricos (físico-matemáticos) que simulassem os processos de transferência eletrônica e difusional do par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (químicos) sobre a superfície do eletrodo.

A aplicação destes circuitos equivalentes tem como fundamento as similaridades entre o comportamento da célula eletroquímica e um circuito elétrico de resistores e capacitores, sendo as simulações para o FTO e FTO/P3AMF dispostas na Figura 32.

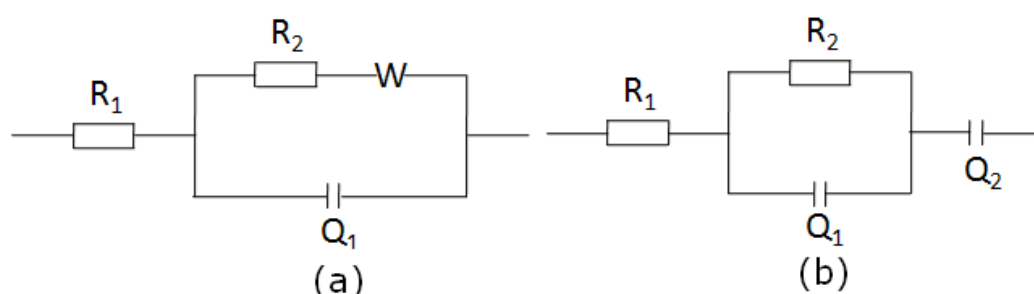


Figura 32: Circuito equivalente proposto para simulação dos dados experimentais dos eletrodos (a) FTO e (b) FTO/P3AMF.

Os resultados destes estudos por EIE mostraram para o FTO um circuito de Randles característico, explicando com eficiência o processo redox do par $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ tanto na região de alta frequência quanto em regiões de baixa frequência. Diferentemente do FTO, no FTO/P3AMF não se observou nas regiões de baixa frequência processo difusional, o que sugere a formação de uma camada polimérica bloqueadora que dificulta o processo de difusão sobre o eletrodo.

Uma mudança no circuito equivalente foi necessária para a simulação do eletrodo de FTO contendo o P3AMF eletropolimerizado, eliminando o W (referente ao processo difusional) e inserindo um capacitor em série com o circuito. Os parâmetros de ambos os circuitos estão explícitos na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros obtidos, a partir dos resultados de simulação de EIE para os eletrodos de FTO e FTO/P3AMF.

	FTO	FTO/P3AMF
$(R_1)R_s/\Omega\text{cm}^2$	98,9	93,7
$(Q_1) Qdl_1/\mu\text{Fcm}^{-2}$	16,60	91,69
n_1	0,8816	0,7858
$(R_2) R_{ct}/\Omega\text{cm}^2$	29,31	405
$W/\Omega\text{cm}^2 \text{ s}^{-1/2}$	0,02245	----
$(Q_2) Qdl_2/\text{mFcm}^{-2}$	---	4,505
n_2	---	0,35
$\chi^2/(x \cdot 10^{-3})$	1,067	75,85

Foi observado aumento no valor da resistência a transferência de carga (R_{ct}) em aproximadamente 1400%, demonstrando que o polímero formado reduz significativamente o processo de transferência eletrônica entre o eletrodo e o par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ da solução, em função de sua característica passivante, em concordância com os resultados obtidos nas caracterizações de transporte iônico (seção 4.4) e elétrica (seção 4.8). As imagens obtidas de contraste de fase de AFM (seção 4.7) mostraram cobertura quase completa da superfície o que dificulta a troca direta dos pares redox com eletrodo, o que pode ter uma significativa influência neste incremento de resistência.

Outra diferença expressiva em função da modificação do eletrodo diz respeito a um aumento de capacitância em relação ao FTO, o que sugere um aumento significativo na área superficial do eletrodo, ou seja, um aumento de grupos redox sobre a superfície do FTO.

A qualidade da simulação pode ser observada principalmente pelo parâmetro χ^2 (qui-quadrado), que apresenta o erro estatístico associado ao procedimento de simulação dos dados experimentais, sendo assim nota-se que a simulação para o FTO (10^{-3}) apresenta concordância superior a do FTO/P3AMF (10^{-2}).

Neste momento o P3AMF formado no substrato de FTO estava caracterizado como um material que apresenta atração por estruturas catiônicas repelindo estruturas aniônicas. As microscopias de FE-SEM e AFM demonstram que o revestimento do substrato é quase total e a rugosidade elevada indica um aumento de área útil desejável na imobilização de biomoléculas. A caracterização no UV/Vis, IV e EIE foram concordantes e mostraram que o P3AMF formado nas condições deste trabalho, tem um caráter não condutor, mas que poderia ser utilizado como matriz na confecção de uma sonda por ter disponível grupamentos $-NH_2$ e OH livres para bioconjugação de acordo com os espectros de FTIR. Ainda foi observado que este material não emite fluorescência, fator vantajoso para aplicá-lo em biossensor de detecção ótica na região do visível, cuja exploração dos pontos quânticos como fluoróforos constitui uma das principais investigações, todavia antes da aplicação, foi necessária a realização de experimentos para modificação do anti-cTnT, apresentados a seguir.

4.10 Detecção por "Dot blot"

4.10.1 Marcação do anti-cTnT com biotina

O esquema da Figura 33 mostra o procedimento de biotilação do anti-cTnT. O NHS-Biotina, que é insolúvel em água, foi diluído em DMSO e adicionado a solução contendo o anti-cTnT em pH 8,8 (1), a reação ficou sob agitação durante 4h, onde os grupamentos NH_2 laterais do anticorpo serviram como nucleófilos para ataque a carbonila do NHSB (2), regenerando o NHS que age com um bom grupo de saída (3).

A adição de cloreto de amônio nesta etapa é fundamental para parar o processo de biotilação. Se uma porção elevada de grupamentos NH_2 da parte Fab do anti-cTnT forem biotinilados, poderá ocorrer a invalidação do sítio específico de interação com a cTnT, ou seja, a degeneração da atividade biológica. A amônia, neste pH de 8,8 funciona com um bom nucleófilo, atacando o NHSB e convertendo-o numa amida não reativa. O anticorpo biotinilado é

separado (4) do NHSB não ligado (5) por ultra-filtrações, sendo que o volume final foi de 550µL do anti-cTnT-B em pH 7,4.

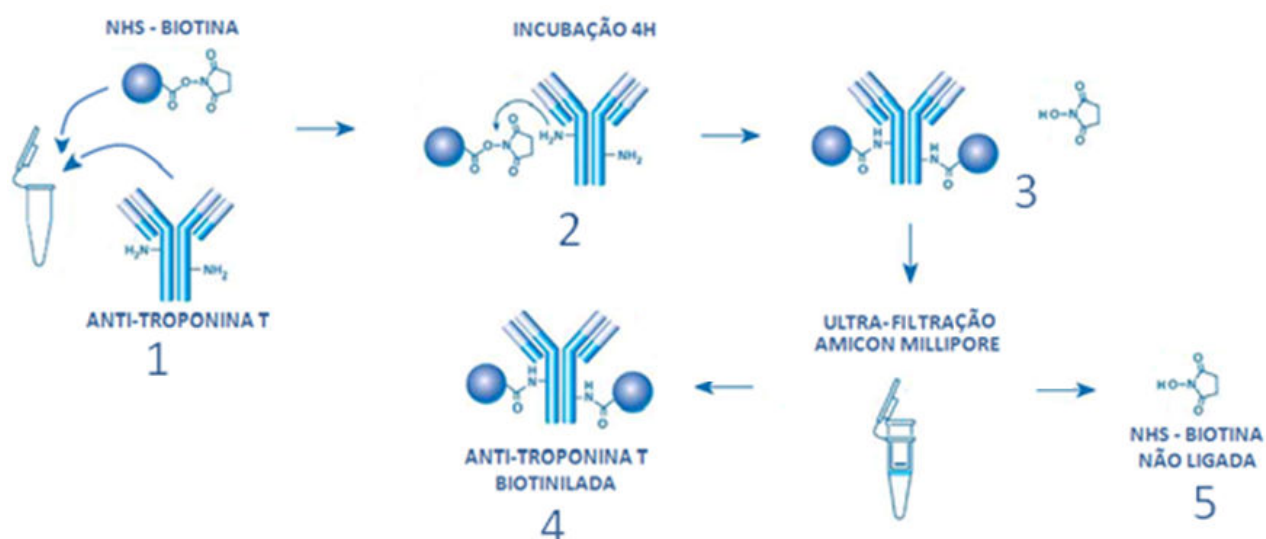


Figura 33: Esquema da biotinylation do anti-cTnT.

Na impossibilidade de uma quantificação precisa, foi considerado para os ensaios subseqüentes que toda a proteína (anti-cTnT) foi marcada, ou seja, a concentração final de 450ng/µL.

A comprovação da biotinylation foi realizada pelo ensaio de “*Dot blot*” cujos resultados podem ser visualizados na Figura 34.

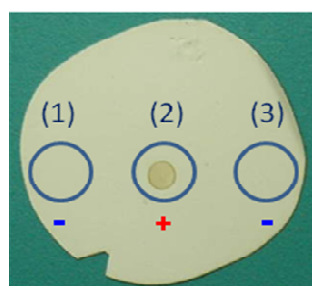
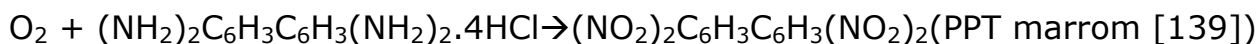
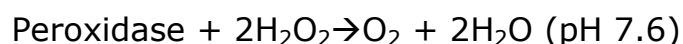


Figura 34: Ensaio de “*dot blot*” em membrana de nitrocelulose sensibilizada: em (1) com anti-cTnI e em (3) com anti-cTnT (controle negativo de proteínas irrelevantes). Em (2) com cTnT (controle positivo). A membrana foi sondada com anti-cTnT-B e S-HPR. A reação foi revelada com DAB®.

O controle positivo (2) após a ação do revelador tetracloreto de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) indicou coloração marrom em função da reação abaixo:



Já os controles (1) e (3) apresentaram resultados negativos, como era esperado, isto por que, no ponto (1), foi imobilizado anti-cTnI, que não reagiu com o anti-cTnT-B que, por sua vez, não reagiu como o S-HRP em função de eliminação durante as lavagens. Já no ponto (3) a imobilização do anti-troponina T não biotinilado não acopla com a estreptavidina justamente por não estar marcado com biotina, o que fez com que o S-HRP fosse eliminada durante a lavagem subsequente.

A única desvantagem do uso de NHSB ou sulfo-NHS-biotina é a falta de uma longa cadeia lateral. Desde o sítio de ligação para a biotina e estreptavidina, algumas moléculas de biotina podem não interagir eficientemente com a estreptavidina [118]. Todavia, através do controle positivo do ensaio de "*dot blot*", foi possível confirmar que isto não ocorreu e que a ligação do anti-cTnT-B e a S-HRP foi um sucesso. A parte Fab dos anticorpos (Figura 3 da seção 1.3) tem grupamentos NH_2 que poderiam agir também como bons nucleófilos, inviabilizando os sítios biológicos de reconhecimento anticorpo-antígeno. Todavia, o "*dot blot*" indicou que a biotinação ocorreu em grande extensão nos NH_2 das cadeias laterais dos aminoácidos, não comprometendo os sítios específicos que reconheceram o troponina T de maneira seletiva.

4.10.2 Funcionalidade do biossensor tipo "Sanduíche"

O próximo passo neste momento exigiria experimentos que nos fizessem saber se o alvo cTnT estaria disponível para ligação com dois ou mais anti-cTnT monoclonais simultaneamente. Embora o troponina T tenha um tamanho considerável (39,7KDa), possuindo vários epítomos, os anticorpos monoclonais

apresentam-se iguais entre si em estrutura, especificidade e afinidade, ligando-se por isso ao mesmo epítopo no antígeno. Neste sentido, a funcionalidade do sanduíche em "*dot blot*" atenderia as expectativas.

O esquema ilustrativo da Figura 35 mostra a detecção do troponina T após o acoplamento de todas as espécies. O anti-cTnT sensibilizado na membrana de nitrocelulose interage especificamente com o troponina T.

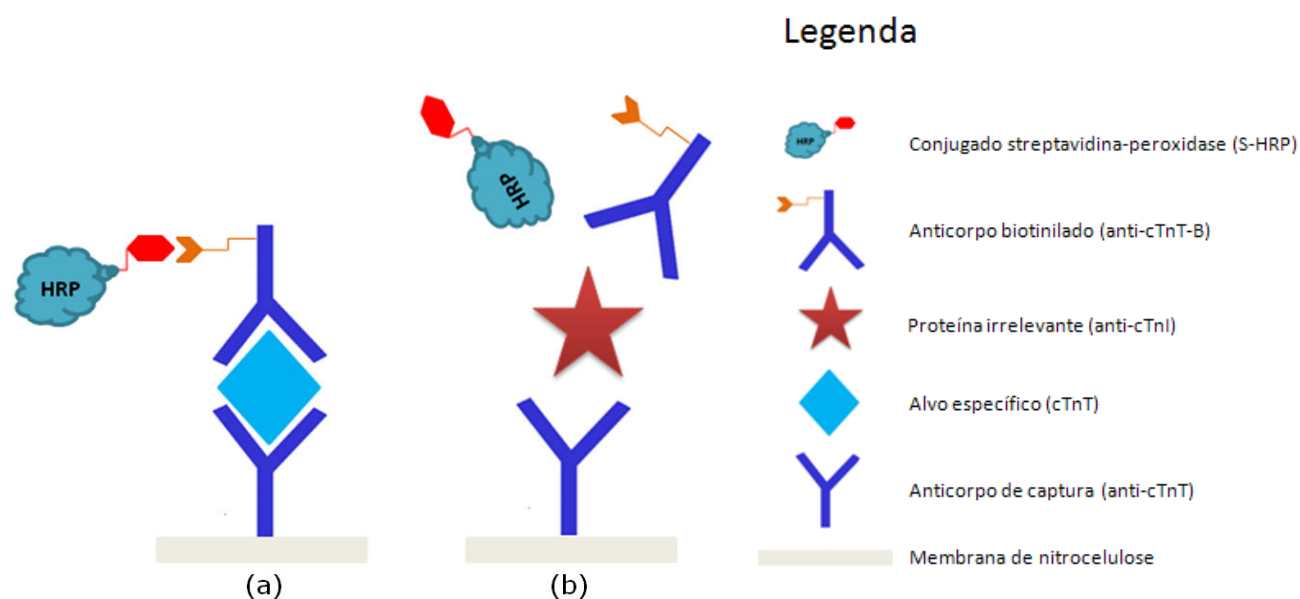
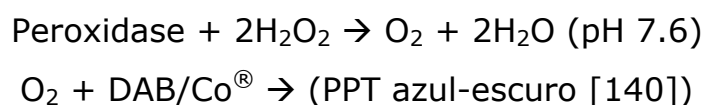


Figura 35: Esquema ilustrativo do design utilizado no ensaio de "*dot blot*" para verificação da funcionalidade do biossensor (a) Troponina T (+) (b) anti-troponina I (-).

O anti-cTnT-B deveria encontrar outros sítios ativos do Troponina T e se isso ocorrer efetivamente na última etapa o S-HRP se ligaria sendo revelado pelo DAB[®]/Co. A reação DAB tem sido potencializada pela adição de cloreto de cobalto produzindo uma coloração azul estável e resistente.



A Figura 36 expressa os resultados obtidos através do ensaio de "*dot blot*" confirmando o êxito da detecção tipo "sanduíche" para o troponina T em (1) e a seletividade do sistema quando em paralelo efetuou-se o estudo de interferente substituindo a cTnT pelo anti-cTnI em (2).

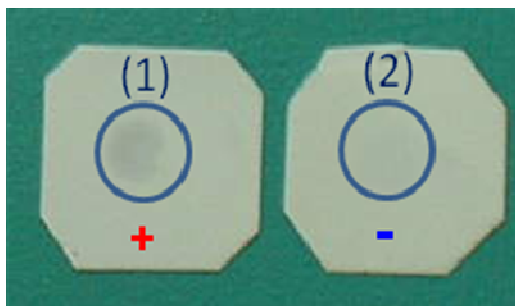


Figura 36: Ensaio de "*dot blot*" em membrana de nitrocelulose sensibilizada em (1) e (2) com anti-cTnT. Em (1) adicionado alvo específico cTnT (controle positivo) e em (2) proteína irrelevante anti-cTnI (controle negativo). As membranas foram sondadas com anti-cTnT-B e S-HRP. A reação foi revelada com DAB[®] w/Co.

Estes resultados demonstraram que o "sanduíche" funcionou perfeitamente na detecção qualitativa por ensaio de "*dot blot*", e neste sentido uma possibilidade de aplicação da matriz FTO/P3AMF que poderia substituir a membrana de nitrocelulose e consecutivamente o conjugado de quantum dots – streptavidina (S-QDs) substituindo o conjugado peroxidase-streptavidina (S-HRP) através de uma detecção quantitativa por fotoluminescência (PL). Neste sentido, a primeira etapa seria a imobilização cujos resultados são discutidos a seguir.

4.11 Imobilização do anti-cTnT no P3AMF por adsorção física

A primeira tentativa de imobilização foi pela técnica de adsorção física, por serem normalmente interações não covalentes fortes. Todavia não se obteve êxito nas detecções iniciais pela técnica de EIE, pois durante as medidas

as curvas apresentavam grande dispersão de pontos, sugerindo um processo contínuo de lixiviação do anti-cTnT durante o ensaio.

Imagens de AFM do P3AMF (Figura 37a) e a do anti-cTnT imobilizado sobre o P3AMF (Figura 37b) por adsorção física após lavagem sob agitação mostraram valores de rugosidade média (R_a) e desvio quadrático da rugosidade (R_{ms}) semelhantes, indicando que grande parte do anti-cTnT não fica retido na matriz polimérica após lavagem.

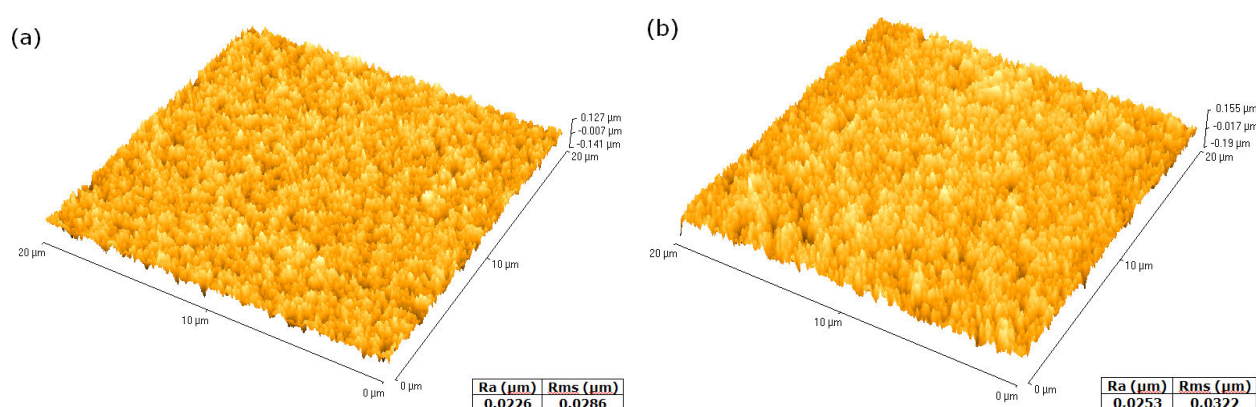


Figura 37: Imagens da topografia por AFM (a) FTO/P3AMF (b) anti-cTnT imobilizada por adsorção física em FTO/P3AM após lavagem sob agitação em PBS.

O ponto isoelétrico (pI) do anti-cTnT é aproximadamente 6,9 e as imobilizações são realizadas em pH 7,4, ou seja acima do pI , o que nos leva a entender que o anti-cTnT está carregado negativamente e como a matriz FTO/P3AMF também tem caráter negativo a repulsão entre as cargas foi um impedimento para a imobilização efetiva por adsorção física.

4.12 Imobilização do anti-cTnT no P3AMF por ligação covalente

Em função da lixiviação detectada durante a imobilização por adsorção física, uma segunda opção foi invocada, e intentou-se ligar covalentemente

através do sistema carbodiimida (EDC/NHS) os grupamentos NH_2 livres do FTO/P3AMF aos grupos carboxila da parte Fc do anti-troponina T.

Em contrapartida, várias desvantagens têm que ser superadas durante o procedimento reacional, sendo que o risco de ocorrer uma auto-polimerização [118] nas moléculas de anticorpos é considerável, uma vez que estas proteínas apresentam em seu esqueleto ambos os grupos funcionais (NH_2 e COOH), ou seja, a possibilidade de uma molécula do anti-cTnT ligar-se a outra idêntica e não ao NH_2 livre do P3AMF deveria ser contornada, uma vez que isto poderia inativar os sítios biológicos que interagem com o antígeno. Isso foi contornado controlando o tempo de ativação da carboxila do anticorpo, ou seja, a mistura de EDC/NHS na solução do anti-cTnT foi homogeneizada rapidamente e em alguns poucos instantes esta solução já formava um filme líquido sobre a área modificada com P3AMF em cada eletrodo de aproximadamente 1 cm^2 .

Na sequência a reação foi feita “*over night*” a 4°C para minimizar as perdas das características funcionais e obter rendimentos de acoplamento de até 85 % [141].

A glicina foi utilizada para inativar os grupamentos succinimidas do anti-cTnT evitando que esses possam reagir covalentemente com biomoléculas podendo levar a ocorrência de resultados falso-positivos [118].

A literatura reporta uma grande quantidade de sondas constituídas em que os grupos carboxila da matriz estão dispostos para ligação via carbodiimida [142]. Todavia, é possível também o oposto (Figura 38), ou seja, ligar covalentemente grupos NH_2 da superfície aos grupamentos carboxila das biomoléculas [143].

As proteínas, como o anti-cTnT e peptídeos, podem ser bioconjugadas via EDC/NHS na faixa de pH entre 4,5-7,5, sendo que acima deste limite superior começa a ocorrer queda de rendimento em função da hidrólise do intermediário o-acilisouréia, reconstituindo o ácido carboxílico e liberando isouréia [118]. A bioconjugação do anti-cTnT na matriz de FTO/P3AMF foi viabilizada em $\text{pH} = 7,4$, sendo os sítios biológicos preservados, configurando uma sonda eficiente na detecção do troponina T pelas técnicas de impedância “*label free*” e

fotoluminescência de quantum dots “label” apresentadas nas seções 4.13 e 4.14 respectivamente.

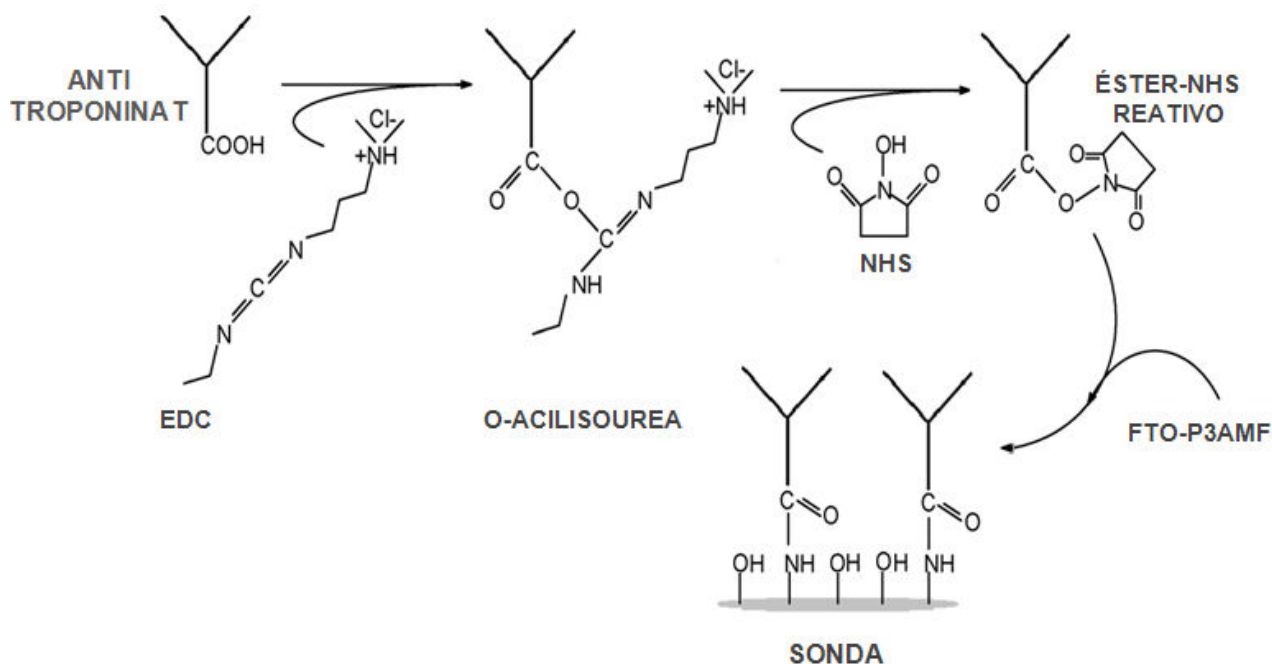


Figura 38: Representação esquemática da ligação covalente do anti-cTnT via EDC/NHS com a matriz FTO/P3AMF.

4.13 Detecção da cTnT por EIE “label free”

Usando a sonda (Figura 38), foi possível detectar a cTnT e verificar a seletividade do biossensor, realizando um estudo de interferente com o anti-cTnI, conforme Figura 39.

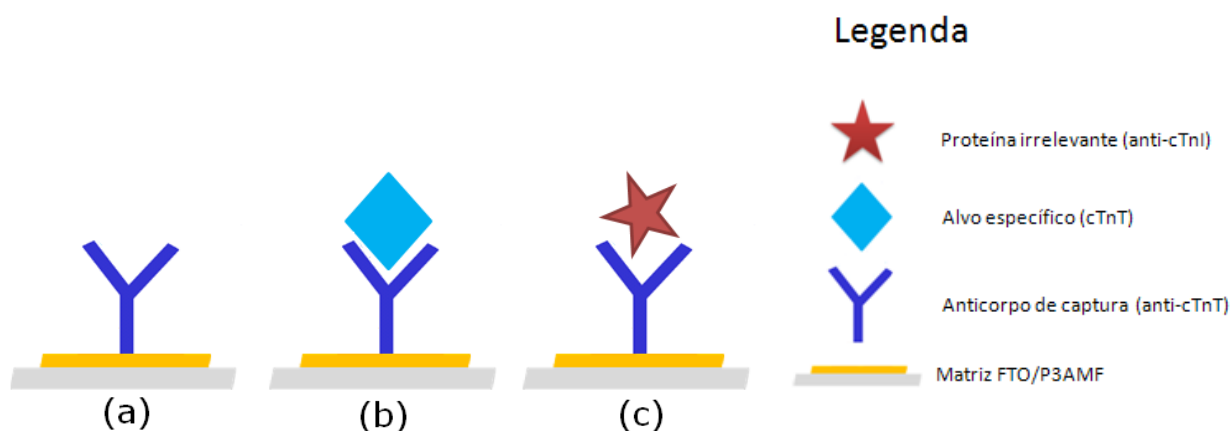


Figura 39: Esquema ilustrativo do design utilizado na detecção por EIE
(a) Sonda (b) Troponina T (+) (c) Anti-Troponina I (-).

O espectro de impedância para os 3 sistemas (Figura 40) permite uma visualização deste sistema de detecção sendo apresentados como diagramas de Nyquist.

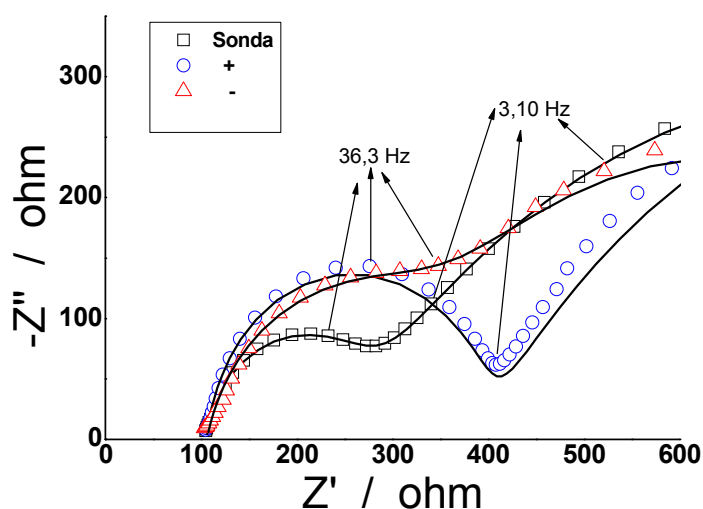


Figura 40: Diagrama de Nyquist (Z'' vs. Z') para medidas de impedância em $\text{Fe(CN)}_6^{3-}/\text{Fe(CN)}_6^{4-}$ $5 \text{ mmolL}^{-1}/\text{KCl } 0,1 \text{ molL}^{-1}$ para a sonda, o controle (+) Troponina T e o controle (-) Anti-troponina I; (-) Simulação

Estes diagramas de Nyquist possibilitaram a construção de circuito equivalente único (Figura 41), cujas simulações apresentaram valores de χ^2 da ordem de 10^{-3} (Tabela 2), apoiando um baixo erro estatístico na simulação dos dados experimentais.

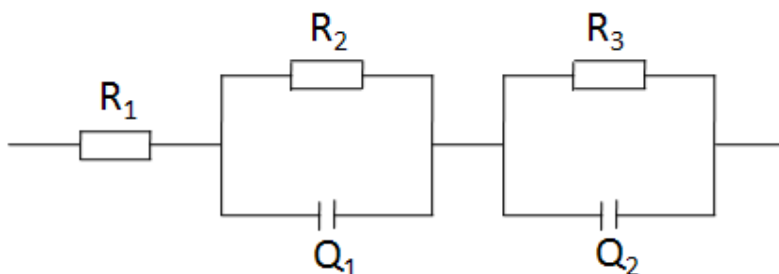


Figura 41: Circuito equivalente proposto para simulação dos dados experimentais para o sistema (a), (b) e (c) da Figura 49

Tabela 2: Parâmetros obtidos, a partir dos resultados de simulação EIE para o imunossensor na presença do alvo (+) e (-) para marcador de lesão cardíaca

	Anti-troponina T (Sonda)	Controle +	Controle -
$(R_1) R_s/\Omega\text{cm}^2$	103,9	105,8	104,6
$(Q_1) Q_{dl1}/\mu\text{F cm}^{-2}$	27,19	18,05	35,92
n_1	0,9115	0,9384	0,8553
$(R_2) R_{ct}/\Omega\text{cm}^2$	155,9	289,5	161
$(Q_2) Q_{dl2}/\mu\text{Fcm}^{-2}$	1,092	4,162	0,3520
N_2	0,6290	0,6568	0,7651
$(R_3) R_{ct}/\Omega\text{cm}^2$	1069	1078	580
$\chi^2/(x 10^{-3})$	2,980	27,89	7,763

Os espectros de detecção apresentaram dois semi-círculos no intervalo de frequência entre 10^6 a 10^{-2} Hz. Os resultados do primeiro semi-círculo (transferência de carga) trazem informações analíticas relevantes, uma vez que a cTnT (controle positivo) ligada à sonda faz com que o valor de R_{ct} seja aproximadamente o dobro, em função de uma camada adicional (cTnT), demonstrando que mesmo a lavagem do sistema sob agitação em PBS não foi o suficiente para remover o alvo, ou seja, o biorreconhecimento entre o anti-cTnT e a cTnT bloqueia a superfície do eletrodo com conseqüente repulsão do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$. O estudo de interferente realizado em paralelo substitui o alvo específico pelo inespecífico anti-cTnI (controle negativo), mas a lavagem deste sistema sob agitação em PBS promove a retirada deste anticorpo pelo fato de ($R_{ct}=165,7 \Omega$) ser semelhante ao da sonda ($R_{ct}=155,9 \Omega$), ou seja, não ocorre a interação entre sonda e alvo inespecífico sobre a superfície do eletrodo. O parâmetro R_{tc} representando o principal parâmetro para avaliar a seletividade do imunossensor impedimétrico [66].

Neste trabalho o marcador de lesão cardíaca troponina T foi detectado pelo imunossensor impedimétrico proposto "label free" na concentração de $0,5 \mu\text{molL}^{-1}$.

4.14 Detecção da cTnT por fotoluminescência de quantum dots "label"

A geometria óptica real utilizada na detecção por fotoluminescência está disponível na Figura 42.

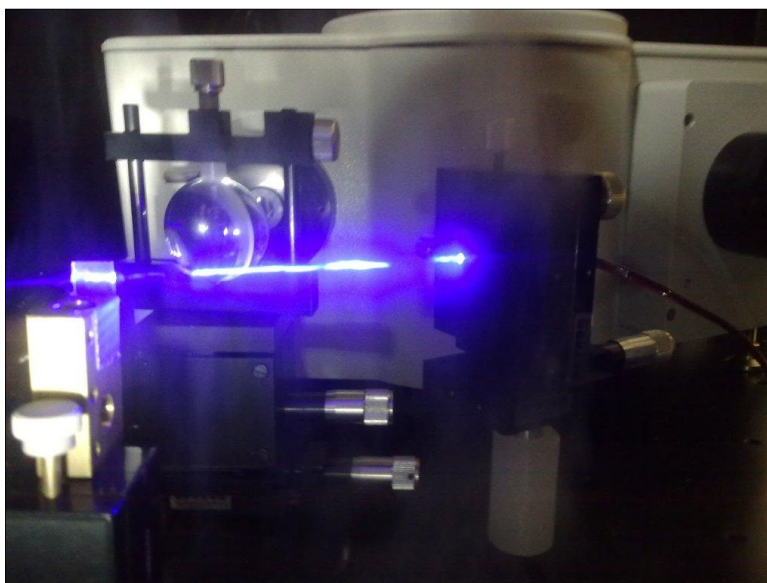


Figura 42: Esquema óptico real utilizado na fotoluminescência para detecção do troponina T através de QDs de CdSe/ZnS como marcadores.

Sobre a sonda (Figura 38) foi gotejado em seqüência: o alvo específico cTnT, anti-cTnT-B e S-QDs cujo design está disponível na Figura 43. Os estudos de seletividade foram realizados com a anti-cTnI funcionando como alvo inespecífico (proteína irrelevante), sendo que este anticorpo está presente em amostras reais de pessoas com lesões cardíacas. As lavagens sob agitação em PBS foram realizadas entre todas as etapas para remover as biomoléculas que não tinham afinidade com o sistema, semelhante ao ELISA.

A detecção do alvo específico pela luminescência dos pontos quânticos foi possível em função da engenharia molecular (nanobiotecnologia) usando principalmente a modificação da molécula do anti-cTnT, acoplando a biotina e se beneficiando da elevada especificidade entre os componentes do sistema biotina-estreptavidina e antígeno-anticorpo (Figura 43b). Em contrapartida, o

alvo inespecífico (Figura 43c) na posição “chave” impossibilita o acoplamento do “sanduíche” e, tanto o material biológico quanto os pontos quânticos na última etapa, deverão ser retirados durante cada procedimento de lavagem.

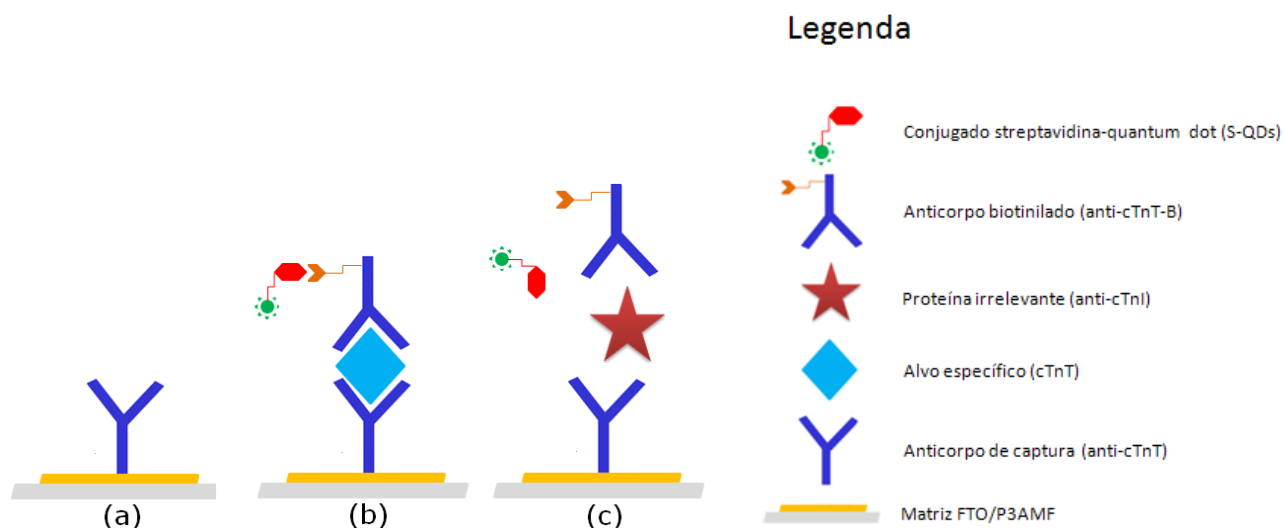


Figura 43: Esquema ilustrativo do design utilizado na detecção por fotoluminescência (a) Sonda (b) Troponina T (+) (c) Anti-troponina I (-).

O S-QDs emite luminescência em 525 nm. Os espectros de fotoluminescência para a sonda, controle positivo e controle negativo estão disponíveis na Figura 44, sendo a emissão em 660 nm intrínseca ao FTO.

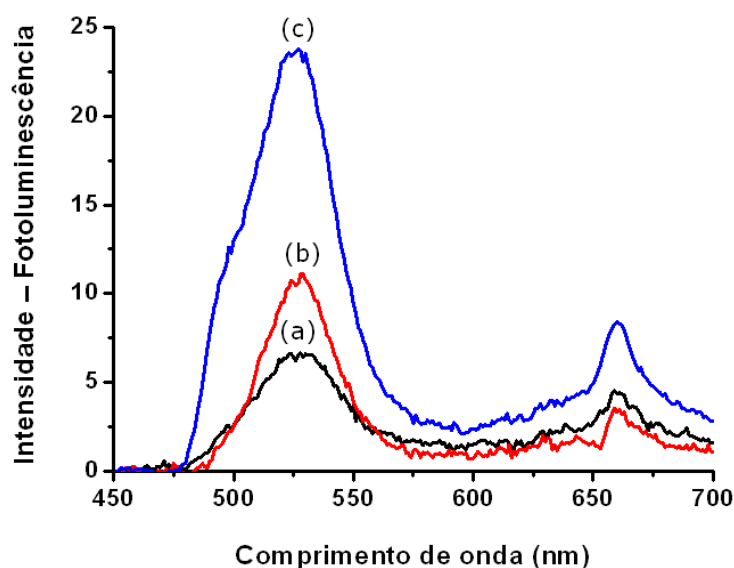


Figura 44: Espectros de fotoluminescência (a) Sonda (b) Anti-troponina I (-) (c) Troponina T (+).

Comparando a intensidade da fotoluminescência entre a sonda (Figura 44a) e o controle positivo (Figura 44c) verifica-se uma relação de intensidade positivo/sonda de 4 apoiando o sucesso no acoplamento do sistema tipo “sanduíche” exposto na Figura 43b. Evidentemente não poderíamos encontrar sinal quando medidas de fotoluminescência foram realizadas no sistema da Figura 43a, todavia a sonda está sem o analito (apenas foi adicionado o S-QDs), apresentando um pequeno sinal (Figura 44a), que pode ser justificado pela adsorção inespecífica do S-QDs no sensor. Em função de sua pequena escala (≤ 25 nm), eles penetram facilmente em superfícies porosas, sendo sua remoção dificultada.

Nos estudos de interferentes, as medidas realizadas para o controle negativo, cujo design está exposto na Figura 43c apresentou um pequeno aumento de sinal em relação à sonda (Figura 43a). Isto é atribuído a falta de otimização das lavagens, principalmente no binômio rotação x tempo, um ponto crítico deste biossensor tipo “sanduíche”, possivelmente por que não está sendo eficiente a remoção de moléculas inespecíficas, ou seja, os resíduos de anticorpos modificados com biotina estão fazendo com que o S-QDs fique retido e apresente um resposta de intensidade negativo/sonda de 2 (Figura 44 a e b).

Neste imunossensor proposto (“*label*”) através da detecção da fotoluminescência de pontos quânticos CdSe/ZnS foi possível detectar indiretamente o marcador de lesão cardíaca cTnT na concentração de $0,5 \mu\text{molL}^{-1}$.

5 - Conclusões e perspectivas futuras

Foi possível eletrodepositar por voltametria cíclica o poli(3-aminofenol) (P3AMF) derivado da polianilina em eletrodos de FTO em varias condições, sendo que a quantidade de material formado é proporcional ao potencial catódico e conseqüentemente a corrente de redução do material eletroativo entre -0,2 e 0,2 V, sendo que o filme depositado apresentou espessura máxima de 375 ± 75 nm.

O espectro de absorção UV do P3AMF demonstrou absorção entre 300 e 350 nm proporcional a quantidade de material formado. Já a fluorescência para este material foi descartada, fato vantajoso para utilizar esta matriz como biossensor de detecção óptica, de modo que todo o espectro do visível estaria disponível para um sinal somente associado ao alvo de interesse.

O P3AMF formado apresenta resistência à transferência eletrônica do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$ e age como facilitador da troca iônica da sonda $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{+2}$. Estudos de troca iônica exclusivos em solução de KCl mostraram retenção do $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{+2}$, mas não apresentaram o mesmo efeito para o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$, indicando que material formado apresenta atração por estruturas catiônicas e repulsão por estruturas aniônicas.

As imagens de FE-SEM associadas às imagens de AFM mostraram que praticamente toda superfície é recoberta nas condições deste trabalho e que a rugosidade do FTO é superada pela criação, após sucessivos ciclos, de novas ilhas e vales, o que torna desejável a imobilização em função do acréscimo de área útil.

Os aspectos físicos de condução de corrente elétrica em função do potencial (IV) do P3AMF em comparação com a PANI oxidada e reduzida, assim como estudos de pH nos permitem concluir que o material formado, ao contrário da PANI (sal de esmeraldina) apresenta caráter passivante, o que pode ser reforçado através dos resultados de impedância em pH neutro para o P3AMF, que comprovou aumento da resistência do sistema de 1400% em

relação ao FTO. Entretanto, em meio eletrolítico (ácido sulfúrico) o P3AMF apresenta aumento de condutividade.

Os espectros de FTIR indicam a presença de grupamentos NH_2 livres, pode ser comprovada em função do sucesso da imobilização do anti-cTnT por ligação covalente.

A imobilização por adsorção do anti-cTnT no P3AMF não foi relevante, uma vez que as imagens de AFM mostraram pequenas diferenças nos valores de rugosidade entre o material antes e após a imobilização, levando a conclusão de que após a lavagem a lixiviação dos anticorpos é elevada. Isto está associado ao fato deste material ser repulsivo a parte Fc dos anticorpos, que apresenta predominantemente carbonilas (estruturas aniônicas), sugerindo que esta imobilização pode ser efetiva em filmes poliméricos que apresentarem caráter catiônico.

A biotinylation do anti-troponina T foi um sucesso confirmado pela técnica de "*dot blot*", o que proporcionou ainda informações importantes, indicando que a região marcada com biotina do anticorpo seria adequadamente as cadeias de NH_2 laterais, não inviabilizando os sítios específicos da parte Fab responsáveis pela interação com o troponina T.

Ainda por esta técnica, foi possível detectar seletivamente a cTnT, demonstrando que o esquema "sanduíche" cujo alvo ocupa a posição "chave" estaria disponível para fazer duas ligações com o anti-cTnT em posições distintas, mas com a mesma especificidade de biorreconhecimento. Estes aspectos foram decisivos para aplicação da matriz de P3AMF em FTO em biossensores, pois além de uma detecção direta por impedância "*label free*", agora poderíamos construir um biossensor com marcador para a detecção indireta da cTnT, substituindo o S-HRP do "*dot blot*" por um cromóforo ou corante, sendo os pontos quânticos alvo de exploração do trabalho.

Outro aspecto relevante neste trabalho diz respeito à substituição da membrana de nitrocelulose do "*dot blot*" pela matriz de P3AMF. A imobilização do anti-cTnT foi viabilizada ligando covalentemente via carbodiimida os grupamentos de aminas primárias livres na malha polimérica aos carboxilatos do anticorpo, sendo que isto ocorreu com eficácia comprovada, pois esta sonda

foi utilizada com sucesso na detecção direta impedimétrica "*label free*" do troponina T.

Todos estes aspectos levaram a detecção indireta pela fotoluminescência de quantum dots de CdSe, o que proporcionou espectros com respostas significativas, cujas alturas de meia banda estão em torno de 50nm. Este fato está associado a alto padrão de uniformidade de tamanho do material utilizado (S-QDs) tornando a técnica atrativa do ponto de vista analítico, uma vez que a intensidade do sinal pode ser facilmente associada à concentração do analito.

Concluí se que o P3AMF eletropolimerizado em FTO pode ser usado como transdutor eletroquímico e óptico na construção de imunossensores impedimétricos "*label free*" e fotoluminescentes "*label*", respectivamente. Neste trabalho, ambos biossensores construídos foram capazes de detectar seletivamente o marcador para lesão cardíaca cTnT na concentração de 0,50 μmolL^{-1} .

Para continuidade dos estudos é necessário aperfeiçoar o biossensor desenvolvido por engenharia molecular para detecção óptica indireta do troponina T, via luminescência de QDs em limites de analíticos equivalentes ao ELISA ($10^{-13} \text{ molL}^{-1}$), para detecção em amostras humanas em tempo real.

6 - Referências Bibliográficas

-
- [1] Infarto agudo do miocárdio. Disponível em: <http://www.bancodesaude.com.br/infarto-miocardio/infarto-agudo-miocardio>. Acesso em fevereiro de 2011.
- [2] Heart Attack. National Heart Lung and Blood Institute (EUA). Disponível em: http://www.nhlbi.nih.gov/health/dci/Diseases/HeartAttack/HeartAttack_WhatIs.html. Acesso em fevereiro de 2011.
- [3] B. H. Hamilton, J. E. Hollander, Diagnosing acute coronary syndrome in the ED: Improvements from the first decade of the twenty-first century. *Emergencias* **22**:293-300 (2010).
- [4] Laboratório análise. Disponível em: <http://www.labanalise.com.br>. Acesso em fevereiro de 2011.
- [5] R. F. Dutra, L. T. Kubota, An SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyl dextran-modified gold chip. *Clinical Chemical Acta* **376**:114-120 (2007).
- [6] L. Tymecki, R. Koncki, Thick-film potentiometric biosensor for bloodless monitoring of hemodialysis, *Sensor and Actuators B* **113**: 782-786 (2006).
- [7] J. C. Chen, H. H. Chung, C. T. Hsu, D. M. Tsai, A. S. Kumar, J. M. Zen, A disposable single-use electrochemical sensor for the detection of uric acid in human whole blood, *Sensors and Actuators B: Chemical* **110**: 364-369 (2005).
- [8] K. Kerman, M. Kobayashi, E. Tamiya, Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology. *Measurement Science and Technology* **15**:1-11 (2004).

-
- [9] S. Cosnier, Biosensors based on electropolymerized films: new trends. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **377**:507-520 (2003).
- [10] F. Lucarelli, S. Tombelli, M. Minunni, G. Marrazza, M. Mascini, Electrochemical and piezoelectric DNA biosensors for hybridisation detection. *Analytica Chimica Acta* **609**:139–159 (2008).
- [11] M. M. Gvozdenović, B. Z. Jugović, D. I. Bezbradica, M. G. Antov, Z. D. Knezevic-Jugović, B. N. Grgur, Electrochemical determination of glucose using polyaniline electrode modified by glucose oxidase. *Food Chemistry* **124**:396–400 (2011).
- [12] Y. Lei, W. Chen, A. Mulchandani, Microbial biosensors. *Analytica Chimica Acta*, **568**:200-210 (2006).
- [13] B. Hock, Antibodies for immunosensors a review. *Analytica Chimica Acta*, **347**:177-186 (1997).
- [14] G. Liu, Y. Lin, Nanomaterial labels in electrochemical immunosensors and immunoassays. *Talanta*, 74:308-317 (2007).
- [15] P. D'Orazio, Biosensors in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, **334**:41-69 (2003).
- [16] D. C. Benjamin, J. A. Berzofsky, I. J. East, F. R. N. Gurd, C. Hannum, S. J. Leach, E. Margoliash, J. G. Michael, A. Miller, E. M. Prager, M. Reichlin, E. E. Sercarz, S. J. Smith-Gill, P. E. Todd, A. C. Wilson, The antigenic structure of proteins: A reappraisal. *Annual Review of Immunology* **2**:67-101 (1984).
- [17] G. S. Nunes, Métodos imunoquímicos para análise de contaminantes ambientais: conceitos, estado da arte e perspectivas. *Química Nova* **28**:462-471 (2005).

-
- [18] R. C. Patacas, Desenvolvimento, caracterização e optimização de um biossensor amperométrico para a determinação de nitrato baseado em microinterfaces gelificadas. Dissertação de Mestrado, 2007, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- [19] K. Ramanathan, M. A. Bangar, M. Yun, W. Chen, N. V. Myung, A. Mulchandani, Bioaffinity Sensing Using Biologically Functionalized Conducting-Polymer Nanowire. *Journal of the American Chemical Society* **127**:496-497 (2005).
- [20] K. Ramanathan, S. S. Pandey, R. Kumar, A. Gulati, A. S. Murthy, B. D. Malhotra, Covalent immobilization of glucose oxidase to poly(*o*-amino benzoic acid) for application to glucose biosensor. *Journal of Applied Polymer Science* **78**:662-667 (2000).
- [21] S. R. Mikkelsen, E. Corton, Bioanalytical Chemistry. John Wiley and Sons, 2004, New Jersey.
- [22] S. K. Sharma, N. Sehgal, A. Kumar, Biomolecules for development of biosensors and their applications. *Current Applied Physics* **3**:307-316 (2003).
- [23] A. Turner, I. Karube, G. Wilson, Biosensors: Fundamentals and Applications. Oxford University Press, 1987, Oxford, cap.6.
- [24] M. Gerard, A. Chaubey, B. D. Malhotra, Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* **17**:345-359 (2002).
- [25] F. Ying-Sing, S. Shi-Hui, Z. De-Rong, Piezoelectric crystal for sensing bacteria by immobilizing antibodies on divinylsulphone activated poly-*m*-aminophenol film. *Talanta* **51**:151-158 (2000).

-
- [26] B. D. Malhotra, A. Chaubey, S. P. Singh, Prospects of conducting polymers in biosensors. *Analytica Chimica Acta*, **578**:59-74 (2006).
- [27] A. Chaubey, M. Gerard, R. Singhal, V. S. Singh, B. D. Malhotra, Immobilization of lactate dehydrogenase on electrochemically prepared polypyrrole-polyvinylsulphonate composite films for application to lactate biosensors. *Electrochimica Acta*, **46**:723-729 (2001).
- [28] A. S. Afonso, Desenvolvimento de sensor bioeletroquímico para detecção de Hanseníase. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, (2008).
- [29] D. Kumar, C. Sharma, Advances in conductive polymers. *European Polymer Journal* **34**:1053-1060 (1998).
- [30] G. Harsányi, Polymer films in sensor applications: a review of present uses and future possibilities. *Sensor Review* **20**:98-105 (2000).
- [31] B. Adhikar, S. Majumdar, Polymers in sensor applications. *Progress in Polymer Science* **29**:699-766 (2004).
- [32] G. Inzelt, Conducting polymers: A new era in electrochemistry. *Croatica Chemica Acta* **82**:307-312 (2009).
- [33] M. Atesa, A. S. Sarac, Conducting polymer coated carbon surfaces and biosensor applications. *Progress in Organic Coatings* **66**:337-358 (2009).
- [34] L. Xia, Z. Wei, M. Wan, Conducting polymer nanostructures and their application in biosensors. *Journal of Colloid and Interface Science* **341**: 1-11 (2010).

-
- [35] T. A. Skotheim, Handbook of organic conductive molecules and polymers, Marcel Dekker, Nova York, (1986).
- [36] C. Lai, G. R. Li, Y. Y. Dou, X. P. Gao, Mesoporous polyaniline or polypyrrole/anatase TiO₂ nanocomposite as anode materials for lithium-ion batteries. *Electrochimica Acta* **55**:4567-4572 (2010).
- [37] C. Li, S. Mu, Electrochromic properties of sulfonic acid ring-substituted polyaniline in aqueous and non-aqueous media. *Synthetic Metals* **144**:149-149 (2004).
- [38] C. Bian, A. Yu, De-doped polyaniline nanofibres with micropores for high-rate aqueous electrochemical capacitor. *Synthetic Metals* **160**:1579-1583 (2010).
- [39] A. A. Hermas, M. Nakayama, K. Ogura, Enrichment of chromium-content in passive layers on stainless steel coated with polyaniline. *Electrochimica Acta* **50**:2001-2007 (2005).
- [40] A. F. Diaz, J. A. Logan, Electroactive polyaniline films. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 111:111-114 (1980).
- [41] R. Noufi, A. J. Nozik, J. White, L. F. Warren, Enhanced Stability of Photoelectrodes with Electrogenerated Polyaniline Films. *Journal of the Electrochemical Society* 129:2261-2265 (1982).
- [42] F. D'Eramo, M. A. Zón, H. Fernández, L. Sereno, A. H. Arévalo, Studies of a novel conducting polymer by cyclic and square wave voltammetries: Its synthesis and characterization. *Electrochimica Acta* **53**:7182-7190 (2008).

-
- [43] C.-Y., Chung, T.-C, Wen, A. Gopalan, Identification of electrochromic sites in poly(diphenylamine) using a novel absorbance-potential-wavelength profile. *Electrochimica Acta*, **47**:423-431 (2001).
- [44] D. Pan, J. Chen, L. Nie, W. Tao, S. Yao, Amperometric glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in electropolymerized o-aminophenol film at Prussian blue-modified platinum electrode. *Electrochimica Acta* **49**:795-801 (2004).
- [45] A. G. B. Madurro, L. F. Ferreira, S. N. Vieira, R. G. Ariza, L. R. G. Filho, J. M. Madurro, Immobilization of purine bases on a poly-4-aminophenol matrix. *Journal of Materials Science* **42**:3238-3243 (2007).
- [46] S. N. Vieira, L. F. Ferreira, D. L. Franco, A. S. Afonso, R. A. Gonçalves, A. G. B. Madurro, J. M. Madurro, Electrochemical Modification of Graphite Electrodes with Poly(4-aminophenol). *Macromolecular Symposia* **245-246**:236-242 (2006).
- [47] S. Taj, M. F. Ahmed, S. Sankarapavinasam, Electro-oxidative polymerization of -aminophenol. *Synthetic Metals* **52**:147-158 (1992)
- [48] Sankarapavinasam, S. Kinetics and mechanism of electropolymerization of aminophenol. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*. **31**:1105-1109 (1993).
- [49] J. Zhang, D. Shan, S. Mu, Electrochemical copolymerization of aniline with m-aminophenol and novel electrical properties of the copolymer in the wide pH range. *Electrochimica Acta* **51**:4262-4270 (2006).

-
- [50] Z. Wang, H. Zhu, H. Zhang, G. Gao, Z. Sun, H. Liu, X. Zhao, Fabrication of the single-wall carbon nanotube compound polymer film electrode and the simultaneous electrochemical behavior of aminophenol isomers. *Electrochimica Acta* **54**:7531-7535 (2009).
- [51] Y. Nakabayashi, K. Yoshikawa, Amperometric Biosensors for Sensing of Hydrogen Peroxide Based on Electron Transfer between Horseradish Peroxidase and Ferrocene as a Mediator. *Analytical Sciences* **16**:609-613 (2000).
- [52] P. Kara, N. C. Pradhanb, B. Adhikaria, Application of sulfuric acid doped poly (m-aminophenol) as aliphatic alcohol vapor sensor material. *Sensors and Actuators B: Chemical* **140**:525-531 (2009).
- [53] F. Ying-Sing, Si. Shi-Hui, Z. De-Rong, Piezoelectric crystal for sensing bacteria by immobilizing antibodies on divinylsulphone activated poly-m-aminophenol film. *Talanta* **51**:151-158 (2000).
- [54] K.-D. Seo, K.-P. Lee, A. I. Gopalan, S. J. Chung, Y. T. Lim, S.-H. Choi, Horseradish Peroxidase (HRP) Immobilized Poly (aniline-co-m-aminophenol) Film Electrodes-fabrication and Evaluation as Hydrogen Peroxide Sensor. *Sensors* **7**:719-729 (2007).
- [55] Y. Nakabayashi, M. Wakuda, H. Imai, Amperometric glucose sensors fabricated by electrochemical polymerization of phenols on carbon paste electrodes containing ferrocene as electron transfer mediator. *Analytical Sciences* **14**:1069-1077 (1998).
- [56] A. Curulli, S. Kelly, C. O. Sullivan, G. G. Guilbault, G. Palleschi, A new interference-free lysine biosensor using a non-conducting polymer film. *Biosensors and Bioelectronics* **13**:1245-1250 (1998).

-
- [57] E. Akyilmaz, O. Kozgus, H. Türkmen, B. Çetinkaya, A mediated polyphenol oxidase biosensor immobilized by electropolymerization of 1,2-diamino benzene. *Bioelectrochemistry* **78**:135-140 (2010).
- [58] D. A. Fungaro, C. M. A. Brett, Eletrodos modificados com polímeros perfluorados e sulfonados: aplicações em análises ambientais. *Química Nova* **23**:805-811 (2000).
- [59] F. Breme, J. Buttstaedt, G. Emig, Coating of polymers with titanium-based layers by a novel plasma-assisted chemical vapor deposition process. *Thin Solid Films*, **377-378**:755-759 (2000).
- [60] E. P. Plueddemann, P. G. Pape, Methods for improving the performance of silane coupling agents. *Journal of Adhesion Science and Technology* **5**:831-842 (1991).
- [61] I. Luzinov, D. Julthongpiput, A. Liebmann-Vinson, T. Cregger, M. D. Foster, V. V. Tsukruk, Epoxy-Terminated Self-Assembled Monolayers: Molecular Glues for Polymer Layers. *Langmuir* **16**:504-516 (2000).
- [62] Skotheim, T.A. Handbook of Conducting Polymers, (CRC, 1997).
- [63] F. D. Eramo, M. A. Zón, H. Fernandez, L. Sereno, A. H. Arévalo, Studies of a novel conducting polymer by cyclic and square wave voltammetries: Its synthesis and characterization. *Electrochimica Acta* **53**:7182-7190 (2008).
- [64] G. Inzelt, M. Pinerib, J. W. Schultzec, M. A. Vorotyntsev, Electron and proton conducting polymers: recent developments and prospects. *Electrochimica Acta* **45**:2403-2421 (2000).

-
- [65] R. A. Zoppi, M. A. Paoli, Aplicações tecnológicas de polímeros intrinsecamente condutores: Perspectivas atuais. *Química Nova* **16**:560-569 (1993).
- [66] L. F. Franco, Desenvolvimento de plataforma funcionalizada com poli(4-Hba) para aplicação em sensores biológicos, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, (2009).
- [67] M. F. B. Souza, Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. *Química nova* **20**:191-195 (1997).
- [68] A. Beltran, J. Andres, J. R. Sambrano, E. Longo, Density functional theory study on the structural and electronic properties of low index rutile surfaces for $\text{TiO}_2/\text{SnO}_2/\text{TiO}_2$ and $\text{SnO}_2/\text{TiO}_2/\text{SnO}_2$ composite systems. *Journal of Physical Chemistry A* **112**:8943 - 8952 (2008).
- [69] Q. Qiao, J. Beck, R. Lumpkin, J. Pretko, J. T. J. Mcleskey, A comparison of fluorine tin oxide and indium tin oxide as the transparent electrode for P3OT/TIO2 solar cells. *Sol Energy Mater Sol Cells* **90**:1034–1040 (2006).
- [70] E.C.S. Magalhães, Propriedades Ópticas de Filmes Finos de Dióxido de Estanho Puro e Dopado com Flúor, Tese de Doutorado, Instituto de Física, Universidade Federal da Bahia, Brasil, (2006).
- [71] K. I. B. Eguiluz, G. R. Salazar-Banda, M. E. Funes-Huacca, J. V. Alberice, E. Carrilho, S. A. S. Machado, L. A. Avaca, Sequence-specific electrochemical detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* DNA using electroconductive polymer-modified fluorine tin oxide electrodes. *Analyst* **134**:314-319 (2009).

-
- [72] E. Komarova, M. Aldissi, A. Bogomolova, Direct electrochemical sensor for fast reagent-free DNA detection. *Biosensors and Bioelectronics* **21**:182-189 (2005).
- [73] A. Uygun, DNA hybridization electrochemical biosensor using a functionalized polythiophene. *Talanta* **79**:194-198 (2009).
- [74] L. Chen, K. Ho, Multimode optoelectrochemical detection of cysteine based on an electrochromic Prussian blue electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical* **130**:418-424 (2008).
- [75] J. S. Daniels, N. Pourmand, Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges. *Electroanalysis* **19**:1239-1257 (2007).
- [76] Y. Tan, X. Chu, G.-L. Shen, R.-Q. Yu, A signal-amplified electrochemical immunosensor for aflatoxin B1 determination in rice. *Analytical Biochemistry* **387**:82-86 (2009).
- [77] R. E. Ionescu, N. Jaffrezic-Renault, L. Bouffier, C. Gondran, S. Cosnier, D. G. Pinacho, M. P. Marco, F. J. Sánchez-Baeza, T. Healy, C. Martelet, Impedimetric immunosensor for the specific label free detection of ciprofloxacin antibiotic. *Biosensors and Bioelectronics* **23**:549-555 (2007).
- [78] E. Barsoukov, J. R. MacDonald, Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment and Application. Wiley Interscience, New Jersey, (2005).
- [79] R. Mandal, M. S. A. Salam, C. L. Chakrabarti, M. H. Back, An Electrochemical Investigation of Complexation of Pb(II) by a Well-Characterized Fulvic Acid in Model Systems – Effect of Competition with Major Cations and Trace Metals. *Electroanalysis* **15**:903-906 (2003).

-
- [80] M. Manesse, V. Stambouli, R. Boukherroub, S. Szunerits, Electrochemical impedance spectroscopy and surface plasmon resonance studies of DNA hybridization on gold/SiO_x interfaces. *The Analyst* **133**:1097-1103 (2008).
- [81] D. L. Franco, Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos, utilizando-se matriz polimérica modificada com biomoléculas, para o diagnóstico de câncer de próstata e hepatite C. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, (2010).
- [82] F. B. Silva, S. N. Vieira, L. R. Goulart, J. F. C. Boodts, A. G. B. Madurro, J. M. Madurro, Electrochemical investigation of oligonucleotide-DNA hybridization on poly(4-methoxyphenethylamine). *International Journal of Molecular Sciences* **9**:1188-1195 (2008).
- [83] L. R. Goulart, C. U. Vieira, A. P. P. Fresche, F. E. Caparelli, P. T. Fugimura, J. F. Almeida, L. F. Ferreira; I. M. B. Goulart, A. G. B. Madurro, J. M. Madurro, Biomarkers for Serum Diagnosis of Infectious Diseases and Their Potential Application in Novel Sensor Platforms. *Critical Reviews in Immunology* **30**:201-222 (2010).
- [84] S. Arcidiacono^a, P. Pivarnik^b, C. M. Mello^a, A. Senecal^b, Cy5 labeled antimicrobial peptides for enhanced detection of Escherichia coli O157:H7. *Biosensors and Bioelectronics* **23**:1721-1727 (2008).
- [85] A.-M. Spehar-Delezea, J. Suomib, Q. Jiang^b, N. Rooija, M. K. Hepa, S. Kulmalab, Heterogeneous oligonucleotide-hybridization assay based on hot electron-induced electrochemiluminescence of a rhodamine label at oxide-coated aluminum and silicon electrodes. *Electrochimica Acta* **51**:5438-5444 (2006).

-
- [86] S. Ko, S. A. Grant, A novel FRET-based optical fiber biosensor for rapid detection of *Salmonella typhimurium*. *Biosensors and Bioelectronics* **21**:1283-1290 (2006).
- [87] I. Willner, R. Gill, M. Zayats, Semiconductor Quantum Dots for Bioanalysis. *Angewandte Chemie International* **47**:7602-7625 (2008).
- [88] T. Jamieson, R. Bakhshi, D. Petrova, R. Pocock, M. Imanib, A. M. Seifalian, Biological applications of quantum dots. *Biomaterials* **28**:4717-4732 (2007).
- [89] W. C. W. Chan, D. J. Maxwell, X. H. Gao, R. E Bailey, M. Y Han, S. M Nie, Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Current Opinion in Biotechnology* **13**:40-46 (2002).
- [90] Evident Technologies. Disponível em: <http://www.evidenttech.com/>. Acesso em fevereiro de 2011.
- [91] D. Gerion, F. Chen, B. Kannan, A. Fu, W. j. Parak, D. J. Chen, A. Majumdar, A. P. Alivisatos, Room-Temperature Single-Nucleotide Polymorphism and Multiallele DNA Detection Using Fluorescent Nanocrystals and Microarrays. *Analytical Chemistry* **75**:4766-4772 (2003).
- [92] Q. Zeng, Y. Zhang, K. Song, X. Kong, M. C. G. Aaldersd, H. Zhang, Enhancement of sensitivity and specificity of the fluoroimmunoassay of Hepatitis B virus surface antigen through “flexible” coupling between quantum dots and antibody. *Talanta* **80**:307-312 (2009).
- [93] X. Wu, H. Liu, J. Liu, K. N. Haley, J. A. Treadway, J. P. Larson, N. Ge, F. Peale, M. P. Bruchez, Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nature Biotechnology* **21**:41-46 (2003).

-
- [94] M. G. Warnera, J. W. Gratea, A. Tyler, R. M. Ozanicha, K. D. Millera, J. Loub, J. D. Marks, C. J. Bruckner-Lea, Quantum dot immunoassays in renewable surface column and 96-well plate formats for the fluorescence detection of botulinum neurotoxin using high-affinity antibodies. *Biosensors and Bioelectronics* **25**:179–184 (2009).
- [95] C. Chen, H.-S. Xia, Y.-P. Gong, J. Peng, C.-W. Peng, M.-B Hua, X.-Bo Zhu, D.-W. Pang, S.-R. Sun, Y. Li, The quantitative detection of total HER2 load by quantum dots and the identification of a new subtype of breast cancer with different 5-year prognosis. *Biomaterials* **31**:8818-8825 (2010).
- [96] Inovação Tecnológica (Nanotecnologia). Disponível em: <http://www.inovacaotecnologica.com.br/noticias/noticia.php?artigo=010165050919>. Acesso em fevereiro de 2011.
- [97] Invitrogen by life Technologies. Disponível em: <http://www.invitrogen.com.br/>. Acesso em fevereiro de 2011.
- [98] P. Kissinger, W. Heineman, Cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education*, **60**:702-706 (1983).
- [99] H. Chen, J. H. Jiang, Y. Huang, T. Deng, J. S. Li, G. L. Shen, R. Q. Yu, An electrochemical impedance immunosensor with signal amplification based on Au-colloid labeled antibody complex. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **117**:211-218 (2006).
- [100] M. I. Prodromidis, Impedimetric immunosensors - A review. *Electrochimica Acta*, **55**:4227-4233 (2010).
- [101] I. I. Suni, Impedance methods for electrochemical sensors using nanomaterials. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **27**:604-611 (2008).

-
- [102] P. M. H. Oliveira; R. F. Cossiello, T. D. Z. Atvars, L. Akcelrud, Dispositivos poliméricos eletroluminescentes. *Química Nova* **29**:277-286 (2006).
- [103] G. W. Ewing, Métodos Instrumentais de Análise Química, McGraw-Hill Book Company, Ed. Edgard Blucher LTDA, 1, 11 (1996)
- [104] R. M. Silverstein, F. X. Webster, D. J. Kiemle, Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, 7^{ra} Ed, New York, USA, (2007).
- [105] Vogel: Análise Química Quantitativa, Ed 6^a, Editora Ltc, Rio de Janeiro, (2002).
- [106] Espectroscopia de Absorção no Infravermelho (IRS). Disponível em: <http://www.sorocaba.unesp.br/gpm/ftir.htm>. Acesso em fevereiro de 2011.
- [107] G. W. Ewing, Analytical Instrumentation Handbook, Marcel Dekker Inc. New York, 213, (1990).
- [108] F. R. P. Rocha, L. S. G. Teixeira, Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV/Vis. *Química Nova* **27**:807-812 (2004).
- [109] Microscopia eletrônica de varredura (MEV). Disponível em: http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV_index.htm. Acesso em fevereiro de 2011.
- [110] H. J. Kestenbach, Microscopia Eletrônica: Transmissão e Varredura; Curso Associação Brasileira de Metalurgia e Materiais, São Paulo, (1994).
- [111] A. F. Padilha, F. F. Ambrozio, Técnicas de Análise Micro-estrutural, Hemus, São Paulo, (1992).

[112] Politecnich of Turin (Physics department). Disponível em: http://areeweb.polito.it/ricerca/carbongroup/fac_fesem.html. Acesso em fevereiro de 2011.

[113] Microscopia de Varredura - A Microscopia do Novo Milênio. Disponível em: <http://www.eletrica.ufpr.br/piazza/materiais/UilianSouza.pdf>. Acesso em dezembro de 2010.

[114] D. Whitehouse, Surfaces and their measurement, Kogan Page Science, London, (2004).

[115] H. D. Young, R. A. Freedman, Física IV: ótica e física moderna. 12 ed. São Paulo: Addison Wesley, vol. 4. 100 (2009).

[116] R. Toniolo, Efeito da resistência elétrica em dispositivos feitos como poli(5-amino-1-naftol), Dissertação de Mestrado, Departamento de Física do setor de ciências exatas, Universidade Federal do Paraná, Brasil, (2000).

[117] L. D. Mello, L. T. Kubota, Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry* **77**:237 (2002).

[118] G. T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, 2nd edition, Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois, USA, (2008).

[119] D. Sehgal, I. K. Vijay, A Method for the High Efficiency of Water-Soluble Carbodiimide-Mediated Amidation. *Analytical Biochemistry*, **218**:87-91 (1994).

[120] J. Xu, K. G. Mirosław, S. Zolla-Pazner, An immuno-dot blot assay for the detection of antibody to HIV. *Journal of Immunological Methods* **120**:179-183 (1989).

-
- [121] R. Müller, H. Glathe, H. Lang, H. Simon, R. Clausnitzer, G. Petzold, S. Dittmann, Rapid, easy and economical dot EIA for detection of antibodies to HIV-1 using recombinant env- and gag-proteins. *Journal of Virological Methods* **34**:141-148 (1991).
- [122] T. Tsukazaki, M. Yoshida, H. Namba, M. Yamada, N. Shimizu, S. Nii, Development of a dot blot neutralizing assay for HHV-6 and HHV-7 using specific monoclonal antibodies. *Journal of Virological Methods* **73**:141-149 (1998).
- [123] K. R. Rupprecht, R. K. Nair, L. C. Harwick, J. Grote, G. S. Beligere, S. D. Rege, Y. Y. Chen, Z. Lin, J. R. Fishpaugh, Development of a dot-blot assay for screening monoclonal antibodies to low-molecular-mass drugs. *Analytical Biochemistry* **407**:160-164 (2010).
- [124] J. Christen, D. Bimbrg, Line shapes of intersubband and excitonic recombination in quantum wells: Influence of final-state interaction, statistical broadening, and momentum conservation. *Physical Review B* **42**:7213-7219 (1990).
- [125] Qdot® Streptavidin Conjugates. Disponível em: <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp19000.pdf>. Acesso em fevereiro de 2011.
- [126] A. N. B. Berton, Eletropolimerização de o-aminofenol e caracterização dos filmes formados, Tese de Doutorado, Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Brasil, (2005).
- [127] P. M. Armistead, H. H. Thorp, Modification of Indium Tin Oxide Electrodes with Nucleic Acids: Detection of Attomole Quantities of Immobilized DNA by Electrocatalysis. *Anal. Chem*, **72**:3764-3770 (2000).

[128] Digital Surf Mountains. Disponível em: <http://www.digitalsurf.fr/en/index.html>. Acesso em fevereiro de 2011.

[129] E. Harlow, D. Lane, Labeling Antibodies with Biotin, Cold Spring Harb Protoc, doi:10.1101/pdb.prot4286 (2006).

[130] D. L. Franco, Eletropolimerização de aminofenóis para desenvolvimento de biossensores eletroquímicos aplicados à detecção de gene específico para câncer de próstata, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, (2007).

[131] D. L. Franco, A. S. Afonso, S. N. Vieira, L. F. Ferreira, R. A. Gonçalves, A. G. B. Madurro, J. M. Madurro, Electropolymerization of 3-aminophenol on carbon graphite surface: Electric and morphologic properties. *Materials Chemistry and Physics* **107**:404-409 (2008).

[132] E. Hür, G. Bereket, B. Duram, D. Özdemir, Y. Sahin, Electropolymerization of m-aminophenol on mild steel and its corrosion protection effect. *Progress in Organic Coatings* **60**:153-160 (2007).

[133] D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz, Spectroscopy-A guide for students organic chemistry, second Ed., Harcourt Brace College Publishers, Philadelphia, 1996, p.75.

[134] Y. Buyukmurat, S. Akyus, Infrared and Raman spectra, ab initio calculations, force Field refinement and vibrational assignment of 3-aminophenol. *Journal of Molecular Structure* **744-747**:921-928 (2005).

-
- [135] F. L. Leite, L.G. Paterno, C. E. Borato, P. S. P. Herrmann, O. N. Oliveira, L. H. C. Mattoso, Study on the adsorption of poly(o-ethoxyaniline) nanostructured films using atomic force microscopy. *Polymer* **46**:12503-12510 (2005).
- [136] C. A. R. Costa, M. M. Rippel, F. Galembeck, Heterogeneidade da Capacidade Dissipativa e do Módulo de Young em Superfícies Poliméricas: Contraste de Fase em AFM com Contato Periódico. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* **12**:189-190 (2002).
- [137] D. J. Maia, M. A. Paoli, O. L. Alves, Síntese de Polímeros Condutores em Matrizes Sólidas Hospedeiras. *Química Nova* **23**:204-215 (2000).
- [138] J. F. B. Perez, R. S. Neves, A. J. Motheo, 14º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP (2006).
- [139] SIGMA FAST™ 3,3' - Diaminobenzidine. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/3/d4418dat.Par.0001.File.tmp/d4418dat.pdf>. Acesso em fevereiro de 2011.
- [140] SIGMA FAST™ DAB With Metal Enhancer Tablet. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/3/d0426dat.Par.0001.File.tmp/d0426dat.pdf>. Acesso em fevereiro de 2011.
- [141] D. Sehgal, I. K. Vijay, A Method for the High Efficiency of Water-Soluble Carbodiimide-Mediated Amidation. *Analytical Biochemistry* **218**:87-91 (1994).
- [142] B. L. Frey, R. M. Corn, Covalent Attachment and Derivatization of Poly(l-lysine) Monolayers on Gold Surfaces As Characterized by Polarization-Modulation FT-IR Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, **68**:3187-3196 (1996).

[143] R. K. Mendes, R.F Carvalhal, D. R. Stach-Machado, L. T. Kubota, Surface plasmon resonance immunosensor for early diagnosis of Asian rust on soybean leaves. *Biosensors and Bioelectronics* **24**:2483-2487 (2009).