

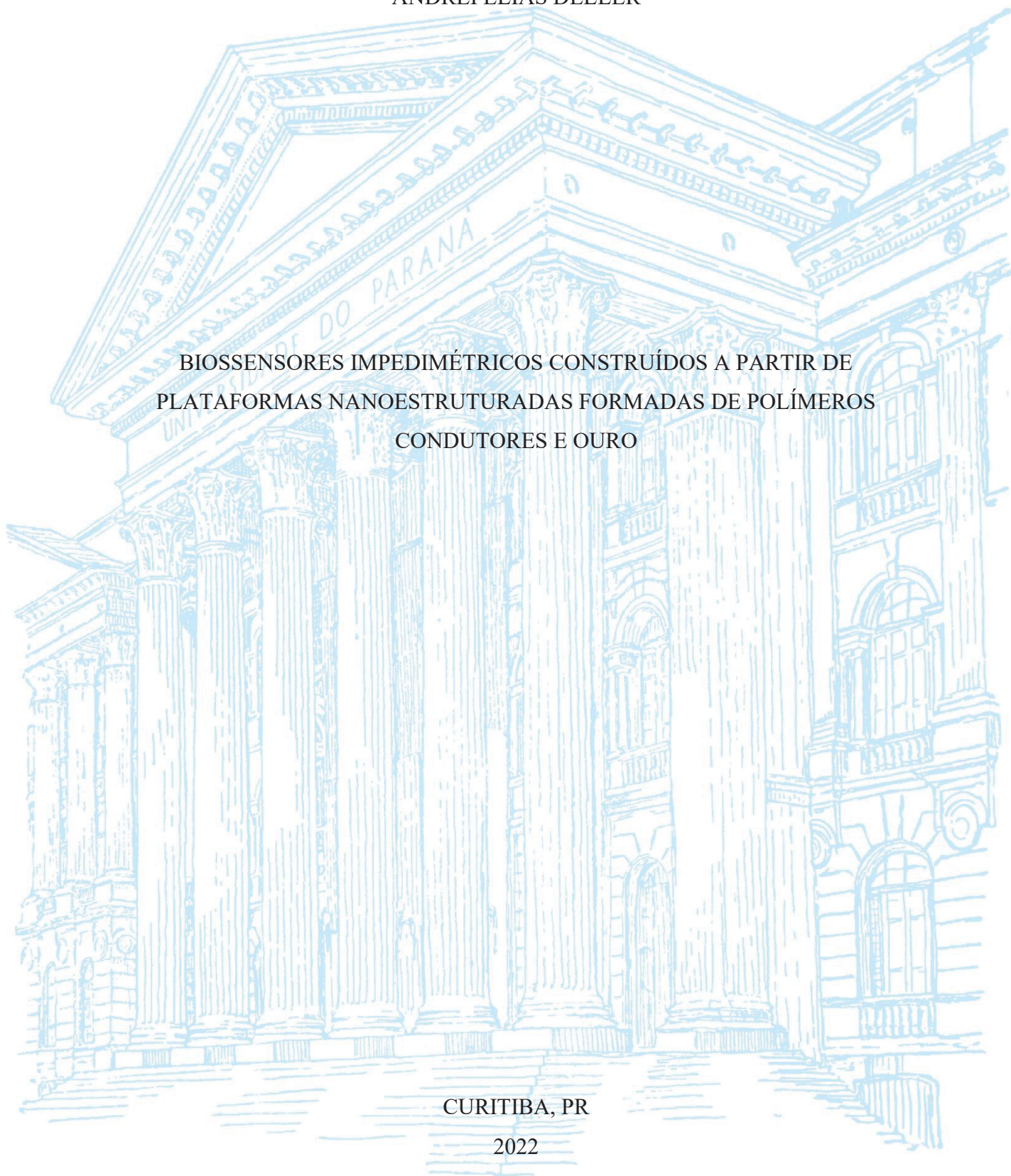
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDREI ELIAS DELLER

BIOSENSORES IMPEDIMÉTRICOS CONSTRUÍDOS A PARTIR DE
PLATAFORMAS NANOESTRUTURADAS FORMADAS DE POLÍMEROS
CONDUTORES E OURO

CURITIBA, PR

2022



ANDREI ELIAS DELLER

BIOSSENSORES IMPEDIMÉTRICOS CONSTRUÍDOS A PARTIR DE
PLATAFORMAS NANOESTRUTURADAS FORMADAS DE POLÍMEROS
CONDUTORES E OURO

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Vidotti

Coorientador: Prof. Dr. Dênio Emanuel Pires Souto

CURITIBA, PR

2022

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

D357b

Deller, Andrei Elias

Biossensores impedimétricos construídos a partir de plataformas nanoestruturadas formadas de polímeros condutores e ouro [recurso eletrônico] / Andrei Elias Deller – Curitiba, 2022.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Vidotti

Coorientador: Prof. Dr. Dênio Emanuel Pires Souto

1. Biossensores. 2. Nanopartículas. 3. Polímeros condutores. I. Universidade Federal do Paraná. II. Vidotti, Marcio. III. Souto, Dênio Emanuel Pires. IV. Título.

CDD 543.4

Bibliotecário: Nilson Carlos Vieira Junior CRB9/1797

TERMO DE APROVAÇÃO


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ANDREI ELIAS DELLER** intitulada: **Biossensores impedimétricos construídos a partir de plataformas nanoestruturadas formadas de polímeros condutores e ouro**, sob orientação do Prof. Dr. MARCIO EDUARDO VIDOTTI MIYATA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 10 de Fevereiro de 2022.



MARCIO EDUARDO VIDOTTI MIYATA
Presidente da Banca Examinadora



FREDERICO LUIS FELIPE SOARES
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



LUIS FERNANDO QUINTINO PEREIRA MARCHESI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ)

*Dedico este trabalho aos meus
pais, que sempre me apoiaram e me
forneceram todo o suporte necessário para
que meus sonhos se tornassem realidade.*

*Dedico também ao meu avô,
Euclides Miranda (in memoriam). Um
homem de grande sabedoria, bondade e
que me ensinou muito sobre a vida.*

AGRADECIMENTOS

Durante a jornada desta grande conquista e realização deste sonho, contei com a ajuda e suporte de muitos. Aqui quero expressar minha gratidão a todos.

Aos meus pais, por sempre estarem ao meu lado me dando todo o carinho e suporte para a realização dos meus objetivos e sonhos. A minha Mãe Rosalina, por todo o cuidado, dedicação e pelo amor incondicional. Ao meu Pai, Lourival, que sempre esteve presente me dando segurança e certeza do que não estou sozinho nessa caminhada.

A minha noiva Rafaela, por estar presente e me apoiar em todos os momentos, com muito amor e carinho, me trazendo paz até nas horas mais difíceis. Muito obrigado por tudo.

Ao meu orientador e pai científico Dr. Marcio Vidotti, sempre pronto e disposto a dar todos os ensinamentos científicos, além dos seus sábios conselhos. Meu muito obrigado pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

Ao meu coorientador Dr. Dênio Souto, que me ajudou e me ensinou muito sobre o trabalho com biossensores, tornando possível a aplicabilidade do dispositivo.

Ao professor Dr. Frederico Soares, que por diversas vezes fez contribuições inestimáveis para minha formação e avaliação deste trabalho.

Ao professor Dr. Luis Marchesi, por todas as valiosas contribuições na banca de qualificação e de defesa.

A Dra. Ana Letícia Soares, cuja contribuição neste trabalho é inestimável, muito obrigado pela paciência e por todos os ensinamentos, além da grande amizade.

A MSc. Jaqueline Volpe, que sempre esteve disposta à fazer contribuições e ter discussões científicas, muito obrigado também pela amizade e parceria.

Agradeço a todos os amigos e colegas do GPMin e GCC por todas as conversas e discussões científicas. Em especial agradeço à José, Tatiana, Ana Carol, Renata Sanchez Isabela, Alex e Bruna, grandes amigos com quem sei que posso contar e que levo no coração.

Agradeço à Technische Universität Chemnitz, ao DAAD e a professora Dra. Olfa Kanoun, pela incrível oportunidade do intercâmbio. Também agradeço aos queridos amigos que fiz nesse intercâmbio, Jean, Gustavo e Rafael.

À Universidade Federal do Paraná e aos funcionários do programa de pós-graduação em Química, pela oportunidade e todo o suporte fornecido.

À CAPES pela bolsa e também à todos os órgãos de fomento a pesquisa científica.

Ao centro de microscopia eletrônica da UFPR (CME – UFPR), pelas imagens de MEV, MET e espectros de EDS.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação.

*“Que os vossos esforços desafiem as
impossibilidades, lembrai-vos de que as
grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível.”*

(Charles Chaplin)

RESUMO

Neste trabalho foi realizado o desenvolvimento e estudo de duas plataformas, sendo uma baseada em um material híbrido de poli(3,4 etilenodioxitiofeno) (PEDOT) e nanopartículas de ouro, e outra em polipirrol e nanopartículas de ouro, com objetivo de construir biossensores impedimétricos para diferentes sistemas biológicos. A caracterização inicial foi realizada por imagens de microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão, para elucidar a morfologia do material, que foram predominantemente de nanotubos para a estrutura baseada em polipirrol, enquanto que, para a estrutura de PEDOT a morfologia variou entre nanotubos, globular e filme. Todas as etapas de construção da plataforma foram também caracterizadas por técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. A estrutura polímero/nanopartículas de ouro apresentou uma grande melhora na propriedade capacitiva e também para transferências de carga em relação ao eletrodo só com o polímero. Os estudos para construção do biossensor foram baseados em analisar as respostas por voltametria cíclica e principalmente por espectroscopia de impedância eletroquímica após cada etapa. Notou-se que as biomoléculas apresentam uma tendência de dificultar as transferências e armazenamento de carga. Os testes iniciais com Avidina-HRP e o anticorpo anti-avidina (biotinilado) foram empregados com o objetivo de verificar interações bioquímicas na superfície da plataforma, e os resultados indicaram que o material torna possível e favorável a imobilização e posteriores reações entre biomoléculas. Os estudos prosseguiram com as moléculas do grupo Folato, as quais, são muito estudadas por serem potenciais biomarcadores de câncer. Neste trabalho, o receptor de folato α foi utilizado como biorreceptor, e a partir dele buscou-se a detecção do anticorpo anti-FR e também do ácido fólico. Estudos e otimizações foram realizados para a imobilização do receptor de folato α e para as reações de reconhecimento do analito. Realizou-se testes de detecção do anticorpo anti-FR, bem como, da estabilidade da resposta frente à uma mesma concentração do anticorpo anti-FR. Os estudos indicam que a proteína permaneceu estável e em uma orientação favorável para a posterior reação tanto com anticorpo anti-FR quanto com FA. Para a plataforma baseada em polipirrol e ouro, estudou-se também o impacto da etapa de bloqueio de sítios não específicos com o aminoácido glicina. O resultado indica que essa etapa é imprescindível para o bom funcionamento do sistema. Para a detecção do anticorpo anti-FR, utilizando o eletrodo baseado em PEDOT e nanopartículas de ouro, os parâmetros analíticos indicam um $R^2 = 0,8583$ para a curva analítica, com do limite de detecção (LOD) foi de $0,675 \text{ pg mL}^{-1}$ e o limite de quantificação (LOQ) foi de $2,25 \text{ pg mL}^{-1}$. Utilizando o eletrodo baseado em PPI/AuNPs, realizou-se a detecção de FA, mostrando uma curva analítica com $R^2 = 0,9408$, limite de detecção de $0,015 \text{ ng mL}^{-1}$ e limite de quantificação de $0,047 \text{ ng mL}^{-1}$. Tanto para o eletrodo baseado em PEDOT e nanopartículas de ouro quanto para polipirrol e nanopartículas de ouro, os valores dos limites de detecção e quantificação obtidos estão dentro de uma faixa de interesse clínico, indicando que as plataformas propostas neste trabalho têm potencial para aplicação e detecção destas biomoléculas.

Palavras-chave: Polímeros condutores, Nanopartículas de ouro, Interfaces, Biossensor Impedimétrico, Folato.

ABSTRACT

In this work two platforms were developed and studied, one based on a hybrid material of poly (3,4 ethylenedioxythiophene) (PEDOT) and gold nanoparticles, and other on polypyrrole and gold nanoparticles, with the objective of impedimetric biosensors for different biological systems. The initial characterization was performed by scanning electron microscopy and transmission electron microscopy images, to elucidate the material morphology, which were mainly of nanotubes for the polypyrrole, and for the PEDOT the were nanotubes, globular and film. All steps of biosensor development were also characterized by electrochemical techniques: cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. The polymer/gold nanoparticles structure showed a good property for capacitive enhancement and also for charge transfers. The studies of the biosensor construction were based on responses by cyclic voltammetry and mainly by electrochemical impedance spectroscopy after each step. It was noticed that biomolecules have a tendency to difficult the charge transfers and storage process. Initial tests with Avidin-HRP and anti-avidin antibody (biotinylated) were done to verify the biochemical interactions onto the platform surface. The results indicated a favorable immobilization and subsequent reactions between biomolecules on the material. The studies continued with Folate group biomolecules, due to its cancer biomarker properties. In this work, the folate receptor α (FR- α) was used as bioreceptor, to the detection of anti-FR antibody and folic acid. Studies and optimizations were done to folate receptor- α immobilization and also to recognize its interactions. Tests with anti-FR antibody detection and stability response were done using the same antibody concentration. The studies indicates that protein was stabilized showing good orientation to interact with the antibody and folic acid. For the electrode based on polypyrrole and gold, was also studied the blocking step of non-specific sites, with glycine, and the results indicates the importance of this step to good work of the biosensor. To anti-FR antibody detection, using the PEDOT and gold nanoparticles electrode analytical parameters of analytical curve were $R^2 = 0,8583$, detection limit of $0,675 \text{ pg mL}^{-1}$ and quantification limit of $2,25 \text{ pg mL}^{-1}$. Using the polypyrrole and gold electrode, was done the FA detection, where the analytical curve showed $R^2 = 0.94078$, with detection limit of $0,015 \text{ ng mL}^{-1}$ and quantification limit of $0,047 \text{ ng mL}^{-1}$. Both electrodes, PEDOT and gold nanoparticles and polypyrrole and gold nanoparticles, have detection and quantification limit values according to clinical interesting range, which indicates that the material propose in this work has the potential to biosensing application of these biomolecules.

Keywords: Conductive polymers, Gold nanoparticles, Interfaces, Impedimetric Biosensor, Folate.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estrutura do pirrol e do polímero PPI. 19
- Figura 2. Estrutura do monômero EDOT e do polímero PEDOT. 19
- Figura 3. Esquema ilustrativo da modificação do eletrodo para construção do biossensor.
Nota-se a importância da formação do híbrido entre o polímero e AuNPs, o qual possibilita a formação da SAM, e posterior imobilização e reações de biomoléculas. 22
- Figura 4. Esquema geral do funcionamento de um biossensor eletroquímico, onde a amostra entra em contato com um eletrodo modificado com o biorreceptor. A reação de reconhecimento dará origem a um sinal que será analisado por alguma técnica eletroquímica. 24
- Figura 5. Reações de reconhecimento na interface eletrodo/solução em um biossensor impedimétricos. Também é mostrado o circuito equivalente de Randles-Sevick utilizado em sistemas com polímeros condutores. 26
- Figura 6. A figura (A) mostra a estrutura do Ácido Fólico, e na figura (B) um esquema da absorção de FA no corpo realizada pelos receptores de folato α expressos na membrana celular, em um processo chamado de **endocitose mediada por receptor**. 29
- Figura 7. A figura (A) mostra o esquema corte dos eletrodos, e na figura (B) mostra a imagem real de um eletrodo, após polimerização e deposição de AuNPs, em comparação com o tamanho de uma moeda de 5 centavos. 34
- Figura 8. Caracterização da morfologia do eletrodo com PEDOT-NTs. As imagens de MEV mostram (a) um fio da malha e (b) o mesmo fio com MEV retroespalhado e (c) uma imagem geral da malha. A figura (d) mostra um MET de um nanotubo individual na imagem. 39
- Figura 9. Caracterização da morfologia do eletrodo com PPI-NTs. As imagens de MEV mostram (a) uma imagem geral da malha e (b) uma ampliação maior para pegar um fio da malha. Para as imagens de MET, (c) mostra um nanotubo individual e (d) mostra um vão da malha de aço. 40
- Figura 10. Caracterização dos eletrodos com PEDOT-NTs e AuNPs. A imagem de MEV (a) pode ser melhor elucidado com sua versão contrastada (b). A imagem de MET (c) caracteriza melhor AuNPs individuais. Na imagem (d) mostram-se os pontos de coleta de espectro EDS. 41

Figura 11. Caracterização dos eletrodos com PPI-NTs e PPI-NTs/AuNPs. A imagem com menor ampliação e uma visão mais ampla da morfologia, através de MEV (a) pode ser melhor elucidada com sua versão contrastada (b). As imagens de MET (c) e (d) caracterizam melhor AuNPs individuais.	42
Figura 12. Voltametria cíclica (A) para os eletrodos modificados com PEDOT-NTs (em preto) e para PEDOT-NTs com AuNPs (em vermelho). Na figura (B) é mostrado o Diagrama de Nyquist obtido a partir de eletrodos modificados com PEDOT-NTs e com PEDOT-NTs/AuNPs. Na imagem (C) é mostrado o circuito equivalente utilizado para modelar os resultados de EIE.	43
Figura 13. Voltametria cíclica (A) para os eletrodos modificados com PPI-NTs (em preto) e para PPI-NTs com AuNPs (em vermelho). Na figura (B) o diagrama de Nyquist obtido a para a modificação com PPI-NTs e com PPI-NTs/AuNPs. Na imagem (C) é mostrado o circuito equivalente utilizado para modelar os resultados de EIE.	47
Figura 14. A formação da SAM é favorável devido à ligação covalente entre o enxofre e o ouro, e possibilita um posterior ancoramento de uma molécula biológica através dos grupamentos carboxílicos.....	49
Figura 15. Reações presentes na etapa de ativação em solução contendo EDC:NHS e, posteriormente, de imobilização do biorreceptor na superfície do eletrodo.....	50
Figura 16. Voltamograma cíclico (A) e Diagrama de Nyquist (B) realizado para a construção do sistema Biotina-Avidina para o eletrodo modificado com PEDOT-NTs.	52
Figura 17. Voltamograma cíclico realizado para a detecção de diferentes concentrações de Biotina (100, 300, 500, 700 e 900 fMol L ⁻¹), utilizando-se o eletrodo previamente modificado com PPI-NTs / AuNPs / MPA / Avidina.....	56
Figura 18. Voltamograma Cíclico (A) para a detecção de diferentes concentrações do FPB-Ab, no qual correspondem à 0,1, 100, 500 e 1000 pg mL ⁻¹ . A Figura (B) mostra o Diagrama de Nyquist e a curva analítica de ΔR_{CT} versus a concentração de FPB-Ab ($n=3$), na parte superior direita, correspondente às concentrações de 0,1, 10, 25, 50 e 100 pg mL ⁻¹ do anticorpo.	58
Figura 19. Teste de estabilidade de resposta da EIE frente à uma mesma concentração de FPB-Ab (0.1 pg mL ⁻¹). A medida em preto corresponde à etapa do bloqueio com glicina (branco), enquanto as demais são correspondentes à detecção do anticorpo.	60

Figura 20. Voltamograma Cíclico (A) e diagrama de Nyquist (B) para a detecção de diferentes concentrações do FPB-Ab (0,1, 100, 500 e 1000 pg mL ⁻¹) utilizando a plataforma de PPI-NTs. Na parte superior direita do Diagrama de Nyquist é mostrada o ajuste de ΔR_{CT} versus a concentração de FBP-Ab.....	61
Figura 21. Teste de estabilidade de resposta de EIE para 0.1 pg mL ⁻¹ de FBP-Ab. A medida em preto foi realizada na etapa de branco, enquanto as demais correspondem à uma mesma concentração do anticorpo.....	63
Figura 22. Teste de adsorção de diferentes concentrações do anticorpo (0.1, 100, 500 e 1000 pg mL ⁻¹) no PPI-NTs.	66
Figura 23. Construção do biossensor utilizando apenas PPI-NTs como suporte. Na figura (a) é mostrada o experimento sem o bloqueio com Glicina, enquanto na figura (b) com a etapa de bloqueio com Glicina.	67
Figura 24. Diagrama de Nyquist e curva analítica correspondente à detecção de 0,01, 0,1, 1, 5, 10, 25 e 50 ng mL ⁻¹ de FA.	69
Figura 25. Espectros de EDS obtidos para a caracterização do eletrodo modificado com PEDOT (Figura A) e do eletrodo modificado com PEDOT/AuNPs (Figura B).	81
Figura 26. Espectros de EDS obtidos para a caracterização do eletrodo modificado com PPI (Figura A) e do eletrodo modificado com PPI/AuNPs (Figura B).	82
Figura 27. Construção do biossensor baseado em PPI/AuNPs para o par avidina/biotina. Voltamogramas cíclicos (A) e (B) mostrando a caracterização de diferentes etapas na construção do biossensor baseado na plataforma, e o Diagrama de Nyquist (C) para a mesma caracterização.	83
Figura 28. Biossensor construído utilizando Avidina como biorreceptor e Biotina como analito. Este experimento comprova que ambas as moléculas podem atuar como biorreceptor.....	84
Figura 29. Construção do biossensor utilizando PPI na morfologia de filme. As cores representativas são as mesmas para a EIE e para a VC.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de parâmetros calculados de EIE para PEDOT-NTs e PEDOT-NTs/AuNPs.....	44
Tabela 2. Valores dos parâmetros calculados de EIS para PPI e PPI-AUNPs.....	48
Tabela 3. Dados ajustados da análise por EIS das etapas de bloqueio com Glicina e detecção de diferentes concentrações de Avidina. Onde Avidina1, Avidina2 e Avidina3 correspondem à 1, 5 e 10 pmol L ⁻¹ , respectivamente.	53
Tabela 4. Parâmetros ajustados dos dados de EIE obtidos para a construção do biossensor baseado em PPI-NTs/AuNPs.	55
Tabela 5. Dados ajustados da análise por EIS das etapas de bloqueio com Glicina (branco) e das detecções de diferentes quantidades de Biotina(n).	57
Tabela 6. Parâmetros tratados da EIE referente à Figura 19.	60
Tabela 7. Ajuste dos parâmetros obtidos com a EIE da Figura 20a.	62
Tabela 8. Parâmetros tratados referente a EIE da Figura 21.	63
Tabela 9. Comparação entre condições experimentais e valores de LOD entre diversos biossensores para detecção de FA	70
Tabela 10. Aproveitamento acadêmico.	79
Tabela 12. Construção do biossensor com o eletrodo modificado apenas com PPI e sem utilizar o bloqueio com glicina.	85
Tabela 13. Construção do biossensor com o eletrodo modificado apenas com PPI, utilizando o bloqueio com glicina.....	85
Tabela 14. Ajuste dos parâmetros obtidos com PPI-Filme, referente à EIE da Figura 29..	86

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AM – Alaranjado de metila

AuNPs – Nanopartículas de ouro

DBS - Dodecilbenzenosulfonato

EDC - N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida

EDS - Espectroscopia por energia dispersiva

EIE – Espectroscopia de impedância eletroquímica

FBP - *Folate Binding Protein* (Proteína de ligação ao folato)

FBP-Ab - *Folate Binding Protein antibody* (Anticorpo anti-proteína de ligação ao folato)

FR – *Folate receptor* (Receptor de folato)

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

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

NHS - N-hidroxissuccinimida

PBS – *Phosphate buffered saline* (Tampão fosfato salino)

PCFT - Transportador de folato acoplado a prótons

PEDOT - poli(3,4-etilenodioxitofeno)

PPI - Polipirrol

PSS - Poliestireno sulfonato de sódio

Q_{DL} - *Electric double-layer capacitance* (Capacitância de dupla camada elétrica)

Q_{LF} – *Low-frequency capacitance* (Capacitância em baixas frequências)

R_{CT} – *Resistance to charge transfer* (Resistência a transferência de carga)

RFC - Portador de folato reduzido

SAM – *Self-assembly monolayer* (Monocamada auto-organizada)

SDS - Dodecil sulfato de sódio

VC – Voltametria cíclica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA	16
2 ESTADO DA ARTE	18
2.1 MODIFICAÇÃO DE ELETRODOS PARA APLICAÇÕES EM SENSORES E BIOSSENSORES	18
2.1.1 Modificação com polímeros condutores	18
2.2 NANOMATERIAIS HÍBRIDOS DE POLÍMEROS CONDUTORES E OURO	20
2.2.1 Monocamadas auto-organizadas.....	21
2.3 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS	23
2.3.1 Biossensores impedimétricos e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica	25
2.4 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA BIOMARCADORES CÂNCER	27
2.4.1 Moléculas do grupo folato	28
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 OBJETIVO GERAL.....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 REAGENTES.....	32
4.2 CARACTERIZAÇÕES E INSTRUMENTAÇÃO	32
4.3 PREPARO DOS ELETRODOS	33
4.4 SÍNTESE DE NANOTUBOS DE PPI	33
4.5 SÍNTESE DE NANOTUBOS DE PEDOT	33
4.6 SÍNTESE DE HÍBRIDOS FORMADOS POR POLÍMEROS CONDUTORES E AuNPs.....	34
4.7 CONSTRUÇÃO DO BIOSSENSOR.....	34
4.8 TESTES COM BIOTINA-AVIDINA	35
4.9 TESTES COM O PROTEÍNAS FOLATO	35
4.9.1 Teste de estabilidade de reposta por EIE.....	36
4.9.2 Testes com PPI na morfologia de filme	36
4.9.3 Testes de adsorção das moléculas biológicas no polímero.....	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	38
5.1 PARTE I – SÍNTESE E CARATERIZAÇÃO DO ELETRODO	38
5.1.1 Eletrodos modificados com PEDOT-NTs	38
5.1.2 Eletrodos modificados com PPI	39

5.1.3 Deposição de AuNPs e caracterização morfológica.....	40
5.1.4 Caracterizações Eletroquímicas do híbrido de PEDOT-NTs/AuNPs.....	43
5.1.5 Caracterizações Eletroquímicas do híbrido de PPI-NTs/AuNPs.....	46
5.2 PARTE II – CONSTRUÇÃO DO BIOSSENSOR	48
5.2.1 Modificação com MPA e ativação com EDC:NHS	48
5.2.2 Bloqueio com Glicina.....	51
5.2.3 Construção do sistema Avidina/Biotina para PEDOT-NTs	51
5.2.4 Construção do sistema Avidina/Biotina para PPI-NTs	54
5.2.5 Uso da plataforma PEDOT-NTs para detecção de proteínas folato.....	57
5.2.6 Uso da plataforma PPI-NTs/AuNPs para detecção de proteínas folato	61
5.2.7 Testes para detecção de Ácido Fólico utilizando PPI-NTs/AuNPs.....	68
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	73
ANEXO I.....	79
ANEXO II	80
ANEXO III.....	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de sensores e biossensores têm sido cada vez mais estudados, pois são dispositivos que possuem ótimo desempenho, e se destacam por serem sensíveis à baixas concentrações para detecção de contaminantes, doenças, além de outras tantas aplicações. No estudo de biossensores, cada vez mais busca-se desenvolver materiais de baixo custo, de fácil operação e de bom desempenho, para servirem de alternativa à métodos tradicionais de monitoramento, que muitas vezes são caros e também não estão acessíveis a toda a população (BĂNICĂ, 2012b; ISLAM; CHANNON, 2020).

Métodos eletroquímicos têm sido muito estudados e aplicados para sensoriamento e biossensores devido à características como sensibilidade, pois possibilitam a detecção de baixas concentrações do analito, o que é particularmente importante para biossensores. Neste âmbito, os eletrodos modificados tem chamado à atenção, pois são muito versáteis, onde é possível modificá-los e aprimorar suas propriedades com nanomateriais, metais e biomoléculas (ADARAKATTI; KEMPAHANUMAKKAGARI, 2019; BAIG; RANA; KAWDE, 2018). A modificação de eletrodos com biomoléculas é muito estudada, mas ainda é um grande desafio, pois a biomolécula deve ser imobilizada de uma maneira estável, que preserve sua conformação e que a coloque em uma posição e sentido favorável para a interação com o analito (SANDHYARANI, 2019).

É necessário que o dispositivo desenvolvido tenha um bom desempenho e aplicabilidade, e para a validação do material, o estudo e desenvolvimento deve ser realizado com técnicas que permitam a elucidação dos processos que ocorrem, para que assim otimizações e bons resultados possam ser alcançados. Neste contexto, a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) surge com grande potencial, pois permite um estudo detalhado da interface entre eletrodo e solução, região onde ocorrem os processos eletroquímicos e o processo de detecção da molécula de interesse. Além disso, a EIE é muito sensível a pequenas variações/perturbações nessa interface, ou seja, é capaz de detectar baixas concentrações de algum biomarcador, por exemplo, o que pode ser um grande indicativo de uma doença. Assim, ela se torna uma das técnicas mais promissoras para aplicação em biossensores eletroquímicos (BĂNICĂ, 2012c; REZAEI; IRANNEJAD, 2019).

Detectar e quantificar biomoléculas em baixas concentrações é muito importante, pois alguns tipos de doenças, como por exemplo o câncer (em suas mais diversas formas), têm um aumento muito grande nas chances de cura quando diagnosticado e tratado em estágios iniciais. Para isso, é necessário que o biossensor seja sensível e opere na faixa de interesse clínico para uma determinada doença. Para o câncer, é muito comum que seja explorada a detecção de biomarcadores, que são moléculas que podem indicar a presença do tumor cancerígeno. Assim, detectar e quantificar biomarcadores é uma das formas mais promissoras de diagnóstico de câncer (JAYANTHI; DAS; SAXENA, 2017; METKAR; GIRIGOSWAMI, 2019a).

Diante da relevância e dos crescentes estudos relatados sobre biossensores eletroquímicos, bem como a relevância de estudar biomarcadores de câncer, o presente trabalho foca no estudo sobre a imobilização de biomoléculas sobre a superfície de um eletrodo modificado, com posterior estudo da interação de moléculas do grupo folato, utilizando principalmente a técnica de EIE para o estudo do biossensor. Através do ancoramento de AuNPs, houve a formação de dois materiais diferentes, baseados em estruturas híbridas: PEDOT/AuNPs e de PPI/AuNPs. Diversos estudos e otimizações foram realizados para avaliar as melhores condições para a imobilização das proteínas.

Inicialmente estudou-se a interação entre os grupos avidina/biotina, um par biológico muito estudado devido à sua alta afinidade de interação. Após, o estudo principal foi focado no grupo folato, que apresenta diferentes moléculas, assim, há diferentes metodologias e estratégias que podem ser exploradas para a elaboração de um biossensor. Neste trabalho, optou-se por avaliar principalmente a imobilização do receptor de folato α (FR- α), que atuou como biorreceptor em nossos ensaios.

2 ESTADO DA ARTE

2.1 MODIFICAÇÃO DE ELETRODOS PARA APLICAÇÕES EM SENSORES E BIOSENSORES

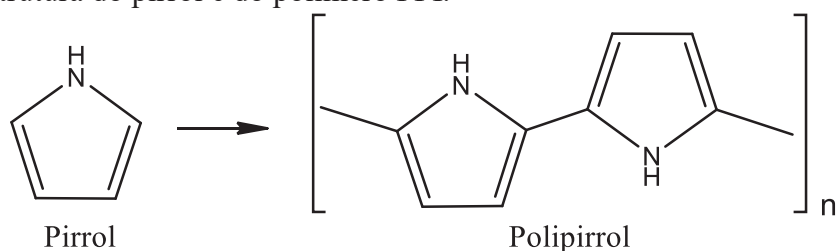
O desenvolvimento de eletrodos modificados tem sido de grande interesse por apresentar um potencial uso para sensores e biossensores. A modificação da superfície de eletrodos pode promover uma melhora em diversas propriedades do material, como por exemplo as propriedades eletroativas e de armazenamento de energia do material. Tais propriedades são muito exploradas para desenvolver e estudar sensores e biossensores, assim torna-se viável o desenvolvimento de estratégias para aprimorá-las (BĂNICĂ, 2012a).

Diversos compostos têm sido explorados para modificar a superfície de eletrodos, dentre os quais podem ser destacados metais, estruturas baseadas em carbono e polímeros. Essas modificações podem seguir as mais diversas metodologias, podendo ser, de forma geral, realizadas por adsorção, por ligação covalente ou por eletrostática (ADARAKATTI; KEMPAHANUMAKKAGARI, 2019).

2.1.1 Modificação com polímeros condutores

Os polímeros condutores se destacam por apresentarem eficientes propriedades elétricas e ópticas, tais como bons controles de estímulos elétricos e boas relações entre massa/condutividade. Além disso, há a possibilidade de que as variadas propriedades físicas e químicas dos polímeros condutores sejam adaptadas às necessidades específicas de suas aplicações, como por exemplo, a imobilização de biomoléculas como anticorpos, enzimas, entre outras. Assim, esta classe de compostos apresenta um vasto campo de aplicações, tais como baterias, capacitores, sensores e biossensores, onde destacam-se a polianilina (PANI), o politiofeno (PTh), o polipirrol (PPI) e seus derivados, sendo o PPI o mais estudado devido à suas características únicas. (BALINT; CASSIDY; CARTMELL, 2014a; KAŁUŽA et al., 2019). A estrutura do pirrol e do PPI são mostradas na Figura 1:

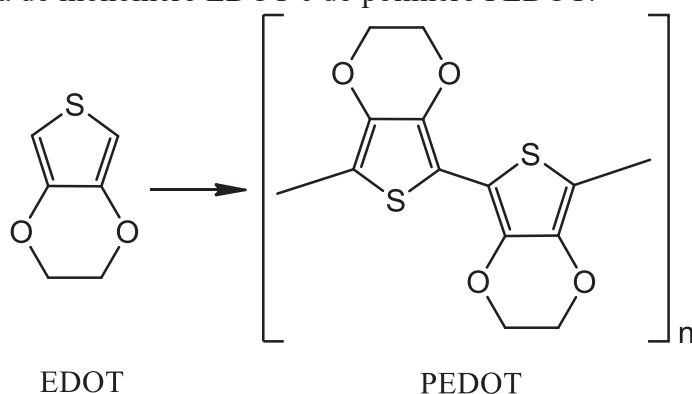
Figura 1. Estrutura do pirrol e do polímero PPI.



Fonte: O Autor.

Dentre os polímeros derivados do politiofeno, destaca-se o PEDOT (3,4-etilenodioxitiofeno), que é derivado do PTh, o qual foi sintetizado pela primeira vez em meados dos anos 1980 nos laboratórios alemães da Bayer AG e atualmente vêm sendo amplamente estudado, pois o polímero aprimora as propriedades eletroquímicas do material, como condução elétrica e armazenamento de energia. Além disso, pode servir como suporte para aplicações como a construção de sensores e biossensores. (HUI et al., 2018). A estrutura química do PEDOT é mostrada na Figura 2:

Figura 2. Estrutura do monômero EDOT e do polímero PEDOT.



Fonte: O Autor.

Os polímeros condutores possuem em suas estruturas ligações duplas conjugadas, e os elétrons π destas podem ser removidos ou adicionados pela ação de agentes de transferência de carga, formando então um íon polimérico. Este processo é chamado de *doping*, ou dopagem, que é o responsável pela alta condutividade dos polímeros. A dopagem pode ocorrer de duas maneiras: no *p-doping* (dopagem tipo p) onde o polímero é oxidado e adquire carga positiva, enquanto que no *n-doping* (dopagem tipo n) o polímero é reduzido e adquire carga negativa. A carga adquirida pelo polímero durante o processo é contrabalaneada pela presença de contra-íons, conhecidos como dopantes, que

permanecerão na matriz polimérica. Diversos estudos relatam a síntese de polímeros condutores simultaneamente com o processo de dopagem, tais como síntese de PPI dopado com dodecilbenzeno sulfonato (DBS), PEDOT utilizando dodecil sulfato de sódio (SDS) como dopante e PEDOT dopado com poliestireno sulfonato de sódio (PSS) (BALINT; CASSIDY; CARTMELL, 2014a; HUI et al., 2018; ROZLOSNIK, 2009).

Muitos métodos envolvendo modificação de eletrodos envolvendo o uso do PEDOT e PPI são descritos em trabalhos científicos, destacando-se sínteses dos polímeros por polimerização química (BALINT; CASSIDY; CARTMELL, 2014a), polimerização interfacial (HUI et al., 2018), polimerização em fase vapor (BROOKE et al., 2017) e polimerização eletroquímica (STÖCKER; KÖHLER; MOOS, 2012). Destaca-se a síntese eletroquímica, onde os polímeros condutores são depositados na forma de filmes finos diretamente sobre eletrodos metálicos, dispensando assim, a necessidade de uma etapa posterior de modificação do eletrodo, além de envolver uso de menor quantidade de reagentes. A síntese eletroquímica possui muitas vantagens em termos de facilidade de uso, menor tempo de síntese, boa reprodutibilidade e controle de carga do material depositado (HUI et al., 2018; KAŁUŻA et al., 2019).

2.2 NANOMATERIAIS HÍBRIDOS DE POLÍMEROS CONDUTORES E OURO

Como forma de otimizar os eletrodos modificados com polímeros condutores, é possível utilizar nanopartículas de metais nobres para formar um material híbrido entre polímero condutor e metal. O método de síntese eletroquímica tem sido muito utilizado para formação deste híbrido, pois é possível controlar as características do filme depositado, como a morfologia e rugosidade. Assim, há uma diminuição no custo do eletrodo, pois ao invés de usar um eletrodo de ouro, que tem um alto valor, é possível realizar a modificação com polímeros condutores e nanopartículas de ouro. O eletrodo modificado terá um ótimo desempenho, porém com um menor custo (BALINT; CASSIDY; CARTMELL, 2014b; HUANG et al., 2005; HUI et al., 2018; SALDAN et al., 2018; WOLFART et al., 2017).

Dentre os metais nobres utilizados para a formação de híbridos destacam-se as nanopartículas de ouro (AuNPs), que têm sido muito exploradas devido à alta condutividade elétrica e estabilidade. A síntese eletroquímica de híbridos de AuNPs e polímeros condutores pode ser realizada através de soluções contendo seus sais. A interação entre os polímeros condutores e as AuNPs ocorrem através de um grupo doador de elétrons presente no polímero. No caso do PEDOT, as interações químicas ocorrem entre as AuNPs e o

enxofre presente na estrutura (FERREIRA et al., 2011). Desta maneira, a formação do híbrido propicia um aumento da eficiência de condução e armazenamento de energia do material, que é muito interessante no campo de sensores e biossensores eletroquímicos (AN et al., 2012; KOUSSEI-DAOUD et al., 2014; WANG et al., 2019).

O uso de AuNPs em eletrodos modificados é favorecido pelo fato do filme polimérico ser um agente neutralizador da tendência de agregação das AuNPs, devido à linearidade de polímeros como PEDOT e PPI (DA SILVA; MINADEO; DE TORRESI, 2019; DARUICH DE SOUZA; RIBEIRO NOGUEIRA; ROSTELATO, 2019). Outra vantagem é que com o uso de AuNPs nos eletrodos modificados, o material torna-se mais favorável para a imobilização de biomoléculas em sua superfície, onde uma das estratégias possíveis é utilizar de moléculas com grupamentos tiol (-S) para usar da afinidade de ligação entre ouro e enxofre.

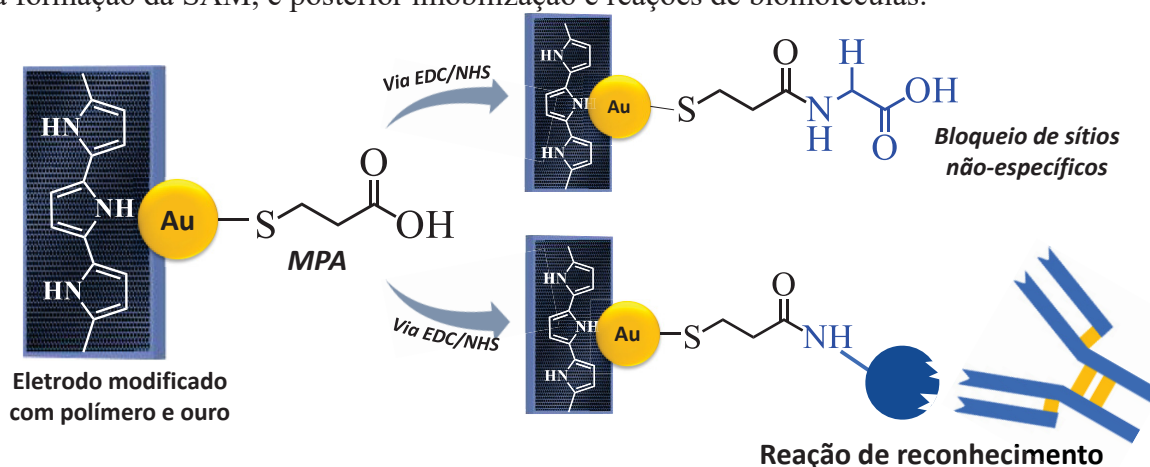
2.2.1 Monocamadas auto-organizadas

Uma das grandes vantagens das AuNPs é a possibilidade da sua funcionalização com moléculas que contenha um grupo tiol. Através da modificação de AuNPs, as moléculas de alcanotióis ligam-se à superfície metálica de maneira organizada, formando então um sistema molecular organizado, denso e compacto, chamado de monocamadas auto-organizadas (*Self-assembled monolayers* – SAMs) (SAMANTA; SARKAR, 2011; VIDOTTI et al., 2011).

O uso de SAMs torna-se viável pois ela pode ser facilmente preparada pela imersão da superfície metálica em uma solução contendo a molécula orgânica durante um período específico de tempo, seguido de uma lavagem com o mesmo solvente e secagem sob fluxo de nitrogênio. Como uma SAM oferece um bom controle em nível molecular, torna-se eficiente no controle da acessibilidade e orientação das biomoléculas ligadas, que é um dos grandes desafios no desenvolvimento de biossensores (ANTONIO; FARIA; ZUCOLOTTI, 2019; JOHARI-AHAR et al., 2015; KANG et al., 2016; KIM et al., 2019; SAMANTA; SARKAR, 2011; SOUTO et al., 2013).

A consistência da modificação de eletrodos com híbridos de polímeros condutores e AuNPs tem sido explorada por diversos trabalhos, juntamente com a efetiva combinação de alcanotióis (na forma de SAMs) com AuNPs, que tem sido regularmente mencionada na literatura. A estrutura unificada deste sistema é elucidada na Figura 3:

Figura 3. Esquema ilustrativo da modificação do eletrodo para construção do biossensor. Nota-se a importância da formação do híbrido entre o polímero e AuNPs, o qual possibilita a formação da SAM, e posterior imobilização e reações de biomoléculas.



Fonte: O autor.

A Figura 3 ilustra o funcionamento de um biossensor com base na ligação covalente entre AuNPs e um alcanotiol. A interação entre o alcanotiol e as AuNPs pode ser inferida por EIE principalmente quando se analisa o valor da **resistência de transferência de carga** (*resistance to charge transfer* - R_{CT}), que é parâmetro que indica a facilidade com que a interface eletroativa do eletrodo troca cargas com a solução eletrolítica. O ancoramento de uma biomolécula sobre a SAM é possível quando se efetua uma etapa chamada de ativação, ocorrendo uma reação substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), onde há substituição do grupo -OH da SAM por algum outro grupo de saída (via EDC:NHS, por exemplo). Quando ocorre a reação entre o alcanotiol e uma proteína, como exemplificado, o grupo de saída já ativado da SAM dá lugar a uma ligação covalente entre a carbonila do alcanotiol e o grupo amino presente na proteína, gerando uma perturbação na corrente elétrica devido a transferência de elétrons, que pode ser detectada por métodos eletroquímicos (DARUICH DE SOUZA; RIBEIRO NOGUEIRA; ROSTELATO, 2019; JOHARI-AHAR et al., 2015; PHONGPHUT et al., 2013; SINGH et al., 2019).

É necessário avaliar se a construção da plataforma estará apta para o ancoramento do receptor e para posterior reação com o analito. Para avaliar a efetividade de um biossensor podem ser utilizadas moléculas “teste”, que devem possuir interação altamente específica, estável e mensurável. Um exemplo desse tipo de interação é o de Avidina-Biotina, a qual já é descrita na literatura. A Avidina é uma glicoproteína tetramérica básica composta por quatro subunidades idênticas, na qual cada uma destas subunidades tem a capacidade de se ligar à biotina com elevada estabilidade e afinidade, sendo uma das interações não-covalentes mais fortes da natureza (constante de dissociação = 10^{-15} M).

Devido à essa alta afinidade, esta interação pode ser utilizada para verificar a eficácia de um biossensor (BĂNICĂ, 2012d; JAIN; CHENG, 2017; YOON, 2016).

Assim, o desenvolvimento de biossensores impedimétricos utilizando esta estratégia têm sido muito explorado, uma vez que todas estas modificações podem ser monitoradas por técnicas eletroquímicas como voltametria cíclica (VC) e EIE.

2.3 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

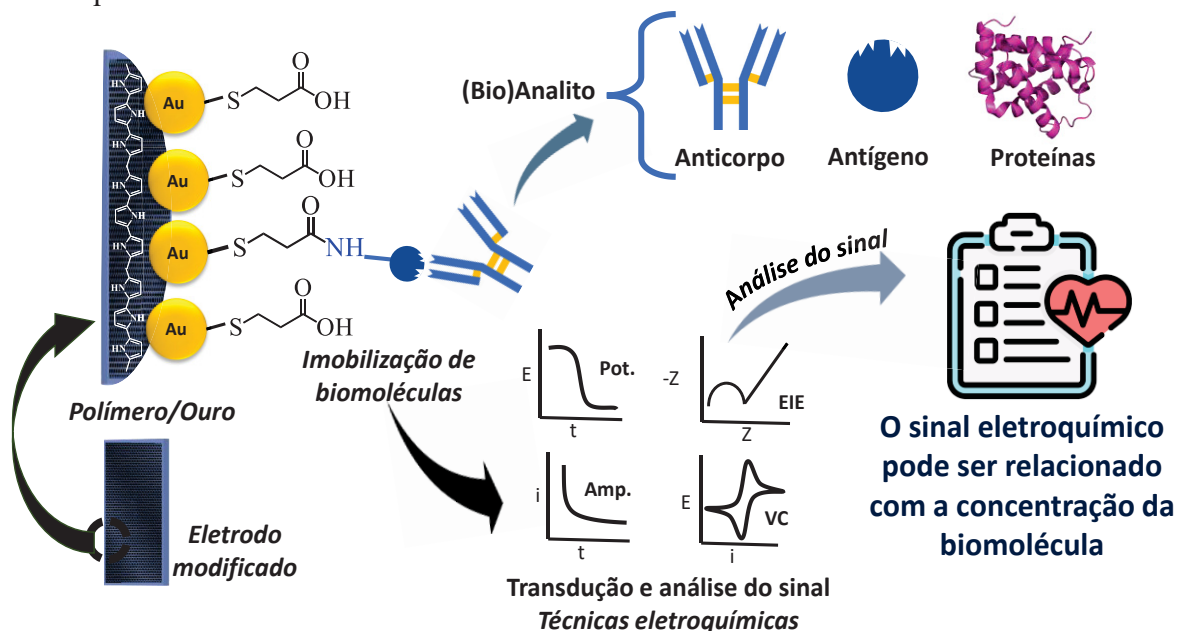
O termo “sensor químico” foi definido oficialmente em 1991, quando a IUPAC estabeleceu que:

“Um sensor químico é um dispositivo que transforma informações químicas, variando da concentração de um componente específico da amostra à análise da composição total, em um sinal analiticamente útil. As informações químicas mencionadas acima podem ter origem em uma reação química do analito ou em uma propriedade física do sistema investigado.” (HULANICKI; GLAB; INGMAN, 1991)

Segundo a IUPAC, os sensores químicos possuem duas unidades fundamentais de funcionamento: o **receptor** e o **transdutor**. No receptor, a informação química é transformada em uma forma de energia que poderá ser mensurada pelo transdutor, que por sua vez transformará esta energia em um sinal analítico útil. A classificação de sensores químicos pode ser feita levando em consideração o princípio de funcionamento do receptor ou do transdutor. Biossensores utilizam um receptor de origem biológica, e a transdução utilizada pode ser do tipo óptica, eletroquímica, elétrica, sensíveis à massa, termométricos, magnéticos e até mesmo sensíveis à radiação (BĂNICĂ, 2012b; ENSAFI, 2019; GRÜNDLER, 2007; HULANICKI; GLAB; INGMAN, 1991; YOON, 2016).

Os biossensores são dispositivos que transformam uma informação bioquímica e convertem em um sinal analítico mensurável. A Figura 4 mostra o esquema de funcionamento do biossensor a ser proposto neste trabalho. Os biossensores são comumente considerados uma classe de sensores químicos, a diferença é que aqui o estudo está focado em um processo bioquímico, ou seja, o receptor tem origem biológicas (BĂNICĂ, 2012b; ENSAFI, 2019; GRÜNDLER, 2007; HULANICKI; GLAB; INGMAN, 1991; YOON, 2016).

Figura 4. Esquema geral do funcionamento de um biossensor eletroquímico, onde a amostra entra em contato com um eletrodo modificado com o biorreceptor. A reação de reconhecimento dará origem a um sinal que será analisado por alguma técnica eletroquímica.



Fonte: O Autor.

A Figura 4 esquematiza o funcionamento geral de um biossensor, no qual uma amostra contendo diversos elementos, desde interferentes até o (bio)analito de interesse a ser detectado pelo biossensor. O receptor entrará em contato com o analito, e este contato provocará uma mudança físico-química no sistema (resistência elétrica, variação de calor, etc) que será identificada e processada pelo transdutor, e então convertida em um sinal mensurável. Assim, uma unidade processadora de sinal fará o processamento deste sinal, já convertido, que será captada por um processador de dados microeletrônico, que fará a interface com o usuário, informando-o se o analito foi ou não identificado na amostra. (METKAR; GIRIGOSWAMI, 2019b; NARWAL et al., 2019; OLIVEIRA; PEREIRA, 2016).

Dentre os diversos métodos de transdução utilizados para a construção de sensores e biossensores, a eletroquímica têm seu lugar de destaque pois é capaz de reconhecer pequenos sinais biológicos e convertê-los em sinais eletroquímicos mensuráveis. Essa característica é muito importante quando se busca detectar pequenas concentrações do analito. A eletroquímica também oferece outras diversas vantagens como facilidade de uso, baixo custo, leveza e portabilidade (REZAEI; IRANNEJAD, 2019; ZHAI; CHENG, 2019).

Os biossensores eletroquímicos combinam a sensibilidade e a alta especificidade de processos de reconhecimento biológico. Destaca-se também que técnicas eletroquímicas não necessitam que os volumes dos analitos sejam grandes. Assim, estes dispositivos costumam ter baixos limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ), o que é muito importante para monitoramento medicinal, segurança alimentícia, monitoramento ambiental, entre outras áreas. Biossensores eletroquímicos utilizam da transdução eletroquímica para monitorar e analisar a interação entre analito e biorreceptor, como por exemplo biossensores voltamétricos, amperométricos e impedimétricos. (REZAEI; IRANNEJAD, 2019; RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010).

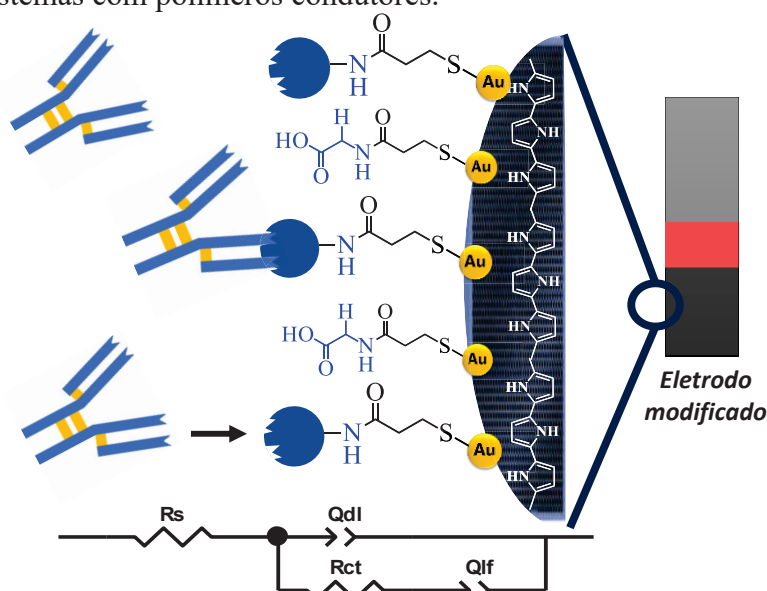
2.3.1 Biossensores impedimétricos e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

Os biossensores do tipo impedimétricos fazem o uso da técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) para monitorar resistência e reatância do biossensor. (BĂNICĂ, 2012e; HULANICKI; GLAB; INGMAN, 1991; RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010). A EIE é uma técnica que analisa como o processo eletroquímico afeta a interface eletrodo/solução. Impedância é um conceito físico, e pode ser compreendido levando-se em conta a capacitância, a reatância e a resistência de um sistema sob influência de uma corrente elétrica. Sob correntes contínuas (DC), a resistência representa a oposição à passagem da corrente, e é representada pela Lei de Ohm. A capacitância de um sistema é a capacidade que este tem de armazenar energia, sendo que um capacitor é representado por duas placas paralelas que formam entre si um campo elétrico armazenador de energia. Em sistemas eletroquímicos, um exemplo de capacitor é a dupla camada elétrica. Para correntes alternadas (AC), a reatância é quem representa a oposição à uma corrente AC oferecida por um capacitor ou indutor, e esta depende da frequência da corrente alternada e da capacitância do sistema. Assim, a impedância é definida como a carga resistiva total do sistema, dada pelas resistências e reatâncias do sistema (KIM et al., 2019; REZAEI; IRANNEJAD, 2019; SIMÕES; XAVIER, 2017).

A EIE é uma técnica capaz de prover diversas informações sobre as propriedades da interface eletrodo/solução, como migração de íons, cinética da reação e distribuição de cargas na interface. Estas informações são muito úteis para a caracterização e para o bom funcionamento de biossensores impedimétricos, uma vez que a interação entre biomoléculas, como por exemplo interações antígeno-anticorpo, pode ser muito bem caracterizada pela técnica (BĂNICĂ, 2012c; ISLAM; CHANNON, 2020; REZAEI;

IRANNEJAD, 2019). A Figura 5 mostra uma relação entre a interface eletrodo/solução de um biossensor, e o circuito equivalente a ser usado para modelagem dos dados de EIE, o circuito de Randles modificado:

Figura 5. Reações de reconhecimento na interface eletrodo/solução em um biossensor impedimétrico. Também é mostrado o circuito equivalente de Randles modificado utilizado em sistemas com polímeros condutores.



Fonte: O Autor.

As reações de reconhecimento entre o biorreceptor e o analito acontecem de modo a impactar principalmente a interface eletrodo/solução, tendendo a diminuir a capacitância de dupla camada elétrica (*electric double-layer capacitance* – Q_{DL}). Outro parâmetro muito impactado, e no caso de biossensores impedimétricos tende a ser o parâmetro mais importante e estudado, é o R_{CT} , que indica o qual facilmente ocorrerão as trocas de carga entre eletrodo/solução, ou seja, é a resistência para essa transferência de cargas (BĂNICĂ, 2012c; ISLAM; CHANNON, 2020; REZAEI; IRANNEJAD, 2019; SIMÕES; XAVIER, 2017).

Quando uma biomolécula interage com a superfície do eletrodo, o valor de R_{CT} tende a aumentar. Isso ocorre porque as biomoléculas não apresentam comportamento eletroativo, assim elas vão dificultar as transferências de cargas na interface eletrodo/solução. Uma vez que a biomolécula se adsorve na superfície do eletrodo, é possível que ocorra o bloqueio de sítios eletroativos. Assim, o R_{CT} aumenta, pois agora as transferências de cargas são mais dificultadas pelo fato de os sítios eletroativos trocadores de cargas estarem bloqueados. Devido a isso, o R_{CT} é muito relatado como o principal parâmetro indicativo em um biossensor impedimétrico, pois suas variações podem ser

relacionadas com a concentração do analito. Além disso, o parâmetro é muito sensível à pequenas variações na interface, possibilitando a detecção de pequenas concentrações da biomolécula (BĂNICĂ, 2012c; ISLAM; CHANNON, 2020; LASIA, 2005; REZAEI; IRANNEJAD, 2019).

Na construção de biossensores impedimétricos utilizando interação entre antígeno-anticorpo um problema comumente encontrado é que o sinal produzido através da interação é relativamente pequeno, ainda mais levando em conta que normalmente são utilizadas pequenas concentrações das biomoléculas. Uma forma de estudar o sinal gerado pela interação de biomoléculas é utilizando de eletrodos modificados com moléculas condutoras, como por exemplo a utilização de polímeros condutores e de nanopartículas metálicas (como ouro) (BĂNICĂ, 2012c).

2.4 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA BIOMARCADORES CÂNCER

O câncer é uma doença grave que afeta a saúde de indivíduos no mundo todo, existindo em mais de 277 formas diferentes, além de ser a segunda principal causa de mortalidade no mundo, ficando atrás somente de doenças cardiovasculares (DAVID; ZIMMERMAN, 2010). Em 2018, ocorreram no mundo 18 milhões de casos novos de câncer, dos quais 9,6 milhões culminaram em óbito, enquanto no Brasil a estimativa é de que ocorram 625 mil novos casos de câncer para cada ano do triênio 2020-2022. No país os casos mais incidentes são referentes aos cânceres de próstata, pulmão, mama feminina e cólon e reto (INCA, 2020).

A mortalidade por doenças cancerígenas é maior ainda no estágio metastático da doença, onde as células cancerígenas se espalham e formam tumores, podendo afetar diferentes regiões do corpo. A detecção precoce de câncer aumenta significativamente a efetividade do tratamento, portanto, torna-se de suma importância o desenvolvimento de metodologias que consigam fazer essa detecção ultrasensível (DERVISEVIC et al., 2017; SANTOS, 2018). Assim, recentes trabalhos têm destacado os biossensores eletroquímicos na detecção de moléculas biológicas devido à sua eficiência, sensibilidade e capacidade de detecção precoce de várias doenças. A detecção precoce é um grande desafio, pois detectar doenças em estágios iniciais aumenta as chances de cura (SINGH et al., 2019).

O desenvolvimento de biossensores para detecção de biomarcadores de câncer têm sido alvo de grande pesquisa, porque esses dispositivos podem ser grandes aliados no monitoramento destes biomarcadores. Os métodos tradicionais de diagnóstico costumam

ser caros, demorados e de difícil acesso. Porém, o uso de biossensores faz viável a aplicação para diagnóstico precoce, o monitoramento da progressão da doença e o tratamento do câncer. Especialmente quando se falam de biossensores eletroquímicos, que são muito sensíveis, podem ser miniaturizados e podem fornecer respostas rápidas (HASAN et al., 2021).

2.4.1 Moléculas do grupo folato

Folato é um grupo de moléculas que pertencem ao grupo das vitaminas B, que são muito importantes em diversas funções biológicas, tais como regulação da função celular, síntese de DNA celular essencial, bem como sua reparação e metilação. Por se tratar de um grupo de moléculas tão importante para funções essenciais, quando há níveis inadequados de folato no corpo, suas funções são afetadas, podendo assim gerar problemas de saúde como doenças cardiovasculares, anemia, distúrbios embrionários e diversos tipos de câncer (BOBROWSKI-KHOURY et al., 2021; BOSS; AMETAMEY, 2020; O'CONNOR et al., 2021).

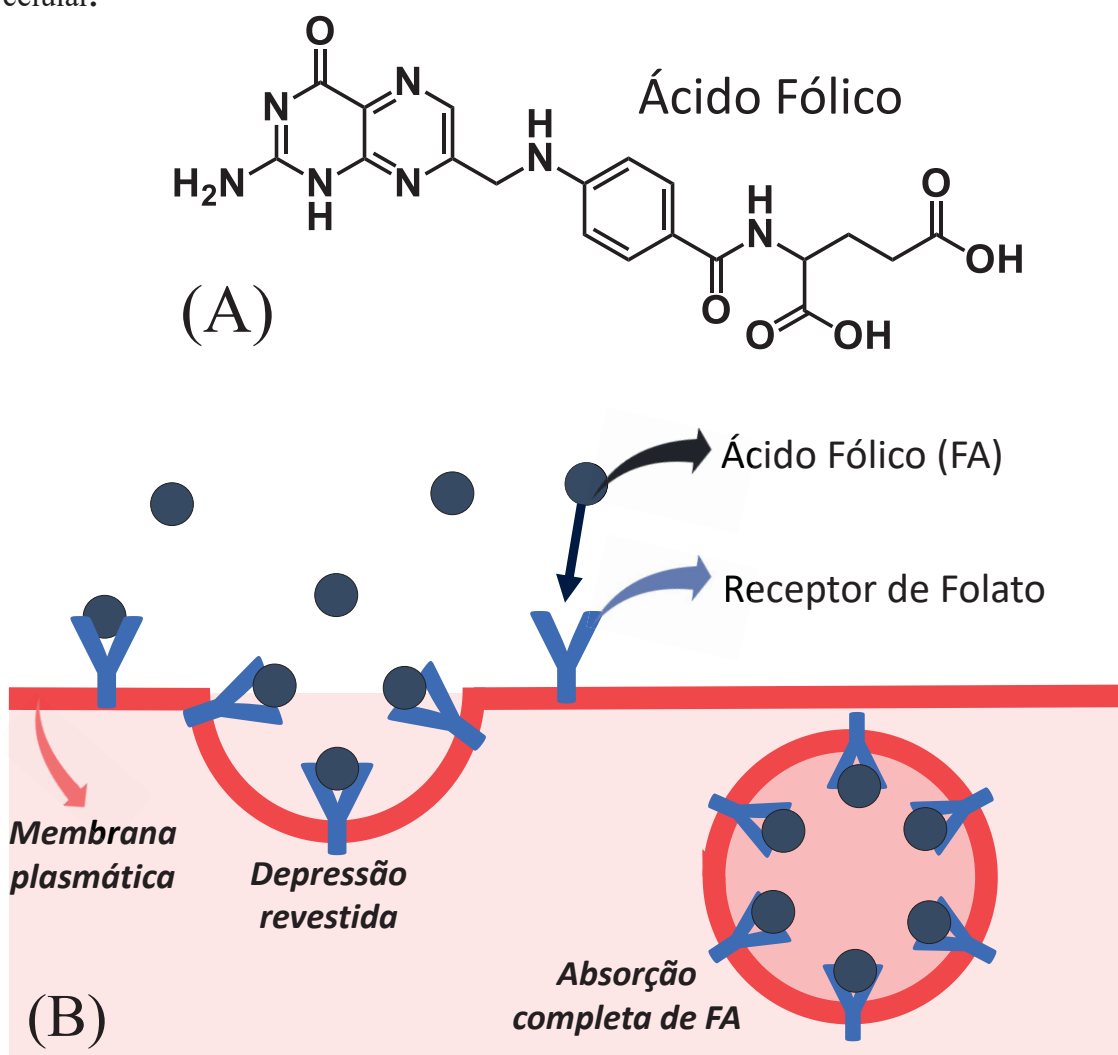
Os mamíferos são incapazes de sintetizar o folato, assim este deve ser obtido através da dieta. Pela alimentação, a forma mais comum do folato é o ácido fólico (*folic acid* - FA), também conhecido como vitamina B9, e é a forma sintética mais comum do folato, cuja estrutura é mostrada na Figura 6 (A) (MILLER, 2013). Uma vez ingerido, a absorção de folato em mamíferos possui três sistemas mediadores para transporte de folato: o portador de folato reduzido (RFC), o transportador de folato acoplado a prótons (PCFT) e o receptor de folato (FR). Cada um desses mediadores é fundamental e apresenta um mecanismo diferente de transporte: o principal sistema de transporte de folato é o RFC, que é responsável pelo transporte de folato do sangue para o tecido periférico; o PCFT é expresso principalmente no fígado e intestino, e absorve folatos dietéticos em condições de pH ácido (BAILEY; CAUDILL, 2012; SCARANTI et al., 2020).

A absorção de folato no corpo, a partir da ingestão de FA, é mediada pelos receptores de folato (FR), que são glicoproteínas que transportam o folato por um processo chamado de endocitose mediada por receptor, como mostrado na Figura 6 (B). Na endocitose, proteínas receptoras expressas na membrana celular, em regiões chamadas depressões revestidas, se ligam à molécula alvo. Uma vez ligados, a endocitose é desencadeada e o receptor com a molécula alvo ligados são levados para o interior da célula. Os FRs podem existir em diferentes formas, como o receptor de folato α (FR- α) e o receptor

de folato β (FR- β), sendo estes dois ancorados em membranas celulares por um grupo GPI (glicosil-fosfatidil-inositol) (BAILEY; CAUDILL, 2012; MILLER, 2013, 2013; MÜLLER; SCHIBLI, 2013; SCARANTI et al., 2020).

A ligação entre FA e FR- α apresenta uma alta especificidade ($KD = 10^{-9}$ M), assim, essa interação pode ser muito bem explorada para aplicação em biossensores, pois como o FA é uma molécula relativamente pequena (441 Da), e pode ser passível de sofrer modificações químicas. Outra vantagem é que o FA é uma vitamina, então apresenta uma tendência de não ser tóxico para órgãos e tecidos saudáveis, nem provocar reações imunológicas. Além disso, estudos indicam que os níveis normais de FA no soro humano estão entre 5-15 ng mL⁻¹ (BATRA et al., 2020; DI TINNO; CANCELLIERE; MICHELI, 2021; MÜLLER; SCHIBLI, 2013).

Figura 6. A figura (A) mostra a estrutura do Ácido Fólico, e na figura (B) o processo de absorção de FA no corpo realizada pelos receptores de folato α expressos na membrana celular.



Fonte: O Autor.

O FR- α também é conhecido como proteína de ligação ao folato (*folate binding protein* – FBP), sendo uma proteína que têm despertado muito interesse na pesquisa com biossensores, pois além de ser expressa em algumas membranas epiteliais normais, também é expressa em superfícies de células cancerígenas de origem epitelial (CLIFTON et al., 2011; MÜLLER; SCHIBLI, 2013). Alguns dos tipos de câncer com maior frequência de expressão de FR- α são de ovário (90%), endometrial (90%), cérebro (90%), pulmão (78%) e carcinoma renal (75%), enquanto outros, como o de mama (48%) e de estômago (38%) apresentam menores índices de expressão da proteína FR- α (MÜLLER; SCHIBLI, 2013). Em todos os casos, é muito importante avaliar o nível de expressão, pois este pode estar diretamente relacionado com a taxa de recuperação do paciente. A proteína FR- α é classificada como um biomarcador de câncer, pois seus níveis podem ser um indicativo da doença, bem como seu estágio (BAILEY; CAUDILL, 2012; CORREIA et al., 2021; DERVISEVIC et al., 2017; MÜLLER; SCHIBLI, 2013; SCARANTI et al., 2020).

Outra estratégia que pode ser empregada para quantificação de FR- α é através do uso de anticorpos anti-FR (*anti-FR*), onde diversas estratégias tem buscado desenvolver metodologias para diagnosticar e tratar diversos tipos de tumores, como por exemplo o uso de anticorpos monoclonais, ou o uso de conjugados de medicamentos com anticorpos, ou ainda anticorpos específicos para direcionar seletivamente a terapia para o tecido tumoral (CLIFTON et al., 2011). Além dessa terapia, pode se tornam muito relevante detectar anticorpos anti-FR, pois podem atuar como interruptores do transporte de folato. Essa interrupção pode causar problemas de saúde severos, como por exemplo durante a gestação: sem a completa absorção de folato pelas células, mediada pelo FR, é possível que o desenvolvimento do feto seja afetado, especialmente o sistema nervoso central, podendo causar problemas no tubo neural, autismo e outras doenças neurológicas no feto (BOBROWSKI-KHOURY et al., 2021).

Sendo assim, torna-se muito relevante o estudo das moléculas do grupo folato, por apresentarem funções biológicas tão importantes e por serem potenciais indicativos de doenças. O desenvolvimento de biossensores eletroquímicos pode muito útil para estudo e avaliação destas moléculas, bem como as possíveis doenças com as quais podem estar relacionadas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um biossensor baseado em eletrodo de malha de aço recoberto por polímeros condutores (PEDOT e/ou PPI) e AuNPs para estudo e detecção ultrasensível de moléculas do grupo folato.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir plataformas formados pelo material híbrido através da combinação entre PEDOT e PPI com AuNPs sobre eletrodos de malha de aço;
- Caracterizar por técnicas eletroquímicas as etapas envolvidas na construção do biossensor;
- Construir e caracterizar os biossensores formados pela imobilização das biomoléculas de reconhecimento sobre a plataforma desenvolvida;
- Avaliar o desempenho dos biossensores mediante a detecção de baixas concentrações das biomoléculas;
- Avaliar os biossensores construídos mediante interação com a proteína receptora de folato, e exploração dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos obtidos a partir das interações biomoleculares;
- Avaliar a viabilidade econômica do biossensor construído.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água ultrapura (ElgaLab water 18 M Ω cm). Foi utilizado 3,4-etilenodioxitofeno (EDOT, Aldrich), pirrol (PI, Aldrich), alaranjado de metila (AM, Aldrich), ácido nítrico (HNO₃, Synth), trihidrato de cloreto de ouro (III) (HAuCl₄.3H₂O, Aldrich), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, Aldrich), cloreto de potássio (KCl, Aldrich), N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida (EDC, Aldrich), N-hidroxissuccinimida (NHS, Aldrich), tampão fosfato salino (*phosphate buffered saline* – PBS) e ácido aminoacético (Glicina). Os pares biológicos (antígeno-anticorpo) a serem utilizados nos estudos foram adquiridos da Abcam. O primeiro par testado foi com base na interação avidina-biotina, e que consistia em Avidina-HRP (ab59653), proteína inteira nativa do frango conjugada com peroxidase (HRP do inglês *horseradish peroxidase*). A outra biomolécula é a anti-avidina, que é uma fração do anticorpo IgG policlonal da avidina imunizado em coelho, biotilado com 10 a 20 moléculas de biotina via NHS (ab7235). Os testes com proteínas folato foram realizados utilizando-se a proteína recombinante de Folato humana (*Recombinant human Folate Binding Protein - FBP* (ab167698)), o Anticorpo de ligação a proteína Folato (*Anti-Folate Binding Protein antibody* [LK26] – *FBP-Ab* (ab3361)) e o Ácido Fólico (Aldrich).

4.2 CARACTERIZAÇÕES E INSTRUMENTAÇÃO

As sínteses foram realizadas utilizando-se um potenciostato DropSens, com uma célula eletroquímica contendo três eletrodos. Como mesmo potenciostato, realizou-se as caracterizações eletroquímicas por EIE e VC, utilizando como eletrólito uma solução tampão de PBS 0,1 mol L⁻¹, com pH de 7,4. Como eletrodo de referência utilizou-se Ag/AgCl/KCl_{sat}, o eletrodo auxiliar utilizado foi um espiral de platina de elevada área superficial, e como eletrodo de trabalho foi utilizado malha de aço 316 - mesh 400, previamente limpo através de imersões em etanol e água ultrapura.

As caracterizações do material foram obtidas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR (CME-UFPR), onde efetuou-se as imagens representativas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS) com

equipamento Tescan Vega3 LMU, Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) com equipamento JEOL JEM 1200EX-II com resolução de 0,5 nm.

4.3 PREPARO DOS ELETRODOS

Os eletrodos de malha de aço a serem usados foram preparados da seguinte forma: cortou-se um pedaço de malha de aço com área de 2x1,2 cm, seguida de lavagem do eletrodo em solução de etanol por 15 minutos em banho ultrassônico. Realizou-se então a limitação da área de síntese do eletrodo em 0,5x1,2 cm com o auxílio de esmalte, como será mostrado na Figura 7.

A síntese de nanotubos dos polímeros foram realizadas seguindo método eletroquímico já descritos em literatura (HRYNIEWICZ et al., 2019; HRYNIEWICZ; VIDOTTI, 2018), onde o Alaranjado de Metila (AM) em meio ácido (pH entre 3,3 e 4,4) forma agregados em forma de paralelepípedo, que servem como *template* para a polimerização do monômero.

4.4 SÍNTESE DE NANOTUBOS DE PPI

A síntese eletroquímica dos nanotubos de PPI foi realizada seguindo método já descrito na literatura (HRYNIEWICZ et al., 2019), em solução contendo o monômero PI na concentração de 100 mmol L⁻¹, AM na concentração de 5 mmol L⁻¹ e KNO₃ na concentração de 8 mmol L⁻¹, sendo o pH da solução ajustado com solução 1 mol L⁻¹ de HNO₃. Realizou-se a síntese eletroquímica pelo método potenciostático, aplicando-se 0,8 V com controle de carga de 0,5 C cm⁻², utilizando-se como eletrodo de trabalho a malha de aço, cujo preparo foi descrito no item 4.3.

4.5 SÍNTESE DE NANOTUBOS DE PEDOT

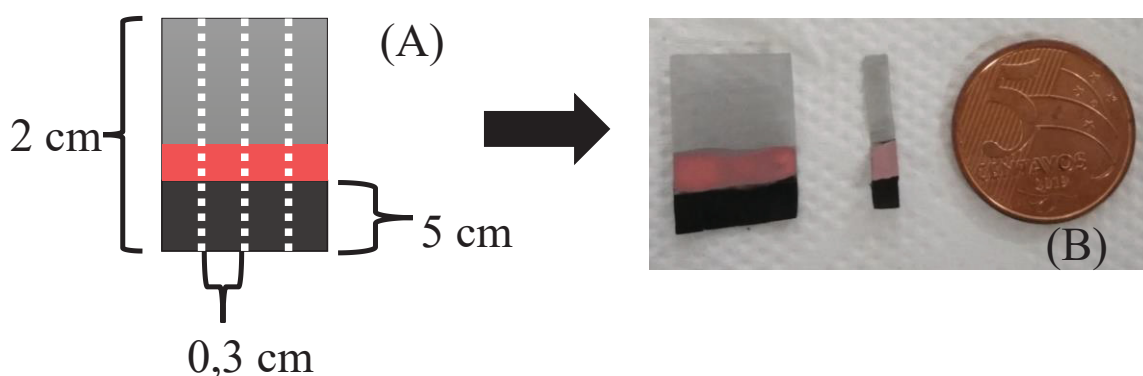
Os nanotubos de PEDOT foram sintetizados eletroquimicamente pelo método potenciostático (HRYNIEWICZ; VIDOTTI, 2018), aplicando-se +1,25 V com controle de carga de 0,5 C cm⁻² em solução contendo o monômero EDOT na concentração de 50 mmol L⁻¹, AM na concentração de 5 mmol L⁻¹ e KNO₃ na concentração de 8 mmol L⁻¹, utilizando-se HNO₃ 1 mol L⁻¹ para ajuste do pH da solução e malha de aço como eletrodo de trabalho, cujo preparo foi descrito no item 4.3.

4.6 SÍNTESE DE HÍBRIDOS FORMADOS POR POLÍMEROS CONDUTORES E AuNPs

A deposição das AuNPs sobre os eletrodos modificados com PPI/AuNPs e PEDOT/AuNPs foi realizada a partir de uma solução contendo HAuCl_4 na concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, K_2HPO_4 na concentração de $1,7 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$, Na_2SO_3 na concentração de $3,6 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e EDTA na concentração de $4,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. A adição dos reagentes foi realizada nesta ordem, e as vidrarias foram previamente limpas em banho ácido, evitando-se assim qualquer possível precipitação de ouro, o que causaria o escurecimento da solução (COLOMBO et al., 2015). A eletrodeposição foi realizada por meio do método cronoamperométrico, aplicando-se $-1,1 \text{ V vs Ag/AgCl/Cl}^-_{\text{sat}}$, com o controle da quantidade de material por carga de deposição de 300 mC cm^{-2} , em presença de 10 mL da solução de trabalho descrita anteriormente. A síntese das AuNPs foi realizada logo após a modificação dos eletrodos de malha de aço com PPI ou PEDOT, posteriormente o eletrodo foi limpo com água ultrapura.

Após a deposição de AuNPs nos eletrodos, cortou-se o mesmo como mostrado na Figura 7, ocasionando assim na separação do eletrodo maior em 4 eletrodos com dimensões de $2 \times 0,3 \text{ cm}$, os quais serão utilizados para construção do biossensor.

Figura 7. A figura (A) mostra o esquema corte dos eletrodos, e na figura (B) mostra a imagem real de um eletrodo, após polimerização e deposição de AuNPs, em comparação com o tamanho de uma moeda de 5 centavos.



Fonte: O autor.

4.7 CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR

Sobre o eletrodo modificado (PEDOT-NTs/AuNPs e PPI-NTs/AuNPs) realizou-se a formação de uma SAM com o MPA, composto escolhido pois o enxofre (grupo tiol) possui elevada afinidade com as AuNPs. Deixou-se o eletrodo imerso *overnight* (~16 h) em solução de MPA. Após, lavagem em água ultrapura por 15 minutos. A ativação da SAM foi realizada mergulhando-se o eletrodo em solução contendo EDC:NHS de concentrações 100 e 150 mMol L⁻¹, respectivamente, na qual deixou-se por 20 minutos para que a reação ocorresse. Após a ativação, foi possível realizar o ancoramento do biorreceptor.

4.8 TESTES COM BIOTINA-AVIDINA

Com propósito de verificar o comportamento da plataforma frente à pares biológicos, testou-se primeiramente o par avidina-biotina que é muito conhecido e descrito na literatura, por apresentar uma interação muito específica e estável. Neste trabalho, serão utilizadas as nomenclaturas de “Avidina” para Avidina-HRP e de “Biotina” para o anticorpo anti-avidina, para um melhor entendimento.

Ambas as moléculas podem ser usadas como biorreceptor ou como analito, sendo que após a imobilização do bioreceptor no eletrodo, realizou-se o bloqueio através da adição do eletrodo em solução de glicina 100 mMol L⁻¹ por 15 minutos, procedida de lavagem do eletrodo em PBS por 5 minutos. A glicina bloqueia sítios inespecíficos de ligação do analito.

4.9 TESTES COM O PROTEÍNAS FOLATO

A amostra original da FBP era de 600 µg de um sólido branco em um frasco de vidro. Como a massa é muito pequena, e seguindo as recomendações da ficha de instrução (*datasheet*) da proteína, preparou-se a solução no próprio frasco, adicionando-se 500 µL de PBS, resultando em uma solução *mãe* de 200 µg mL⁻¹. Coletou-se uma alíquota de 10 µL da solução *mãe*, e esta foi diluída para 1 mL de PBS, resultando em uma solução estoque de 2 µg mL⁻¹, que foi utilizada para a realização do experimento. Esta solução estoque foi diluída para uma solução 200 ng mL⁻¹. Após, o eletrodo é mergulhado por 45 minutos em 75 µL da solução 200 ng mL⁻¹ para imobilização da proteína recombinante no eletrodo. Após o tempo, fez-se lavagem do eletrodo por 15 minutos em PBS.

Efetou-se então o bloqueio de sítios ativos não-específicos na superfície do eletrodo, realizando a imersão do eletrodo em solução de glicina 100 mMol L⁻¹ (ácido aminoacético) por 15 minutos, procedida de lavagem do eletrodo em PBS por 5 minutos.

Após o bloqueio, realizou-se então a detecção de concentrações variadas do anticorpo FBP-Ab (LK26). A solução estoque do anticorpo era um líquido com 500 μL de solução em concentração de $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$. A partir desta, preparou-se uma solução estoque de 100 ng mL^{-1} em PBS. A imobilização do anticorpo foi feita mergulhando-se o eletrodo na respectiva solução de concentração conhecida do anticorpo por 30 minutos, procedida de lavagem em PBS por 5 minutos. A partir da solução estoque, realizou-se o preparo das seguintes concentrações a serem usadas para detecção. O procedimento para detecção de Ácido Fólico foi o mesmo, alterando-se apenas as concentrações, cujas quais foram: 0,01, 0,1, 1, 5, 10, 25 e 50 ng mL^{-1} .

4.9.1 Teste de estabilidade de reposta por EIE

Como forma de avaliar a estabilidade da resposta da EIE, mergulhou-se o eletrodo em uma solução contendo a concentração de $0,1 \text{ pg mL}^{-1}$ de FBP-Ab por 30min, e efetuaram-se 3 medidas seguidas de EIE no mesmo eletrodo. Após, o eletrodo foi removido da célula eletroquímica e mergulhado em uma solução contendo apenas PBS, sem nenhuma molécula biológica, também por 30 minutos. O objetivo foi simular uma detecção, e esta então foi procedida por mais 3 medidas de EIE. Os resultados obtidos foram analisados pela análise de variância (ANOVA) com 95% de confiança, para comprovar se as medidas foram de fato iguais ou não.

4.9.2 Testes com PPI na morfologia de filme

Como forma de verificar a diferença causada pela morfologia do polímero, testes com PPI na morfologia de filme foram realizados utilizando a mesma estratégia de construção do biossensor. O filme de PPI foi formado por eletrodeposição em solução contendo 10 mM de SDBS como dopant e 100 mM de pirrol. As condições eletroquímicas foram as mesmas, sendo realizada por cronoamperometria, com 0,8 V e controle de carga de 500 mC cm^{-2} (DE LAZZARI et al., 2019). Novamente o FBP atuou como receptor na concentração de 200 ng mL^{-1} e efetuou-se a detecção de 0,1, 100, 500 e 1000 pg mL^{-1} do anticorpo FBP-Ab, e as etapas foram caracterizadas por VC e EIE.

4.9.3 Testes de adsorção das moléculas biológicas no polímero

Para estudar as propriedades adsortivas das biomoléculas no polímero, construiu-se um eletrodo modificado apenas com o PPI-NT. Primeiramente, este eletrodo foi imerso em soluções com 0,1, 100, 500 e 1000 pg mL⁻¹ do anticorpo FBP-Ab. A adsorção do anticorpo ao polímero foi monitorada por EIE.

Outro teste feito foi a da construção do par biológico em um eletrodo novamente modificado apenas com o polímero. Assim, dois eletrodos foram construídos seguindo a estratégia de usar FBP como receptor e de detecção de 0,1, 100, 500 e 1000 pg mL⁻¹ do anticorpo FBP-Ab, monitoradas por VC e EIE. A diferença entre os eletrodos é que em um deles efetuou-se a etapa de bloqueio com glicina e no outro esta etapa não foi efetuada, para estudo do efeito do bloqueio de sítios não-específicos com glicina.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para melhor discussão e compreensão dos resultados, estes foram divididos em duas partes:

PARTE I – SÍNTESE E CARATERIZAÇÃO DO ELETRODO

Síntese e caracterizações eletroquímicas, por MET, MEV e EDS dos eletrodos (PEDOT-NTs / AuNPs e PPI-NTs / AuNPs) que serão utilizados na construção do biossensor.

PARTE II – CONSTRUÇÃO DO BIOSSENSOR

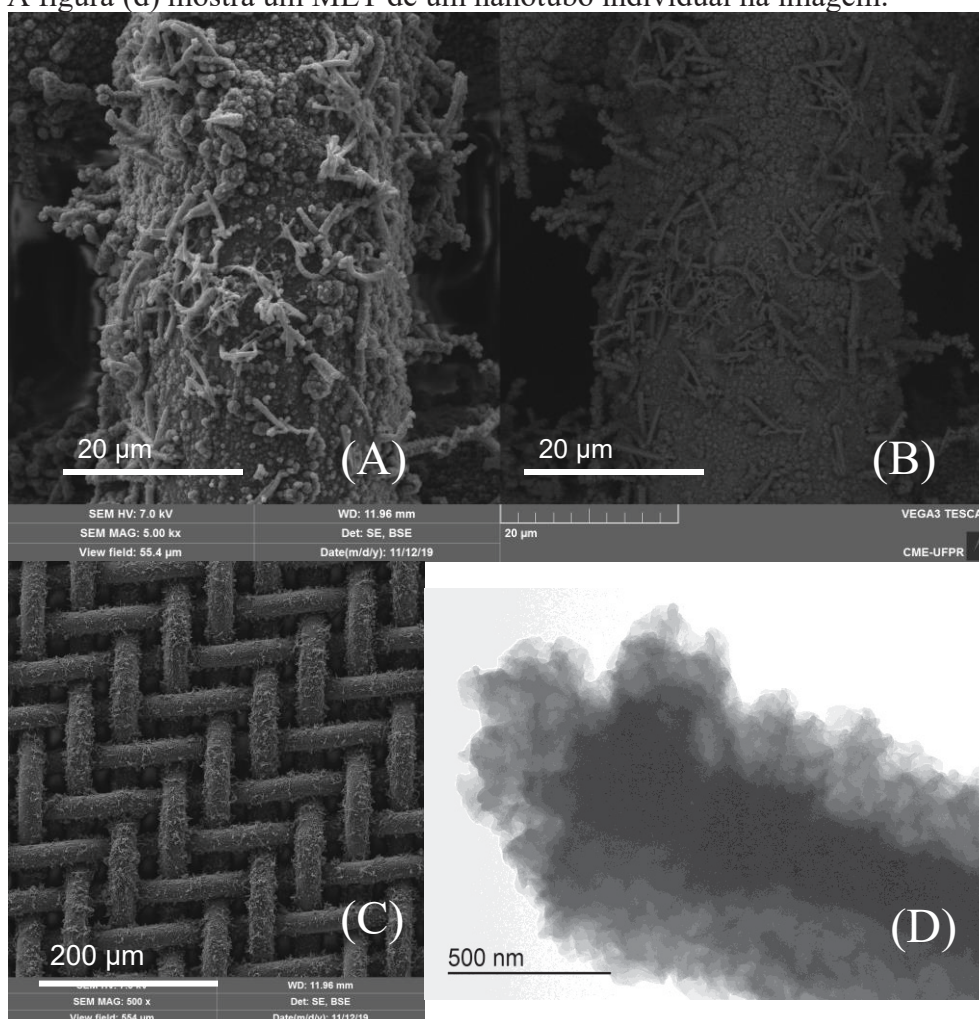
Modificações dos eletrodos e construção do biossensor, com formação da SAM, ativação da monocamada e ancoramento das biomoléculas. Nesta parte foram realizadas caracterizações eletroquímicas, e em alguns experimentos a caracterização foi realizada somente a partir da etapa de detecção do analito, para melhor otimização da metodologia experimental.

5.1 PARTE I – SÍNTESE E CARATERIZAÇÃO DO ELETRODO

5.1.1 Eletrodos modificados com PEDOT-NTs

A morfologia de PEDOT-NTs foi caracterizada por imagens de MEV e MET e é mostrada na Figura 8. Nota-se através das imagens de MEV que a morfologia de nanotubos do polímero não está homogênea, observando-se uma formação tanto de nanotubos quanto de morfologias globulares. Assim, primeiras impressões visuais mostram que o polímero recobriu por completo a malha, e a sua morfologia variou entre nanotubo, globular e filme. A morfologia não predominantemente de nanotubos pode estar associada ao fato de o pH não estar na acidez adequada, provavelmente um pouco acima da acidez adequada, pois como destacado em um trabalho anterior de uma metodologia já aplicada no grupo, a morfologia é predominantemente de nanotubos em pH ácido (pH = 2 e pH=4) (HRYNIEWICZ; VIDOTTI, 2018).

Figura 8. Caracterização da morfologia do eletrodo com PEDOT-NTs. As imagens de MEV mostram (a) uma imagem de elétrons secundários do fio da malha e (b) o mesmo fio com imagem de elétrons retroespalhados e (c) uma imagem de elétrons secundários geral da malha. A figura (d) mostra um MET de um nanotubo individual na imagem.



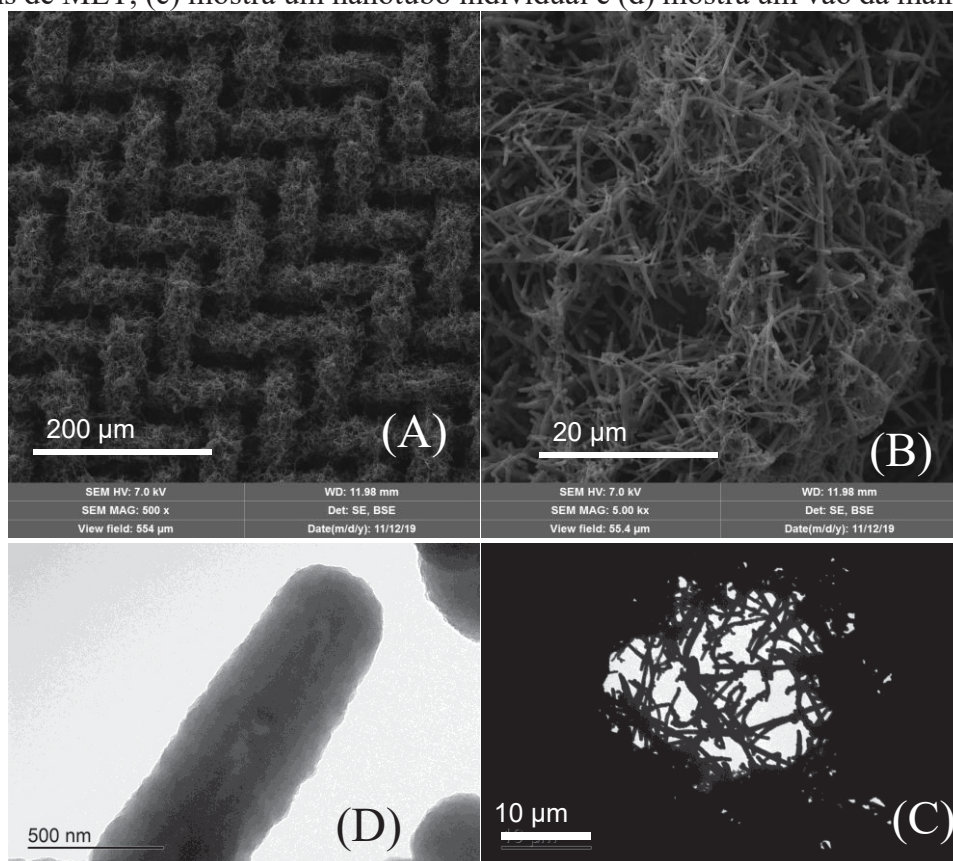
Fonte: O Autor.

A Figura 25 (A) do Anexo III mostra o espectro de EDS obtido para a amostra, comprovando a presença de um sinal intenso para o enxofre (S) e também para o oxigênio (O), proveniente da estrutura do PEDOT, como mostrado na Figura 2.

5.1.2 Eletrodos modificados com PPI

A síntese de PPI-NTs foi realizado seguindo método descrito em literatura, no qual em meio ácido as moléculas de AM agregam-se e formam nanoestruturas do tipo paralelepípedo, que são usadas como *templates* para a polimerização de PPI-NTs (HRYNIEWICZ et al., 2019). Os eletrodos modificados com PPI-NTs também foram caracterizados por MET e por MEV e são mostrados na Figura 9.

Figura 9. Caracterização da morfologia do eletrodo com PPI-NTs. As imagens de MEV mostram (a) uma imagem de elétrons secundários geral da malha e (b) uma imagem de elétrons secundários, mas com ampliação maior para pegar um fio da malha. Para as imagens de MET, (c) mostra um nanotubo individual e (d) mostra um vão da malha de aço.



Fonte: O Autor.

É possível observar que a morfologia predominante é a de nanotubo, e que o recobrimento da malha é quase que completo. Através do espectro de EDS mostrado na Figura 26 (A) do Anexo III comprova-se a presença de PPI, uma vez que há um sinal intenso para nitrogênio (N), proveniente da estrutura do polímero, como mostrado na Figura 1.

5.1.3 Deposição de AuNPs e caracterização morfológica

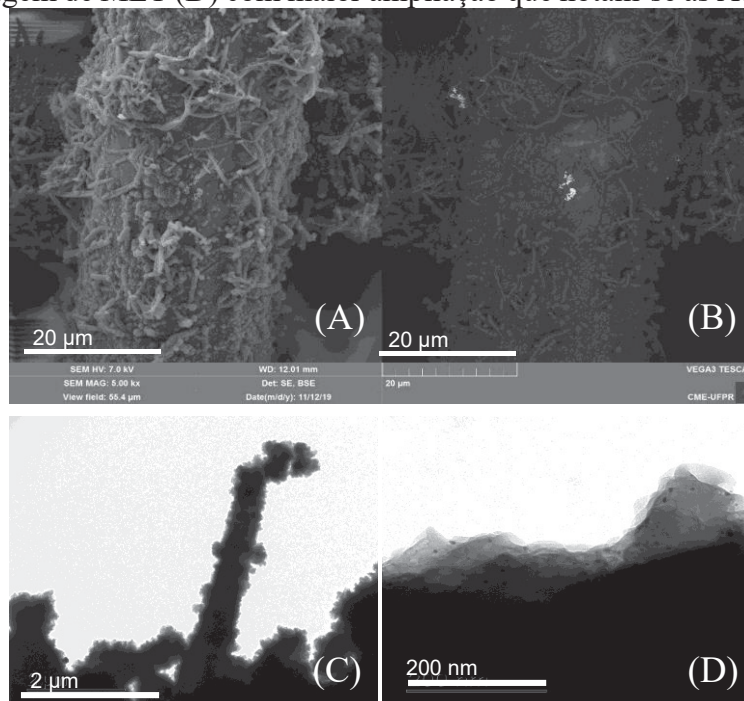
A presença de átomos de enxofre na estrutura polimérica é um fator chave, pois há uma alta afinidade na ligação Au-S, favorecendo a deposição de AuNPs (FERREIRA et al., 2011). A solução de trabalho é composta por HAuCl_4 , fonte do cátion Au^{3+} , SO_3^{2-} , EDTA que melhora as propriedades mecânicas dos filmes e o HPO_4^{2-} que atua como um agente auxiliar de complexação e também como agente tampão para a solução. A eletrodeposição

de AuNPs é feita com potencial de -1,1 V, que é descrito em literatura como suficiente para reduzir íons Au^{3+} presentes em solução a nanopartículas (COLOMBO et al., 2015).

A deposição de AuNPs foi caracterizada por imagens de MET, MEV e espectros EDS. Pode-se observar a formação de aglomerados claros na Figura 10 (a), que são melhor observados com a Figura 10 (b) com imagem de elétrons retroespalhados de MEV. É importante ressaltar que na imagem de MEV aparecem aglomerados, ou seja, mesmo os pontos que podem parecer de nanopartículas isoladas, na verdade representam pequenos aglomerados de AuNPs.

Nanopartículas individuais foram caracterizadas por MET na Figura 10 (c). Nas imagens de MET é possível observar-se que os nanotubos são aparentemente rugosos, sendo mais escuros em seu interior. Na imagem entre o vão da malha, observa-se que não é completamente preenchida pelo PEDOT, pois há formação de aglomerados e poucos são os nanotubos individuais. Quanto ao ancoramento de AuNPs, são observados pequenos pontos pretos, que caracterizam AuNPs individuais.

Figura 10. Caracterização dos eletrodos com PEDOT-NTs e AuNPs. A imagem de MEV (A) com elétrons secundários mostra um fio da malha. A imagem (B) com elétrons retroespalhados mostra o mesmo fio. A imagem de MET (C) mostra nanotubos de PEDOT, mas só na a imagem de MET (D) com maior ampliação que notam-se as AuNPs individuais.



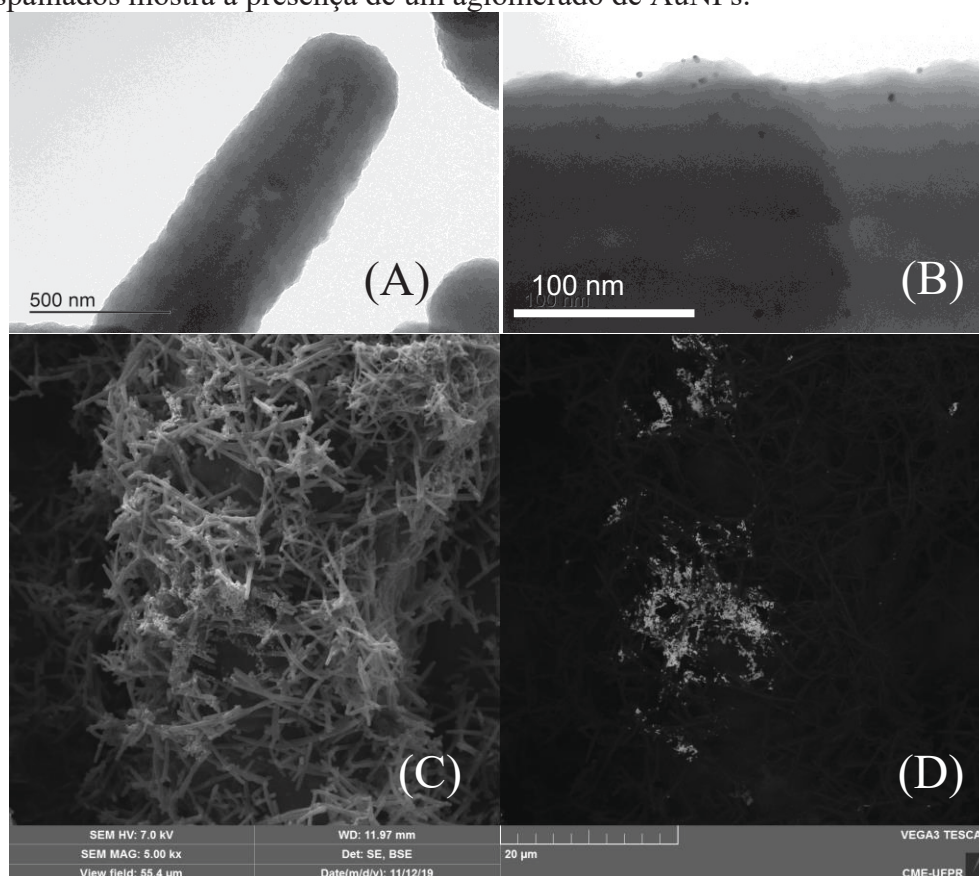
Fonte: O Autor.

A presença de AuNPs é comprovada pelos espectros de EDS, os quais foram feitos com pontos espectrais nos aglomerados, como observado na Figura 10 (d), e indicaram

intensos sinais para ouro, como mostrado na Figura 25 (B) do Anexo III, na qual o espectro de EDS mostra um sinal intenso para Au, caracterizando a presença das AuNPs.

Da mesma maneira fez-se para a síntese e caracterização morfológica do híbrido de PPI-NTs/AuNPs. A Figura 11 mostra as caracterizações por MET e por MEV:

Figura 11. Caracterização dos eletrodos com PPI-NTs e PPI-NTs/AuNPs. O MET (A) mostra um nanotubos individual de PPI, enquanto no MET (B), com uma maior ampliação, a presença de AuNPs. A imagem de elétrons secundários de MEV (C) mostra uma ampliação maior de um fio da malha, enquanto no MEV (D) a imagem com elétrons retroespalhados mostra a presença de um aglomerado de AuNPs.



Fonte: O Autor.

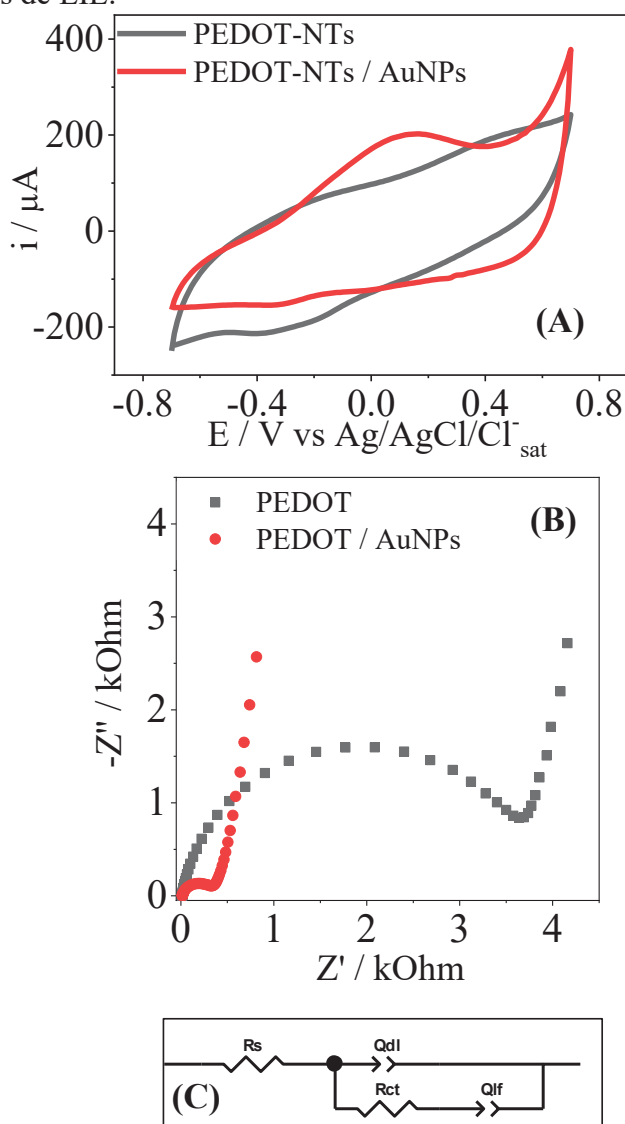
A Figura 11 (A) e Figura 11 (B) de MET mostra a presença de pequenos pontos escuros, representando a presença de AuNPs e seu tamanho na escala nanométrica. Observando-se as imagens de MEV, é possível verificar a polimerização em um fio individual da malha de aço Figura 11 (C) com imagem de elétrons secundários, e no MEV (D), na imagem de elétrons retroespalhados é possível verificar a presença de aglomerados claros, representando a presença de AuNPs. Observa-se também que a morfologia predominante é a de nanotubos. Novamente, para a Figura 26 (B) do Anexo III que mostra

o espectro de EDS que confirma a presença de AuNPs, uma vez que apresenta um sinal intenso para a presença de ouro.

5.1.4 Caracterizações Eletroquímicas do híbrido de PEDOT-NTs/AuNPs

Como descrito na metodologia, todas as etapas foram caracterizadas por EIE e por VC. Os dados obtidos para VC e EIE são mostrados na Figura 12:

Figura 12. Voltametria cíclica (A) para os eletrodos modificados com PEDOT-NTs (em preto) e para PEDOT-NTs com AuNPs (em vermelho). Na figura (B) é mostrado o Diagrama de Nyquist obtido a partir de eletrodos modificados com PEDOT-NTs e com PEDOT-NTs/AuNPs. Na imagem (C) é mostrado o circuito equivalente utilizado para modelar os resultados de EIE.



Fonte: O autor.

Comparando-se os voltamogramas cíclicos, nota-se, pela VC na presença de AuNPs, que há um favorecimento do processo difusivo, pois há surgimento de processos de oxidação, mas observando os processos de redução, nota-se que aparentemente não é tão reversível, pois não há nenhuma onda voltamétrica tão destacada. É possível notar que o voltamograma na presença de AuNPs é menos inclinado, mostrando que o sistema apresenta ser menos resistivo, com uma onda voltamétrica menos pronunciada e com maior separação entre os processos redox. Além disso, há o início de uma oxidação em +0,6 V e o surgimento de uma corrente de redução em um potencial parecido, provavelmente devido ao comportamento eletroativo do polímero. Também há a presença de uma corrente de oxidação entre 0,0 e 0,2 V, que pode estar relacionado ao início de outro processo, podendo ser a oxidação do polímero, do eletrólito, ou até mesmo formação de oxigênio.

Os testes de EIE foram realizados aplicando-se um potencial de corrente contínua (*dc*), no qual usou-se o potencial de circuito aberto, com corrente alternada (*ac*) de 0,01 V com uma variação de frequência de 10 kHz a 10 mHz.

Nota-se que há uma diminuição no R_{CT} do sistema, e a resposta obtida é característica de polímeros condutores, sendo um semicírculo que vai de altas a médias frequências e uma reta em baixas frequências. Os resultados obtidos foram modelados de acordo com o circuito equivalente mostrado na Figura 12 (C), o qual será utilizado para modelagem de todos os resultados obtidos neste trabalho por EIE. Os resultados para os parâmetros estabelecidos são mostrados na Tabela 1:

Tabela 1. Valores de parâmetros calculados de EIE para PEDOT-NTs e PEDOT-NTs/AuNPs.

	$R_s/k\Omega$	$Q_{DL}^{-5} F s^{n-1}$	n_{DL}	$R_{CT}/k\Omega$	$Q_{LF}^{-3} F s^{n-1}$	n_{LF}
PEDOT	0,01	6,87	0,90	3,82	4,6	0,90
PEDOT/AuNPs	0,02	12,77	0,83	0,36	4,3	0,86

Fonte: O Autor.

A Tabela 1 indica que ocorre uma facilitação na transferência de carga na interface polímero/eletrólito com a presença das nanopartículas, sendo este fato representado pelo parâmetro de resistência de transferência de carga (R_{CT}), como mostrado no circuito equivalente da Figura 12 (C), e por isso seu valor tem uma diminuição, pois as AuNPs aumentam a capacidade do filme eletrodo ativo de trocar de carga com a solução, ou seja, a resistência para essa troca diminui. Além das propriedades condutoras, o ouro apresenta a propriedade de ser um material catalítico, o que é ainda mais aprimorado por ser em forma

de nanopartícula. As AuNPs apresentam uma energia superficial elevada, quando em comparação ao ouro na forma *bulk*, que pode ser muito explorada para sistemas catalíticos. Por mais que a eletrocatalise não seja o foco deste trabalho, a presença das AuNPs pode ser explorada para estudar alterações na interface eletrodo/solução, e a quantificação pode ser realizada pela técnica de EIE, a qual é capaz de detectar sutis alterações interfaciais. Essas alterações podem estar relacionadas à processos de adsorção na interface, e podem ser detectadas até mesmos em concentrações mais baixas quando comparadas às demais técnicas eletroquímicas. O parâmetro de R_{CT} pode ser um bom indicativo destas alterações, uma vez que a adsorção de moléculas pode afetar a troca de cargas entre eletrodo e solução, e isso gera uma alteração no valor do R_{CT} . Tal alteração, para o caso de biomoléculas, é observado como um aumento no valor do R_{CT} , pois como esse parâmetro representa uma resistência, quando uma biomolécula (uma proteína, por exemplo) que não apresenta características condutoras se adsorve na interface do eletrodo, ela irá atrapalhar as transferências de cargas entre o eletrodo e o eletrólito, ou seja, o valor da resistência aumenta, neste caso representado pelo aumento do R_{CT} .

Os outros componentes do circuito equivalente são a resistência em série (R_S) do sistema (cabos elétricos, eletrólito, polímero), que não sofre grande alteração, porque a matriz polimérica continua sendo o material predominante no eletrodo e sua resistência pouco varia, pois a deposição de AuNPs ocorre na superfície polimérica. O parâmetro de R_S apresenta uma análise mais complicada, pois como após cada modificação o eletrodo é removido e colocado na célula eletroquímica, é bem provável que ele não esteja sempre na mesma posição, e isso por si só causa uma incerteza no valor do R_S . A análise do R_S se torna confiável para casos onde a célula eletroquímica é perfeitamente reprodutível, como para medidas em sequência, sem remoção ou adição de eletrodos ou solução.

Como uma das grandes características das AuNPs é a sua elevada área superficial, espera-se que com a eletrodeposição das mesmas nos eletrodos ocorra um aumento da área superficial do mesmo. Isso pode ser comprovado com os valores da capacitância de dupla camada elétrica (Q_{DL}), que aumentam com a deposição de AuNPs, significando que mais íons são necessários para efetuar o carregamento da dupla camada elétrica, devido ao aumento da área superficial, o que reflete diretamente na capacidade de armazenamento elétrico (GONÇALVES; PEREIRA; MARCHESI, 2017; WOLFART et al., 2017).

Em baixas frequências, a intercalação de cargas na matriz polimérica (Q_{LF}) indica uma leve variação nos valores, significando que a intercalação de cargas não tem uma tendência de aumento, causada pela deposição de AuNPs. Os parâmetros n_{DL} e n_{LF} indicam

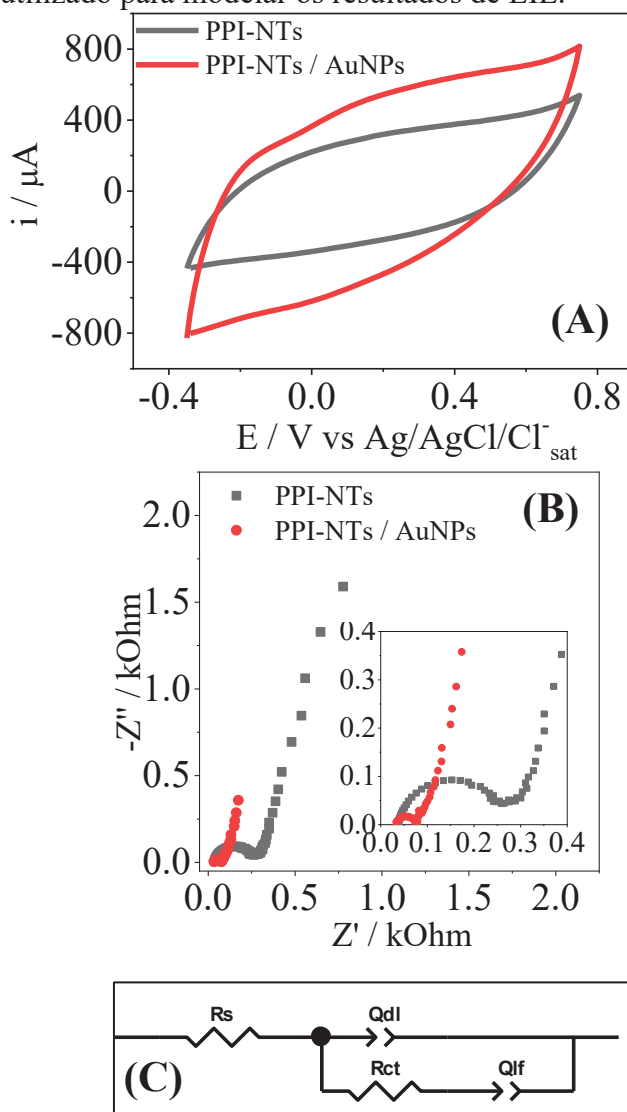
o desvio da idealidade do capacitor, por isso usa-se elementos de fase constante na modelagem dos dados. Os valores de n_{DL} e n_{LF} variam entre 0 e 1, sendo que há três valores-chaves para sua análise, onde 1 representa um capacitor ideal, 0,5 elemento de Warburg, e 0 um resistor. O valor de n_{DL} indica a homogeneidade do carregamento da dupla camada elétrica na superfície do eletrodo. Esse carregamento é representado pela formação de um capacitor, pois entre a interface eletrodo/solução há o acúmulo de cargas opostas. Deste acúmulo de cargas surge uma capacitância, representada pelo parâmetro Q_{DL} . Após carregar a dupla camada elétrica, ocorre a difusão de íons para dentro da matriz polimérica, que intercalarão com as cargas já presentes na matriz. Neste sentido, o parâmetro de n_{LF} representa a homogeneidade desta intercalação de cargas na matriz polimérica (GONÇALVES; PEREIRA; MARCHESI, 2017; REZAEI; IRANNEJAD, 2019; SIMÕES; XAVIER, 2017).

Assim, em respeito à morfologia, nota-se que a homogeneidade da morfologia da superfície do eletrodo diminui com a deposição de AuNPs, indicado pela diminuição do valor de n_{DL} . O parâmetro de n_{LF} não apresenta grandes variações, pois é possível que a quantidade depositada de AuNPs não seja suficiente para impactar na intercalação de cargas dentro da matriz polimérica. Pode ser que as AuNPs atuem como catalisadoras na intercalação de cargas, então a quantidade de cargas intercaladas na matriz é a mesma, porém a presença de ouro aprimora a cinética dessa intercalação. É coerente que o valor de Q_{LF} aumente e o valor de n_{LF} diminua, pois como a homogeneidade da intercalação de cargas dentro da matriz polimérica diminui, também é possível que sejam necessárias mais cargas para intercalar, pois há sítios mais favoráveis do que outros.

5.1.5 Caracterizações Eletroquímicas do híbrido de PPI-NTs/AuNPs

Da mesma forma realizou-se a síntese eletroquímica de PPI-NTs seguindo a metodologia já descrita, na qual o AM serve como *template* de polimerização. Após, realizou-se a eletrodeposição de AuNPs. O voltamograma cíclico e o Diagrama de Nyquist caracterizando estas etapas são mostrados na Figura 13:

Figura 13. Voltametria cíclica (A) para os eletrodos modificados com PPI-NTs (em preto) e para PPI-NTs com AuNPs (em vermelho). Na figura (B) o diagrama de Nyquist obtido para a modificação com PPI-NTs e com PPI-NTs/AuNPs. Na imagem (C) é mostrado o circuito equivalente utilizado para modelar os resultados de EIE.



Fonte: O Autor.

Novamente é possível notar um aumento na corrente elétrica após a modificação do eletrodo com AuNPs, que pode estar relacionado às características condutoras de AuNPs. Neste caso os voltamogramas tem uma forma parecida, e o que parece é que a corrente capacitiva teve um grande incremento após a deposição das AuNPs, pois sua grande área superficial pode estar aprimorando a capacitância do material. No entanto, para afirmar com maior certeza que é o que aconteceu, são necessários cálculos mais avançados para verificar as contribuições capacitivas e faradaicas.

A caracterização eletroquímica através da técnica de EIE é mostrada no diagrama de Nyquist da Figura 13, a qual foi modelada com o uso do circuito equivalente já descrito

anteriormente e mostrado na Figura 13 (C). Como discutido anteriormente, a presença de AuNPs indica que a transferência de carga está sendo facilitada na interface polímero/eletrólito, e isto é evidenciado pela diminuição no valor R_{CT} , mostrado na Tabela 2:

Tabela 2. Valores dos parâmetros calculados de EIS para PPI e PPI-AUNPs.

	$R_s/k\Omega$	$Q_{DL}^{-5} F s^{n-1}$	n_{DL}	$R_{CT}/k\Omega$	$Q_{LF}^{-3} F s^{n-1}$	n_{LF}
PPI-NTs	0,04	1,89	0,82	0,25	3,60	0,83
PPI-NTs/AuNPs	0,03	4,27	0,76	0,05	6,70	0,77

Fonte: O Autor.

A Tabela 2 mostra também que a R_s do sistema não sofreu nenhuma alteração considerável, porque a matriz polimérica continua sendo o material predominante no eletrodo e sua resistência não sofre muita alteração. Como discutido anteriormente, o R_s apresenta uma discussão mais complexa, e há uma incerteza nas comparações devido ao fato do eletrodo ser retirado e recolocado na célula eletroquímica.

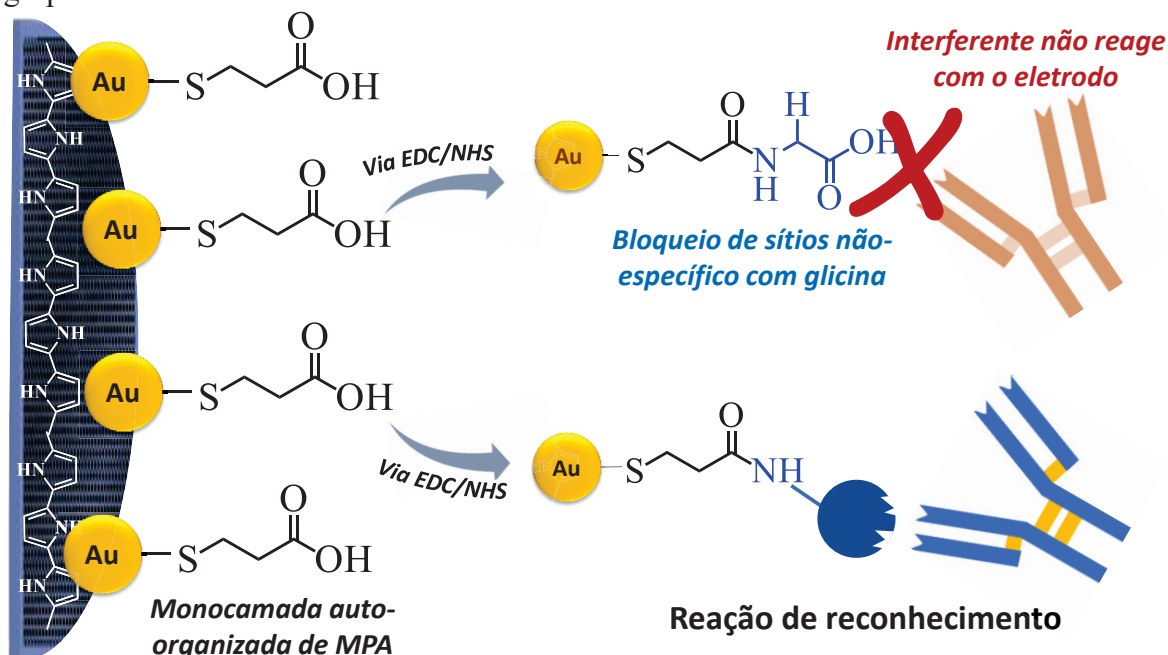
Devido à alta área superficial das AuNPs, novamente é caracterizado um aumento da área superficial do eletrodo, indicado com os valores de Q_{DL} , que aumenta na presença de ouro, significando aumento da capacitância da dupla camada elétrica. Em baixas frequências, a presença de AuNPs impactou no parâmetro Q_{LF} , onde mais íons foram necessários para intercalar na matriz polimérica para promover a neutralidade do polímero. Em relação a morfologia do polímero, o valor de n_{DL} indica que com a deposição de AuNPs, a homogeneidade da morfologia eletrodo diminui, comportamento parecido para o eletrodo modificado com PEDOT, enquanto que a homogeneidade da intercalação de cargas na matriz polimérica, indicada pelo n_{LF} , diminui, efeito causado talvez pelo mesmo motivo já discutido anteriormente também para o eletrodo modificado com PEDOT, onde a presença de ouro causa impactos na cinética de intercalação de cargas no polímero. Da mesma forma, a relação entre $Q_{LF} n_{LF}$ apresenta ser coerente.

5.2 PARTE II – CONSTRUÇÃO DO BIOSSENSOR

5.2.1 Modificação com MPA e ativação com EDC:NHS

Para a construção do biossensor, é necessária a formação de um ambiente favorável para a imobilização das moléculas biológicas. Como discutido no item 2.2, é bem descrito em literatura que a presença de AuNPs facilita o desenvolvimento de biossensores, pois estes possibilitam a formação de SAMs, sendo que neste trabalho foi utilizado o MPA, que possui um grupo tiól que interage muito favoravelmente com as AuNPs, como mostrado na Figura 14:

Figura 14. A formação da SAM é favorável devido à ligação covalente entre o enxofre e o ouro, e possibilita um posterior ancoramento de uma molécula biológica através dos grupamentos carboxílicos.

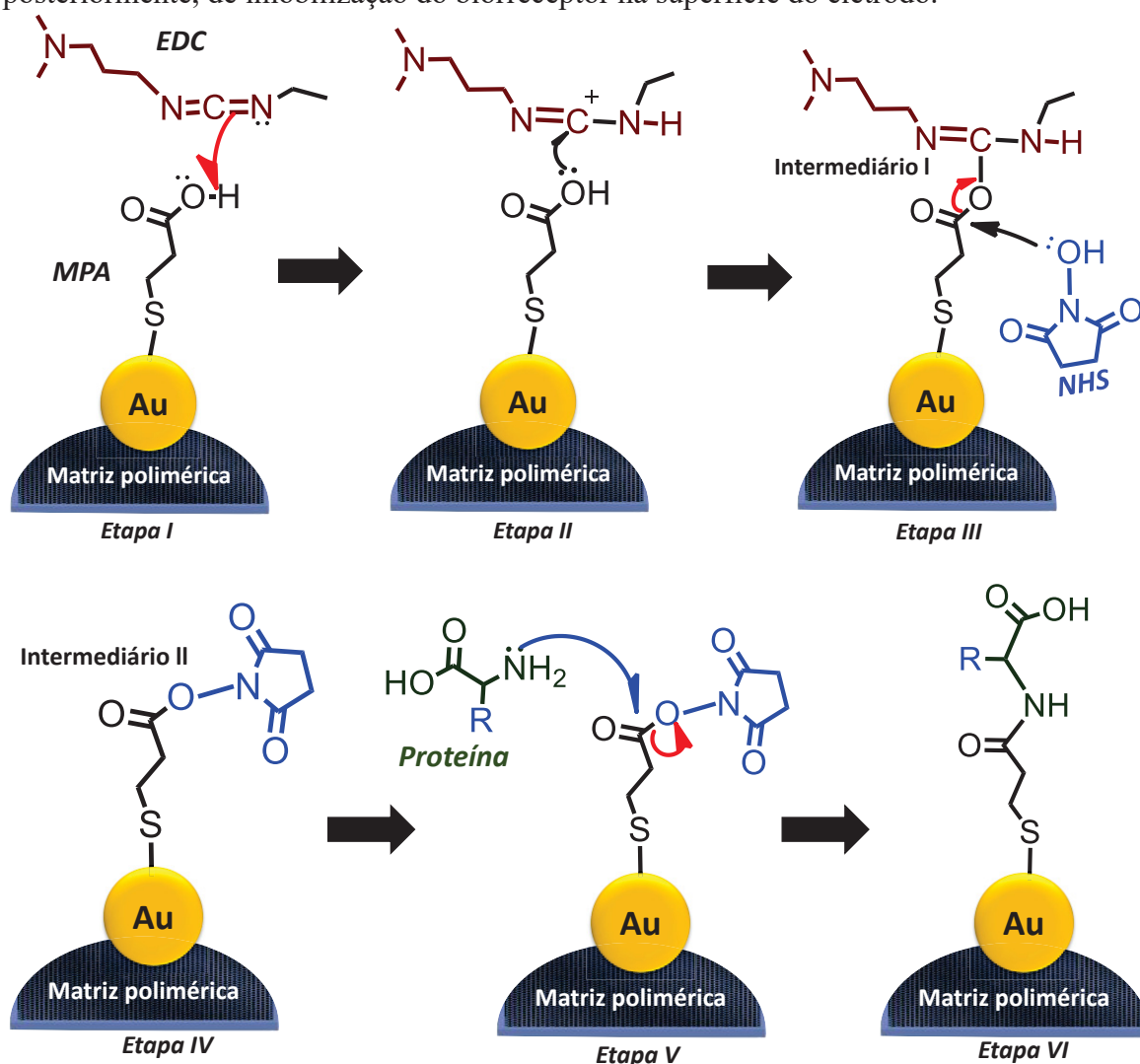


Fonte: O Autor.

A SAM formada necessita de ativação para que possa ocorrer o ancoramento da molécula biológica, a qual foi realizada através da reação dos grupos carboxílicos terminais (-COOH) da SAM formada com solução de EDC:NHS. A ativação do grupo -COOH da SAM está elucidada na Figura 15, onde ocorre em solução de EDC:NHS via mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) (SAM et al., 2010). Na *Etapa I* a molécula de EDC é protonada no nitrogênio, e após isso ocorre o ataque do terminal carboxílico do MPA, como mostrado da reação da *Etapa II*, que atua como nucleófilo, atacando o carbono do EDC. Ocorre a formação do *Intermediário I*, que é instável e pode ser facilmente hidrolisado, o que faria o a reação voltar para a etapa inicial. Esse problema é resolvido com a presença do NHS na reação, onde na *Etapa III* ocorre saída do EDC e o ataque do NHS na carbonila do MPA. O *Intermediário II* é mais estável do que o *Intermediário I*, e na *Etapa*

IV da reação tem-se a imobilização estável do NHS na superfície do eletrodo, que é uma amina secundária. A *etapa V* consiste na substituição do NHS por uma amina primária, que neste caso é uma proteína (*biorreceptor*). A amina da proteína realiza o ataque nucleofílico no carbono da carbonila do MPA, e na *etapa VI* da reação tem-se a completa ligação entre a proteína e o MPA da superfície do eletrodo. Esta reação segue o mesmo mecanismo para todas as biomoléculas imobilizadas na superfície do eletrodo, pois a única coisa que muda é o grupo *R* da proteína (SOUTO et al., 2013).

Figura 15. Reações presentes na etapa de ativação em solução contendo EDC:NHS e, posteriormente, de imobilização do biorreceptor na superfície do eletrodo.



Fonte: O Autor.

O eletrodo está “ativado” na etapa IV, uma vez que a próxima etapa é o ancoramento de uma biomolécula. Assim, para os testes com Avidina/Biotina e moléculas do grupo folato, diversas concentrações foram testadas e monitoradas pelas técnicas de VC

e de EIE que, em especial, é um método eletroquímico muito sensível. A EIE é capaz de fornecer informações detalhadas sobre a R_{CT} , que reflete a cinética de transferência de elétrons na superfície do eletrodo, e pode ser um indicador do bom funcionamento do sistema impedimétrico (GONÇALVES; PEREIRA; MARCHESI, 2017; REZAEI; IRANNEJAD, 2019; SIMÕES; XAVIER, 2017).

5.2.2 Bloqueio com Glicina

Uma das otimizações possíveis na construção de um biossensor é a realização do bloqueio de possíveis locais inespecíficos de ligação do analito (BĂNICĂ, 2012a; LUZ et al., 2015; SAMANTA; SARKAR, 2011; SOUTO et al., 2013). É possível que tenham restados possíveis grupos de éster-NHS não reagidos na etapa de ativação (intermediário IV na reação mostrada na Figura 15), os quais poderiam servir de sítios de ligação para o analito, resultado em uma reação não específica, sendo possível também bloquear a SAM formada (SAMANTA; SARKAR, 2011; SOUTO et al., 2013).

Assim, após a imobilização do receptor biológico (antígeno ou anticorpo) no eletrodo, realiza-se o bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação com o agente bloqueador ácido aminoacético (glicina), o qual tem a capacidade de se ligar em locais de ligação não específicos, sem ocupar o local de receptor do sinal, como mostrado na Figura 14. (BĂNICĂ, 2012a). A etapa de bloqueio foi realizada tanto para os eletrodos modificados com PEDOT-NTs quanto PPI-NTs, e foi caracterizada por técnicas de VC e EIE.

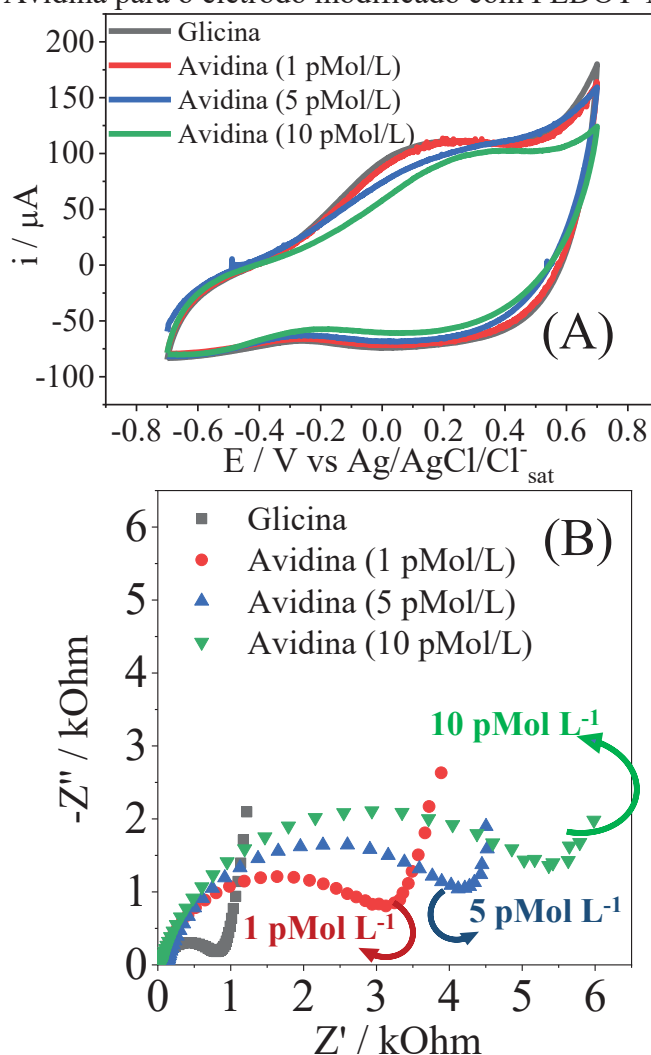
Com o bloqueio de sítios inespecíficos de ligação, espera-se que o analito vá se ligar especificamente à biomolécula receptora. Assim, esta etapa de bloqueio com glicina pode servir como um *branco*, uma vez que, idealmente, toda alteração de sinal detectada a partir desta etapa seja proveniente da interação analito-receptor (reação por afinidade antígeno-anticorpo). Assim, as análises podem ser otimizadas uma vez que as caracterizações eletroquímicas nos próximos itens poderão ser realizadas a partir desta etapa, diminuindo o tempo de construção do biossensor.

5.2.3 Construção do sistema Avidina/Biotina para PEDOT-NTs

Desta maneira, após a ativação com EDC:NHS descrita no item 5.2.1, pode-se efetuar o ancoramento de uma proteína conjugada à Avidina ou de Biotina no eletrodo. Para o eletrodo modificado com PEDOT-NTs, optou-se por fazer o ancoramento da proteína

conjugada com Biotina para posterior detecção de diferentes concentrações de Avidina (1, 5 e 10 pmol L^{-1}). Na Figura 16 é apresentado o voltamograma cíclico realizado para a caracterização das etapas da construção do biossensor a partir da etapa da deposição de AuNPs:

Figura 16. Voltamograma cíclico (A) e Diagrama de Nyquist (B) realizado para a construção do sistema Biotina-Avidina para o eletrodo modificado com PEDOT-NTs.



Fonte: O Autor.

Observa-se uma diminuição na corrente à medida que as moléculas biológicas são ancoradas e também através do aumento da concentração (para o caso do bloqueio). Essa diminuição é devido ao fato de as moléculas biológicas não serem eletroativas, e quando elas são ancoradas no eletrodo acabam bloqueando alguns sítios eletroativos do eletrodo fazendo com que os processos redox do material sejam cada vez mais dificultados, resultando em uma corrente cada vez menor e maiores potenciais redox, o que é observado

na onda voltamétrica de oxidação entre +0,0V e 0,2V, o qual está sendo deslocado para potenciais maiores a medida que a concentração da biomolécula aumenta.

Este resultado está concordante com a EIE apresentada, no qual há um aumento do R_{CT} com o ancoramento de moléculas biológicas e com o aumento da concentração nas detecções de Avidina. O aumento do R_{CT} ocorre pelo mesmo motivo da diminuição da corrente no voltamograma cíclico, pois a transferência de carga na interface eletrodo/eletrólito está sendo cada vez mais dificultada. Os parâmetros para as medidas de EIE estão mostrados na Tabela 3:

Tabela 3. Dados ajustados da análise por EIS das etapas construção e detecção de diferentes concentrações de Avidina. Onde Avidina1, Avidina2 e Avidina3 correspondem à 1, 5 e 10 pmol L⁻¹, respectivamente.

Parâmetro	Etapa de modificação						
	AuNPs	MPA	Biotina	Bloqueio	Avidina1	Avidina2	Avidina3
$R_S / k\Omega$	0,03	0,04	0,07	0,05	0,03	0,11	0,03
$Q_{DL} / 10^{-5} F s^{n-1}$	5,54	4,91	3,35	2,91	5,45	5,14	5,38
n_{DL}	0,82	0,78	0,82	0,85	0,83	0,82	0,82
$R_{CT} / k\Omega$	0,47	0,25	0,55	0,79	3,19	4,39	5,59
$Q_{LF} / 10^{-3} F s^{n-1}$	3,12	3,11	2,83	2,64	2,36	3,01	2,40
n_{LF}	0,83	0,89	0,86	0,83	0,78	0,90	0,75

Fonte: O Autor.

A Tabela 3 indica que o parâmetro R_S é pouco afetado. A capacitância de dupla camada elétrica (Q_{DL}) diminui com a formação da SAM e com a imobilização da Biotina. Este fato relaciona-se com a diminuição da área superficial, uma vez que a formação da SAM é realizada com moléculas que não apresentam uma elevada área superficial, da mesma maneira que o ancoramento da Biotina. Para as etapas seguintes, o Q_{DL} não apresentou variação significativa. Outro valor que pouco variou foi o de n_{DL} . O parâmetro Q_{LF} é pouco alterada com a formação da SAM, mas com o ancoramento da biotina ela sofre uma diminuição, pois a biomolécula está dificultando a difusão de íons para dentro da matriz polimérica. No entanto, os íons que difundem continuam intercalando cargas de uma mesma maneira, e as alterações vistas no parâmetro de n_{LF} não apresentam uma tendência.

O parâmetro de R_{CT} , como descrito anteriormente, talvez seja o que melhor descreva o bom funcionamento do sistema. Visivelmente é possível observar que ele é modificado com o decorrer de cada etapa. É natural que com a imobilização de uma biomolécula que não apresenta comportamento condutor, o R_{CT} aumentará, como demonstrado. Observando o Diagrama de Nyquist, nota-se uma tendência de resposta linear para as diferentes concentrações (1, 5 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de Avidina. Para analisar se há realmente uma resposta linear, fez-se um ajuste utilizando-se como branco o valor de R_{CT} da etapa de bloqueio com Glicina. Assim, os valores mostrados no gráfico obedecem à Equação 1:

$$\Delta R_{ct} = R_{ct_{Avidina}} - R_{ct_{Glicina}}$$

Assim, tendo como base os valores de ΔR_{ct} das diferentes concentrações detectadas de Avidina, realizou-se o ajuste linear para verificar a linearidade de resposta do biossensor. O ajuste linear das detecções de diferentes concentrações Avidina (1, 5 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) resultou em um $R^2 = 0,9959$, indicando boa correlação de resposta quando relaciona-se o ΔR_{ct} com a concentração da biomolécula, indicando assim que o sistema tende a apresentar um bom funcionamento como biossensor.

5.2.4 Construção do sistema Avidina/Biotina para PPI-NTs

A estratégia de construção do biossensor foi a mesma utilizada para PEDOT-NTs, descrita no item 5.2.3. Realizou-se a caracterização das etapas de formação da SAM com MPA conforme descrita no item 5.2.1 e posterior imobilização da biomolécula. Neste processo optou-se por utilizar a Biotina como receptor. Após imobilização da mesma no eletrodo, efetuou-se o bloqueio de sítios ativos não-específicos com Glicina, conforme descrito no item 5.2.2. Realizou-se, então, a caracterização das etapas da construção do biossensor por feitas por VC e EIE, os quais são mostrados no Anexo III, na Figura 27.

Nota-se que há uma diminuição na corrente à medida que camadas adicionais que não possuem eletroatividade são adicionadas na superfície do eletrodo e afetam os processos de oxidação e redução do material. Este comportamento está condizente com os resultados apresentados anteriormente, comprovando que a caracterização eletroquímica das etapas da construção do biossensor está sendo efetiva e seguindo uma tendência de diminuição da

corrente elétrica total por VC, indicativo de que o material fica mais resistivo a medida que biomoléculas estão atrapalhando a eletroatividade do mesmo, como mostrado na Figura 27.

Como a discussão sobre os parâmetros de PPI/AuNPs já foram abordados no item 5.1.5, aqui serão abordados apenas os dados a partir da formação da SAM com MPA, descritos na Tabela 4:

Tabela 4. Parâmetros ajustados dos dados de EIE obtidos para a construção do biossensor baseado em PPI-NTs/AuNPs.

Parâmetro	MPA	Biotina	Glicina	Avidina
$R_s / k\Omega$	0,05	0,07	0,05	0,14
$Q_{DL} / 10^{-5} F s^{-1}$	1,87	1,88	1,61	2,43
n_{DL}	0,90	0,90	0,91	0,85
$R_{CT} / k\Omega$	0,56	1,62	3,95	4,67
$Q_{LF} / 10^{-3} F s^{-1}$	5,80	6,70	8,06	8,99
n_{LF}	0,81	0,87	0,96	0,97

Fonte: O Autor.

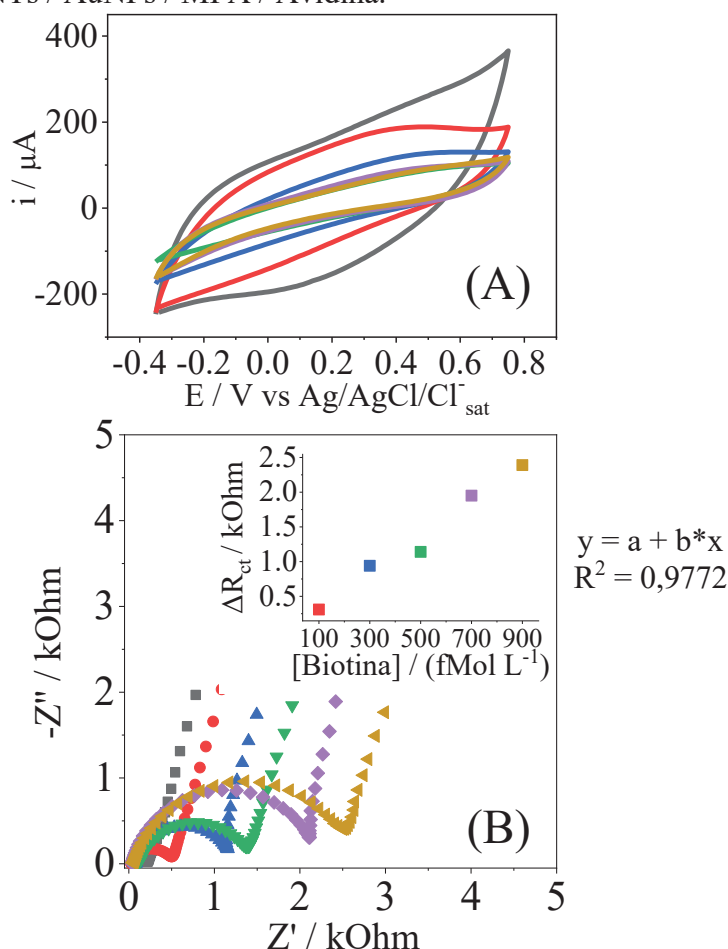
O parâmetro de R_s não apresenta uma tendência de aumento ou diminuição, sendo que a variação mais considerável acontece apenas na etapa de imobilização de Avidina. Para o valor de Q_{DL} , é possível que com o bloqueio de sítios inespecíficos com Glicina, menos íons sejam necessários para carregamento da dupla camada elétrica. No entanto, com a detecção de Avidina, vemos um aumento no valor de Q_{DL} e uma diminuição no valor de n_{DL} , causado provavelmente pela presença da biomolécula, que alteram a morfologia da superfície do eletrodo.

Novamente o parâmetro de R_{CT} é o mais alterado, pelos mesmos motivos já discutidos anteriormente, demonstrando o bom funcionamento impedimétrico do sistema. É curioso notar que os parâmetros Q_{LF} e n_{LF} aumentam com o aumento de biomoléculas no eletrodo. De alguma maneira as biomoléculas estão facilitando a migração de íons para a matriz polimérica, fazendo que a intercalação de cargas seja maior e mais homogênea. Novamente, não há uma tendência que indique o real impacto das biomoléculas nos parâmetros n_{DL} e n_{LF} .

Com o bom funcionamento do biossensor comprovado, realizou-se a detecção de diferentes concentrações de Biotina, agora invertendo as biomoléculas (Avidina como receptor). Testes utilizando desta metodologia foram realizados e são mostrados na Figura 28 do Anexo III. Após a ativação com EDC:NHS descrita no item 5.2.1, efetuou-se desta vez o ancoramento de Avidina, ao contrário do que foi feito no item 5.2.3 (ancoramento de

Biotina), realizando a posterior detecção de Biotina. A detecção destas diferentes concentrações (100, 300, 500, 700 e 900 fMol L⁻¹) foi caracterizada EIE e por VC, como descrito na Figura 17.

Figura 17. Voltamograma cíclico realizado para a detecção de diferentes concentrações de Biotina (100, 300, 500, 700 e 900 fMol L⁻¹), utilizando-se o eletrodo previamente modificado com PPI-NTs / AuNPs / MPA / Avidina.



Fonte: O Autor.

Observa-se uma diminuição na corrente à medida que a concentração de Biotina é aumentada. Essa diminuição é devido ao mesmo fator já discutido, no qual as moléculas biológicas não apresentam eletroatividade, e quando elas são ancoradas no eletrodo acabam bloqueando alguns sítios eletroativos do eletrodo e atrapalham os processos oxidativos e redutivos do material. Isso resulta em uma corrente cada vez menor com o aumento da concentração de moléculas biológicas (BĂNICĂ, 2012e; REZAEI; IRANNEJAD, 2019).

Este resultado está concordante com a EIE apresentada na Figura 17, no qual há um aumento do R_{CT} em relação ao aumento da concentração de Biotina. É possível notar

que o aumento da R_{CT} ocorre pelo fato de as biomoléculas estarem interferindo nos sítios eletroativos do material. Assim, a transferência de carga na interface eletrodo/eletrólito está sendo cada vez mais dificultada. Os parâmetros da EIE foram modelados segundo o circuito equivalente descrito anteriormente e são descritos na Tabela 5:

Tabela 5. Dados ajustados da análise por EIS das etapas de bloqueio com Glicina (branco) e das detecções de diferentes quantidades de Biotina(n).

Parâmetro	Glicina	Concentração de Biotina (fMol L ⁻¹)				
		100	300	500	700	900
$R_S / k\Omega$	0,05	0,03	0,06	0,12	0,04	0,06
$Q_{DL} / 10^{-5} F s^{n-1}$	2,36	2,96	2,63	3,06	2,37	3,38
n_{DL}	0,87	0,84	0,85	0,80	0,86	0,81
$R_{CT} / k\Omega$	0,16	0,48	1,11	1,31	2,11	2,56
$Q_{LF} / 10^{-3} F s^{n-1}$	4,60	4,60	5,35	4,37	5,17	4,83
n_{LF}	0,80	0,81	0,90	0,84	0,91	0,86

Fonte: O Autor.

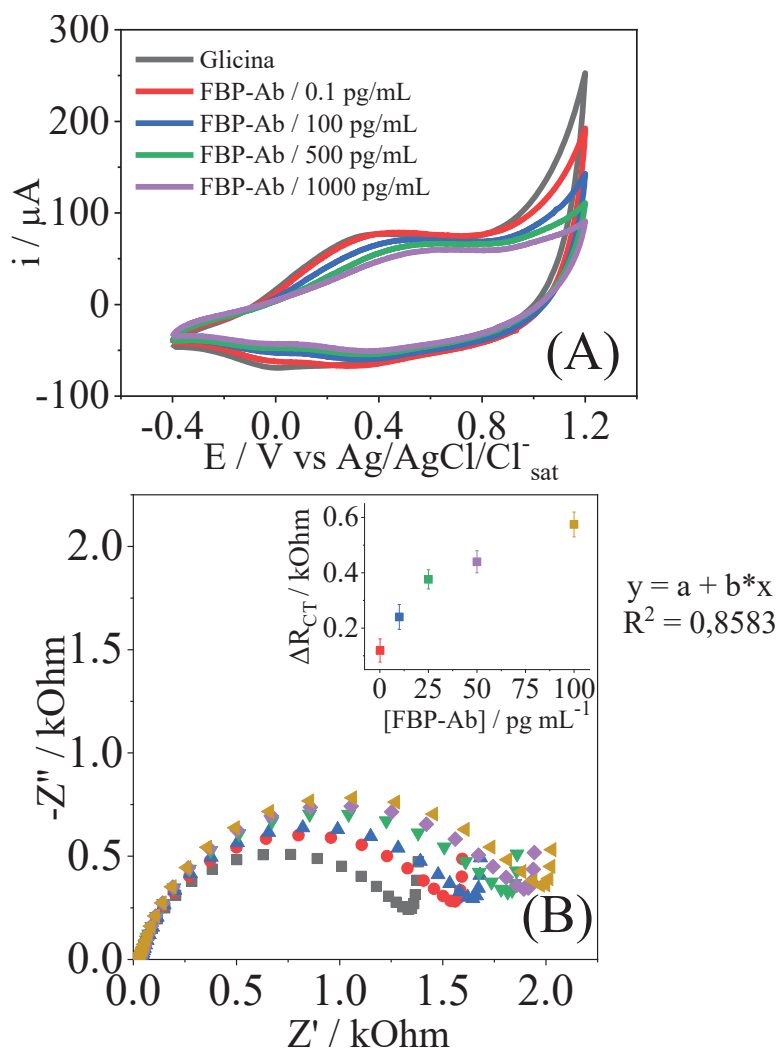
A Tabela 5 indica que a resistência em série (R_S) do sistema não é muito afetada, sendo sua maior alteração para a concentração 3 de Biotina, mas que mesmo assim não é tão relevante, ainda mais levando em conta a complexidade da análise do R_S . Da mesma forma os parâmetros de Q_{DL} , n_{DL} , Q_{LF} e n_{LF} não apresentam uma tendência de crescimento ou decréscimo, permanecendo sem grandes alterações, talvez causado pelo fato de as biomoléculas não estarem em concentração suficiente para alterar a morfologia e armazenamento de carga no material.

Por outro lado, parâmetro de R_{CT} indica o bom funcionamento do sistema, uma vez que a cada concentração há uma alteração que é tanto visível no diagrama de Nyquist quanto nos parâmetros da Tabela 5. Tendo como base a Equação 1 é possível estabelecer o parâmetro de ΔR_{CT} , o qual foi linearizado em função da concentração de Biotina detectada, como mostrado na Figura 17. É possível observar uma boa correlação do valor do R_{CT} em relação ao aumento da concentração, com $R^2=0,9772$, como mostrado na Figura 17. A curva foi construída com base no R_{CT} de cada concentração. O terceiro ponto foi o que mais ficou fora da curva, o que talvez possa ter sido causado por algum erro experimental.

5.2.5 Uso da plataforma PEDOT-NTs para detecção de proteínas folato

O biossensor construído foi testado para a detecção de Anticorpo de ligação a proteína Folato (FBP-Ab) através de sua interação com o receptor recombinante de Folato humana (FBP) como descrito no item 4.9. A estratégia de construção do biossensor foi a mesma da usada para Avidina-Biotina: eletrodeposição de PEDOT-NTs, AuNPs, formação da SAM, ativação com EDC:NHS e ancoramento da biomolécula. Optou-se por fazer o ancoramento de FBP, com posterior bloqueio com Glicina, que novamente foi utilizada como etapa de branco, e então detecção de FBP-Ab. A Figura 18 mostra a caracterização para a detecção de diferentes concentrações do anticorpo:

Figura 18. Voltamograma Cíclico (A) para a detecção de diferentes concentrações do FBP-Ab, no qual correspondem à 0,1, 100, 500 e 1000 pg mL^{-1} . A Figura (B) mostra o Diagrama de Nyquist e a curva analítica de ΔR_{CT} versus a concentração de FBP-Ab ($n=3$), na parte superior direita, correspondente às concentrações de 0,1, 10, 25, 50 e 100 pg mL^{-1} do anticorpo.



Fonte: O Autor.

É possível observar na Figura 18 que a corrente está diminuindo à medida que a concentração do anticorpo aumenta. Isso se deve ao fato de o anticorpo estar bloqueando alguns sítios eletroativos do eletrodo, assim quanto maior a concentração do anticorpo, mais sítios eletroativos serão bloqueados, resultando em uma corrente cada vez menor. Além disso, parece que os processos de oxidação e redução estão sendo dificultados pois há uma tendência de que a oxidação acontecendo inicialmente entre +0,3 e +0,4V esteja sendo deslocada para potenciais maiores a medida que a concentração de FBP-Ab aumenta. Além disso, nota-se que a oxidação presente entre +0,3V e 0,4V e a redução próxima a 0,0V estão menos intensas, o que é concordante com a possibilidade do anticorpo estar atrapalhando o comportamento eletroativo do material.

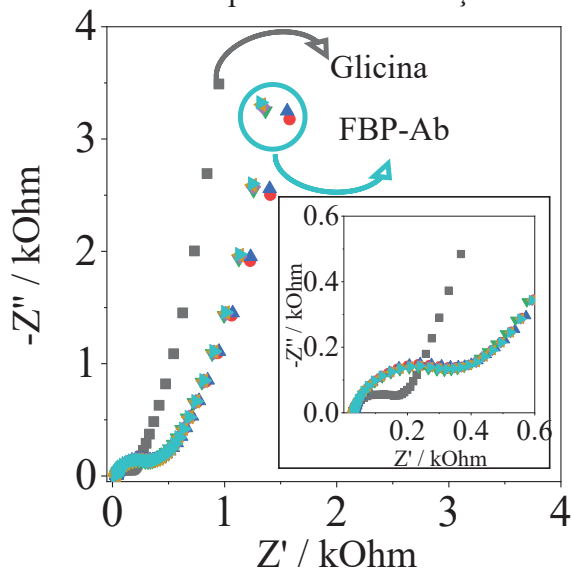
Este resultado está concordante com a EIE apresentada na Figura 18, no qual nota-se que com o aumento da concentração de anticorpo, há um aumento na R_{CT} do sistema, pois como os sítios eletroativos do eletrodo estão sendo bloqueados, há uma maior dificuldade na transferência de elétrons do eletrodo para a solução. Para o experimento de EIE, foram detectadas as concentrações de 0,1, 10, 25, 50 e 100 pg mL^{-1} do anticorpo.

É possível notar através do diagrama de Nyquist da Figura 18 que a imobilização do anticorpo apresenta novamente que o R_{CT} é o melhor indicativo do funcionamento do biossensor, sendo concordante com o voltamograma da Figura 18, uma vez que o aumento da quantidade de biomoléculas na interface eletrodo/solução tende a atrapalhar as trocas de cargas. Outros parâmetros não apresentaram uma relação tão evidente e reproduzível com a variação de concentração.

Para verificar a tendência de aumento do ΔR_{CT} em relação à concentração, fez-se um ajuste linear tendo como base a variação de ΔR_{CT} em relação à glicina (branco). O ajuste linear da ΔR_{CT} em relação à concentração é mostrado na parte superior da curva de ajuste linear mostrada na parte superior direita da Figura 18. Nota-se um valor de $R^2 = 0,8583$, enquanto o valor do limite de detecção (LOD) foi de 0,675 pg mL^{-1} e o limite de quantificação (LOQ) foi de 2,25 pg mL^{-1} .

Para verificar a estabilidade da interação entre o receptor e o analito, efetuou-se a detecção de 0,1 pg mL^{-1} de FBP-Ab e após realizou-se um teste de estabilidade na resposta por EIE, como descrito no item 4.9.1. O diagrama de Nyquist para o experimento é mostrado na Figura 19 e os parâmetros na Tabela 6:

Figura 19. Teste de estabilidade de resposta da EIE frente à uma mesma concentração de FBP-Ab (0.1 pg mL^{-1}). A medida em preto corresponde à etapa do bloqueio com glicina (branco), enquanto as demais são correspondentes à detecção do anticorpo.



Fonte: O Autor.

Tabela 6. Parâmetros tratados da EIE referente à Figura 19.

Medidas de EIE para $0,1 \text{ pg mL}^{-1}$ de FBP-Ab							
Parâmetro	Glicina	1	2	3	4	5	6
$R_s / \text{k}\Omega$	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
$Q_{DL} / 10^{-5} \text{ F s}^{n-1}$	9,91	7,17	6,96	7,30	6,88	7,00	6,84
n_{DL}	0,74	0,75	0,78	0,77	0,77	0,77	0,77
$R_{CT} / \text{k}\Omega$	0,18	0,41	0,42	0,40	0,42	0,42	0,42
$Q_{LF} / 10^{-3} \text{ F s}^{n-1}$	2,63	2,22	2,20	2,30	2,28	2,28	2,28
n_{LF}	0,81	0,72	0,72	0,74	0,74	0,74	0,74

Fonte: O Autor.

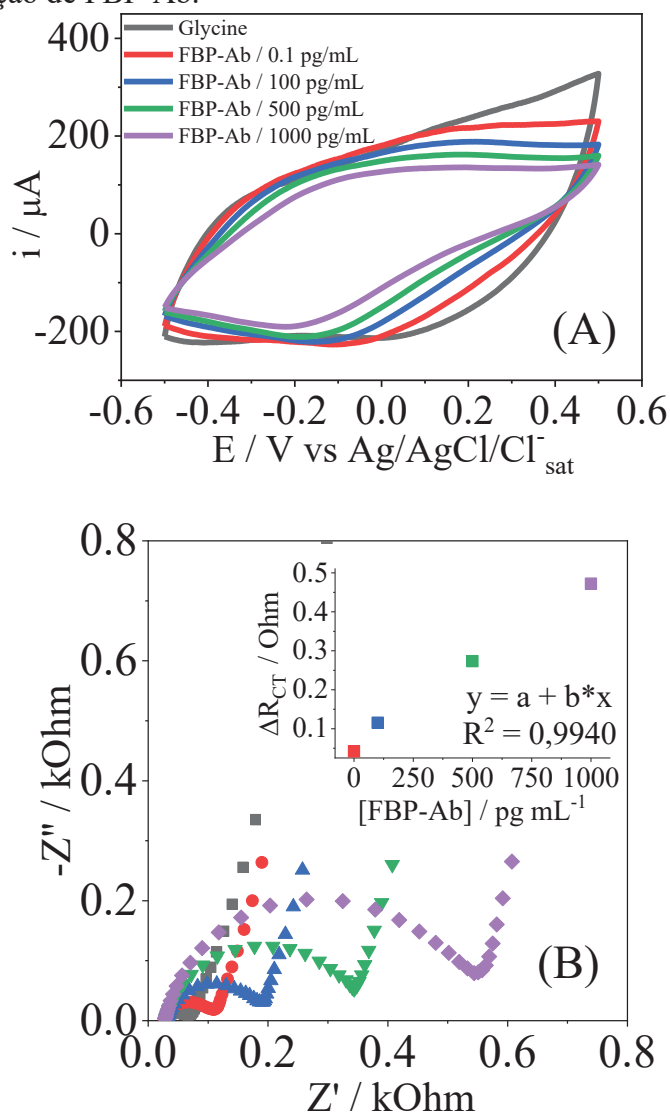
Utilizando-se o a ANOVA com 95% de confiança, com exceção de R_s e n_{DL} , todos os parâmetros apresentaram um valor significativamente diferente do valor do branco (etapa glicina). Ou seja, de fato a medida de EIE da glicina difere significativamente das demais. Os parâmetros Q_{DL} e R_{CT} são particularmente importantes para a construção do biossensor. Como eles não diferiram para uma mesma concentração, isso comprova que mesmo fazendo medidas seguidas, tirando o eletrodo da célula e aguardando um tempo com o mesmo imerso em PBS, a resposta permaneceu estável e não apresentou um crescimento tendencioso. Esse resultado comprova que o biossensor proposto não tende a dar falsos positivos, mostrando que variações significativas nos valores estão de fato relacionadas à interação antígeno-anticorpo (mesmo em baixas concentrações) na superfície do eletrodo. Além disso, a estabilidade na resposta mostra também que a interação entre as biomoléculas é muito

estável e não ocorre nenhum tipo de dessorção, pois interações antígeno-anticorpo além de serem específicas são também estáveis (BĂNICĂ, 2012d; PATIL et al., 2019).

5.2.6 Uso da plataforma PPI-NTs/AuNPs para detecção de proteínas folato

Assim como para PEDOT-NTs, testou-se o funcionamento da plataforma de PPI-NTs para detecção de FBP-Ab utilizado como biorreceptor o FBP. A Figura 20 mostra o voltamograma cíclico referente ao experimento:

Figura 20. Voltamograma Cíclico (A) e diagrama de Nyquist (B) para a detecção de diferentes concentrações do FBP-Ab (0,1, 100, 500 e 1000 pg mL^{-1}) utilizando a plataforma de PPI-NTs. Na parte superior direita do Diagrama de Nyquist é mostrada o ajuste de ΔR_{CT} versus a concentração de FBP-Ab.



Fonte: O autor.

Na Figura 20 uma diminuição da corrente elétrica total uma vez que os voltamogramas estão ficando menores. Isso se deve ao efeito bloqueador de sítios eletroativos das biomoléculas, já discutido no item anterior. Novamente nota-se que a contribuição capacitiva da voltametria está sendo mais afetada, uma vez que o carregamento da dupla camada elétrica está sendo mais dificultado devido à presença de biomoléculas na superfície do eletrodo, o que é notado pela diminuição dos voltamogramas. Além disso, nota-se que o anticorpo está afetando processos eletroativos no eletrodo uma vez que há uma tendência de diminuição da contribuição faradaica na VC.

Esse comportamento é notado também no diagrama de Nyquist da Figura 20, que segue de acordo com todos os resultados obtidos anteriormente, uma vez que a presença de biomoléculas é evidenciada, principalmente, pelo parâmetro R_{CT} . A Tabela 7 mostra que a medida que a concentração de FBP-Ab aumenta, o R_{CT} aumenta de maneira linear, como mostrado na parte superior da Figura 20a, onde a relação entre ΔR_{CT} versus a concentração de FBP-AB apresentou $R^2 = 0,9940$, indicando uma boa correlação entre o sinal e a concentração do anticorpo.

Tabela 7. Ajuste dos parâmetros obtidos com a EIE da Figura 20a.

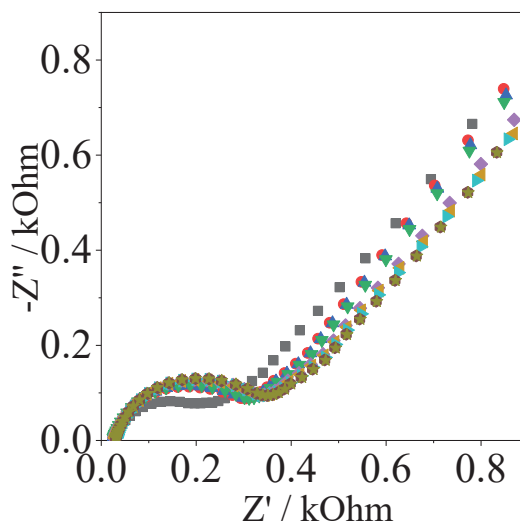
Parâmetro	Glicina	FBP-Ab1	FBP-Ab2	FBP-Ab3	FBP-Ab4
$R_s / k\Omega$	0,027	0,026	0,030	0,029	0,028
$Q_{DL} / 10^{-5} F s^{n-1}$	16,38	6,19	4,06	3,59	2,65
n_{DL}	0,66	0,77	0,82	0,84	0,86
$R_{CT} / k\Omega$	0,048	0,090	0,164	0,322	0,520
$Q_{LF} / 10^{-3} F s^{n-1}$	5,03	5,10	5,48	5,28	5,05
n_{LF}	0,82	0,84	0,85	0,86	0,84

Fonte: O autor.

Além do R_{CT} , outro parâmetro que têm mostrado uma boa tendência de comportamento é o do Q_{DL} , uma vez que é coerente relacionar os dados obtidos na Tabela 7 com os da Figura 20a, uma vez que há uma tendência de diminuição da corrente capacitiva do sistema, o que ocasiona em uma diminuição na voltametria e no valor do Q_{DL} .

Para verificar a estabilidade da resposta, efetuou-se um teste de estabilidade da resposta da EIE para uma mesma concentração de FBP-Ab ($0,1 \text{ pg mL}^{-1}$) conforme descrito no item 4.9, da mesma forma que realizado para o eletrodo com PEDOT-NTs. O diagrama de Nyquist da Figura 21 mostra as medidas realizadas:

Figura 21. Teste de estabilidade de resposta de EIE para 0.1 pg mL^{-1} de FBP-Ab. A medida em cinza foi realizada na etapa de branco, enquanto as demais correspondem à uma mesma concentração do anticorpo.



Fonte: O Autor.

É possível notar através da Figura 21 que há uma pequena variação das três primeiras para as cinco últimas medidas de EIE, mas que não apresentou ser uma variação significativa, como será discutido a seguir. Os valores para os parâmetros estão mostrados na Tabela 8:

Tabela 8. Parâmetros tratados referente a EIE da Figura 21.

Parâmetro	Glicina	Medidas de EIE para $0,1 \text{ pg mL}^{-1}$ de FBP-Ab							
		1	2	3	4	5	6	7	8
$R_s / \text{k}\Omega$	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
$Q_{DL} / 10^{-5} \text{ F s}^{n-1}$	2,79	2,15	2,11	2,09	1,98	1,94	1,96	1,95	1,96
n _{DL}	0,80	0,83	0,84	0,84	0,84	0,85	0,85	0,85	0,85
$R_{CT} / \text{k}\Omega$	0,21	0,28	0,29	0,29	0,31	0,31	0,31	0,32	0,32
$Q_{LF} / 10^{-3} \text{ F s}^{n-1}$	1,74	1,41	1,43	1,45	1,49	1,52	1,56	1,63	1,63
n _{LF}	0,56	0,58	0,58	0,58	0,56	0,55	0,55	0,55	0,55

Fonte: O Autor.

Aplicando a análise de variância (ANOVA) com 95% de confiança, com exceção de Q_{LF} , n_{LF} e R_s , todos os parâmetros apresentaram diferença significativa ao valor da etapa do branco, ou seja, de fato a medida de EIE da glicina difere significativamente das demais. Como já discutido para o mesmo experimento com o eletrodo modificado com PEDOT-NTs, a resposta permaneceu estável e comprova que o biossensor proposto não tende a dar

respostas tendenciosas, mostrando que variações significativas nos valores estão de fato relacionadas à interação antígeno-anticorpo na superfície do eletrodo. Por mais que a EIE seja uma técnica muito sensível, para as duas plataformas testadas possíveis interferências como tempo decorrido e o fato de retirar e recolocar o eletrodo de trabalho (BATTISTEL et al., 2014) não apresentaram impacto significativo nos valores e nem ocasionaram uma dessorção de algum a biomolécula da superfície do eletrodo.

Além disso, também foi estudado o impacto da morfologia do polímero. A morfologia de nanotubos oferece algumas vantagens significativas em relação à trabalhar com filmes de polímeros condutores, principalmente por apresentar uma área superficial maior em comparação a filmes, o que resulta em um aprimoramento nas propriedades capacitivas do polímero (LIU; CHO; LEE, 2008). Para estudar se essa diferença de fato impacta na elaboração do biossensor, testes com PPI na morfologia filme (PPI-filme) foram realizados, onde a metodologia de construção do biossensor permaneceu a mesma, mas agora com a diferença na morfologia do polímero. As caracterizações, bem como os parâmetros por EIE e VC das etapas a partir do bloqueio com glicina são mostradas na Figura 29 e EIE na Tabela 13 do Anexo III. Os comportamentos estão de acordo com resultados já obtidos anteriormente, uma vez que há claramente o impacto das biomoléculas sobre a eletroatividade do material, mostrada por uma diminuição nos voltamogramas e por um aumento do semicírculo no diagrama de Nyquist.

O desempenho da morfologia de nanotubo pode ser comparado com o da morfologia de filme, comparando-se os parâmetros de EIE da Tabela 7 e Tabela 13. Nota-se que o a capacitância (tanto Q_{DL} quanto Q_{LF}) é maior quando a morfologia de nanotubos, efeito causado pela maior área superficial do material que possibilita uma maior intercalação de cargas. O parâmetro de R_{CT} , muito importante para biossensores impedimétricos, apresentou-se menor para a morfologia de nanotubos, indicando que a transferência de carga é mais facilitada para nanotubos do que em filmes, o que pode aprimorar a resposta do material frente à pequenas concentrações do analito. Estas características podem indicar uma vantagem em se utilizar nanotubos em relação a filmes (HU et al., 2019).

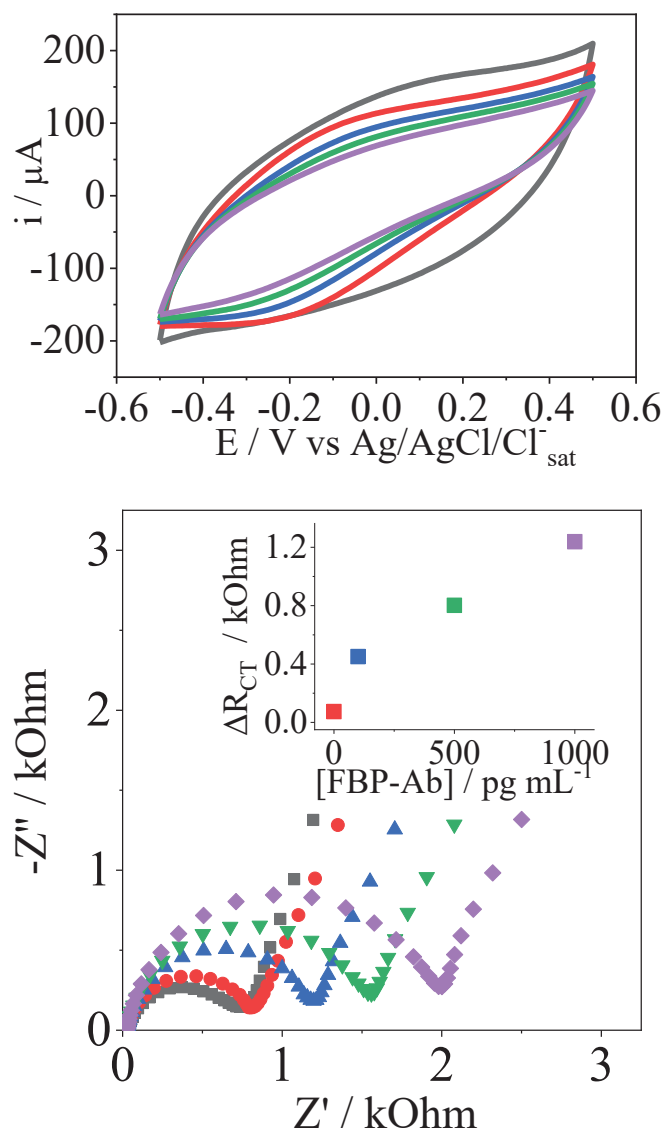
Além de avaliar o impacto da morfologia do polímero, também é muito importante avaliar a interação entre o próprio polímero, PPI-NTs e as biomoléculas, principalmente o FBP-Ab, e alguns testes foram realizados conforme descrito no 4.9.3. A adsorção de biomoléculas em polímeros condutores já é conhecida, e há trabalhos de biossensores baseados apenas nessa propriedade adsorptiva. Porém também é sabido que a estratégia de imobilização por adsorção tem desvantagens em relação a imobilização por ligação

covalente, principalmente em relação à estabilidade e orientação da biomolécula imobilizada, o que compromete o desempenho do biossensor (BĂNICĂ, 2012f; OLIVEIRA et al., 2013; TELES; FONSECA, 2008).

É importante avaliar qual pode ser o impacto do polímero condutor e como podemos minimizá-lo para que adsorção seja a mais específica possível. Biomoléculas apresentam a propriedade de se adsorverem em polímeros condutores como PPI. Assim, em uma amostra complexa, com a presença de possíveis interferentes, é possível que estas outras interajam com o polímero condutor e interfiram no sinal analítico. Para contornar isso utilizam-se algumas estratégias de modo que a interação entre biorreceptor e analito seja seletiva e não haja outras interações na superfície do eletrodo, estratégias como a formação de SAMs e o bloqueio de sítios não específicos com Glicina, como já discutido anteriormente. A Figura 22 mostra o diagrama de Nyquist e o voltamograma cíclico do experimento que buscou estudar se ocorre adsorção do analito, FBP-Ab, na superfície do biossensor e se essa adsorção interfere no sinal.

Como forma de verificar adsorção do anticorpo no polímero, foram efetuados testes como descrito no 4.9.3, cuja caracterizações por EIE e VC são mostradas na Figura 22:

Figura 22. Teste de adsorção de diferentes concentrações do anticorpo (0.1, 100, 500 e 1000 pg mL^{-1}) no PPI-NTs.



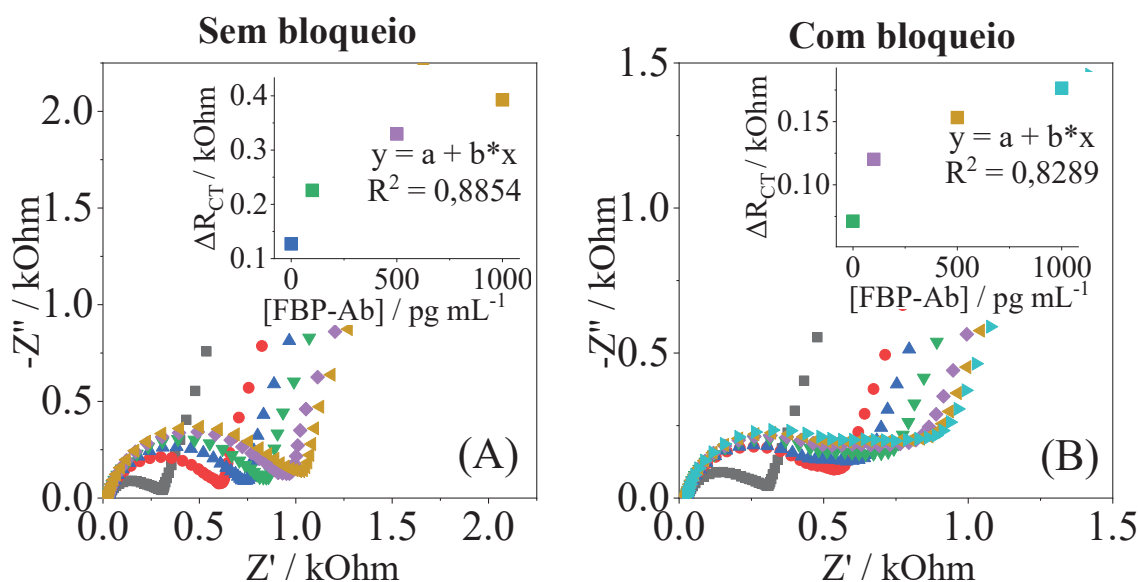
Fonte: O Autor.

Nota-se que há uma diminuição na corrente elétrica representada pela CV e um aumento do semicírculo no diagrama de Nyquist, comportamento que já foi encontrado em experimentos anteriores neste trabalho. Isso comprova que está ocorrendo adsorção do anticorpo na superfície do polímero, como esperado, e que essa interação afeta a eletroatividade do material. Neste caso, os sítios eletroativos do polímero estão sendo diretamente afetados pois o anticorpo pode estar se adsorvendo diretamente nele sem maiores dificuldades, como seria o caso do material com todas as modificações. Em uma matriz mais complexa, com mais biomoléculas e interferentes, é provável que a quantidade de moléculas adsorvidas seria maior e que o impacto no sinal também (PATIL et al., 2019).

Assim, justifica-se a utilização de todas as estratégias descritas para garantir uma melhor interação entre o biorreceptor e o analito.

Continuando os testes de adsorção no PPI e como forma de analisar o efeito da construção da interação receptor analito e do efeito de bloqueio de sítios não específicos com Glicina, estudou-se a construção do biossensor apenas por adsorção no polímero. Assim, dois eletrodos foram imersos, cada um, em uma solução contendo o biorreceptor FBP na concentração de 200 ng mL^{-1} , sem prévia ativação com EDC:NHS. Para um dos eletrodos fez-se bloqueio com Glicina e para o outro seguiu-se para a detecção do anticorpo. As caracterizações por EIE são mostradas na Figura 23:

Figura 23. Construção do biossensor utilizando apenas PPI-NTs como suporte. Na figura (a) é mostrada o experimento sem o bloqueio com Glicina, enquanto na figura (b) com a etapa de bloqueio com Glicina.



Fonte: O Autor.

Mesmo sem a elaboração de etapas importantes como deposição de AuNPs e formação da SAM, nota-se que para ambos os eletrodos há uma tendência de aumento no semicírculo, causada pela adsorção das biomoléculas na superfície do eletrodo. Entretanto, é possível notar que as variações causadas no eletrodo sem bloqueio com glicina são maiores do que aquele em que se efetuou o bloqueio, indicada pelo maior valor de inclinação do eletrodo sem bloqueio (inclinação = 0,242) em comparação ao valor do eletrodo com bloqueio (inclinação = 0,091). Quando ocorre a adsorção do biorreceptor FBP no polímero, pode ser que a proteína não fique na posição mais favorável para uma interação com o analito, neste caso o anticorpo. Assim, essa variação significava na impedância na Figura

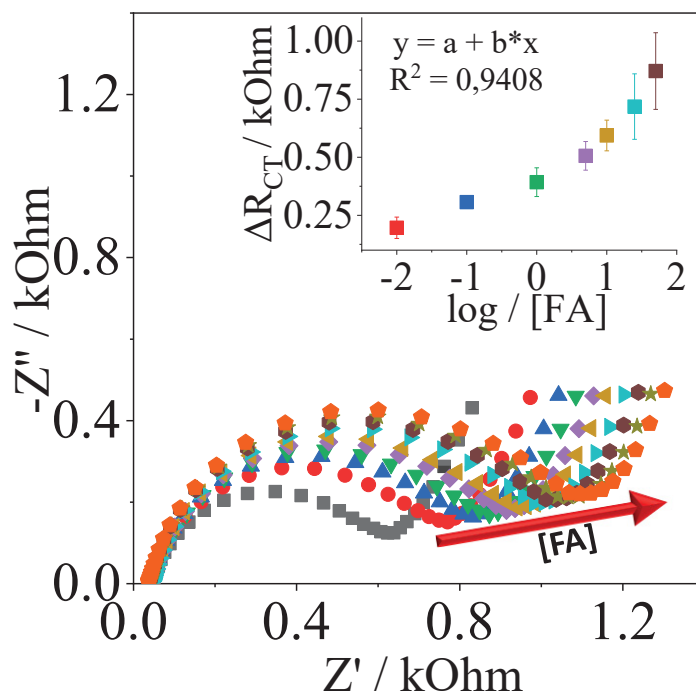
23 (a) pode estar sendo causada não apenas pela interação antígeno-anticorpo, mas também pela interação do anticorpo com o próprio polímero. Outro possível indicativo é de que a relação entre o valor ΔR_{CT} seguiu uma tendência mais linear para o eletrodo sem bloqueio com glicina ($R^2 = 0,8854$), quando em comparação ao eletrodo com bloqueio (cujo $R^2 = 0,8289$), indicando que a presença de glicina faz com que menos moléculas do anticorpo se adsorvam no eletrodo. Quando se efetua o bloqueio com Glicina, o objetivo é bloquear os possíveis sítios de adsorção do anticorpo ao polímero (BĂNICĂ, 2012f; OLIVEIRA et al., 2013; TELES; FONSECA, 2008).

Assim, a tendência é que restem apenas os sítios do biorreceptor FBP, como aconteceu na construção do biossensor em etapas anteriores. Só que neste caso, como o FBP não está na posição mais favorável, é possível que nem todo o anticorpo em solução consiga achar um sítio do biorreceptor para interagir. Assim, não haverá tantas interações antígeno-anticorpo, e como os possíveis sítios do polímero foram bloqueados com Glicina, também não haverá interações anticorpo-polímero, o que resultará em uma variação de sinal menos significativa na impedância, indicada pelos valores da inclinação discutidos anteriormente, e como demonstrado na Figura 23b e na Tabela 11 e Tabela 12, disponíveis no Anexo III.

5.2.7 Testes para detecção de Ácido Fólico utilizando PPI-NTs/AuNPs

A detecção de Ácido Fólico (FA) foi realizada utilizando a mesma metodologia descrita para a detecção de FBP-Ab, por se tratar do mesmo bioreceptor e de uma metodologia que foi otimizada ao longo deste trabalho. As concentrações testadas e detectadas por EIE foram 0,01, 0,1, 1, 5, 10, 25 e 50 ng mL⁻¹, em um experimento realizado em triplicata mostrado na Figura 24. Os parâmetros analíticos foram obtidos pela relação entre ΔR_{CT} *versus* a concentração do FA em notação logarítmica, para melhor linearização do resultado (descrita no gráfico com $\log / [FA]$):

Figura 24. Diagrama de Nyquist e curva analítica correspondente à detecção de 0,01, 0,1, 1, 5, 10, 25 e 50 ng mL⁻¹ de FA.



Fonte: O Autor.

O diagrama de Nyquist e a curva analítica mostrados na Figura 24 indicam que Os parâmetros analíticos obtidos foram de R^2 de 0,9408, inclinação de 138,11, enquanto que o LOD foi de 0,015 ng mL⁻¹ e o LOQ de 0,047 ng mL⁻¹, sendo estes bons indicativos de que nossa plataforma é capaz de detectar concentrações de FA que estão dentro de um interesse clínico (5-15 ng mL⁻¹). A comparação dos resultados obtidos neste trabalho com outros dispositivos já publicados na literatura é mostrada na TABELA X:

Tabela 9. Comparação entre condições experimentais e valores de LOD entre diversos biossensores para detecção de FA

Material	Método de detecção	Faixa de concentração (ng mL ⁻¹)	LOD (ng mL ⁻¹)	Referência
Malha de aço recoberta por PPI/AuNPs	EIE	0,01 - 50	0,015	Este trabalho.
Ouro/PPI/POM	Voltametria cíclica	0,04 – 0,44	0,0075	
Ouro modificado com SAM	Voltametria de onda quadrada	0,0035 – 0,44	0,004	
Hidroxiapatita/GCE	Voltametria de pulso diferencial	0,044 – 154,50	0,075	
Platina/Nanotubos de carbono/GCE	Voltametria linear	0,088 – 44,14	0,05	Batra et al, 2021.
MoS ₂ /rGO/GCE	Voltametria de pulso diferencial	0,044 – 44,14	0,01	
Diamante dopado com boro	<i>Stripping</i> voltamétrico	0,10 – 20	0,08	
Carbono cerâmico modificado com PPI	Voltametria de pulso diferencial	3,01 – 24,28	1,8	
Coluna cromatográfica	HPLC/ UV-Vis	0,3 - 100	44,14	
SPCE/GO	Amperometria	0,1 – 70x10 ³	8,82	Di Tinno et al, 2021.
SPCE/SWCNT	Voltametria de onda quadrada	31 - 220 x 10 ³	353,12	

Fonte: O Autor.

Os valores de LOD e LOQ obtidos para nosso dispositivo estão abaixo de diversos valores citados na literatura para biossensores que detectam FA, e também podem ser comparados com os valores de biossensores baseados em eletrodos de alto custo, como o eletrodo de ouro por exemplo. Assim, como já abordado no item 2.4.1, o material desenvolvido neste trabalho apresenta um potencial uso para detecção de FA em amostras reais. O comportamento da medida de EIE está concordante com todos os demais resultados já obtidos, mostrando que o sistema apresenta uma alta sensibilidade de resposta para variações de concentrações de biomoléculas na interface do material.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

O desenvolvimento dos materiais híbridos de PEDOT/AuNPs e PPI/AuNPs foi caracterizado com sucesso por técnicas microscópicas e eletroquímicas, e indicaram que o material apresentou uma melhora em propriedades eletroativas e armazenamento de energia. As caracterizações por MET, MEV e EDS foram de grande valia para elucidar a morfologia dos eletrodos. Foi possível observar uma morfologia mista de nanotubos, globular e filme para o caso da eletropolimerização de PEDOT. Para o PPI, observou-se que a morfologia predominante foi a de nanotubos.

Para os dois polímeros, foi possível observar nitidamente a presença de AuNPs, que foi comprovada por espectros de EDS. Testes realizados sem a presença de AuNPs, da SAM e do bloqueio com Glicina apresentaram resultados inferiores à aqueles com o biossensor completo, como esperado, pois comprovam que a eficiência e viabilidade da plataforma depende de fatores como a melhora na propriedade eletroativa proporcionada pelas AuNPs, e do fato da SAM propiciar uma imobilização por ligação covalente e a de Glicina ser muito efetiva para bloqueio de sítios não específicos.

Todas as modificações e otimizações realizadas no material híbrido fazem possível um potencial aplicação em sensoriamento e biossensoreamento. Como forma de verificar a possibilidade dessa aplicação, testes para biossensor foram feitos, testando-se diferentes biomoléculas. Os testes das plataformas para construção de biossensores foram bem sucedidos e indicaram o potencial da plataforma para biossensoreamento. Cada uma das etapas envolvidas na construção do biossensor pode ser caracterizada pelas técnicas de VC e, principalmente, EIE.

O estudo e modelagem das respostas por EIE mostrou que o parâmetro de R_{CT} foi o melhor indicativo do funcionamento e aplicabilidade do sistema. Outro bom parâmetro foi o de Q_{DL} , que pode ser também muito explorado. Outros parâmetros foram de grande valia para estudo e otimização do sistema, mas não apresentaram potencial uso para o biossensor proposto, pois não houve uma tendência de aumento ou decréscimo tão evidenciada quando o R_{CT} .

Infelizmente, alguns experimentos e caracterizações, bem como a aplicação final e testes com amostras reais (soro humano, por exemplo) não foram realizadas. Isso se deve à alguns fatores, como o atraso nos experimentos causado devido à pandemia de Covid-19. Também devido a pandemia, não foi possível realizar mais caracterizações por MEV, MET e EDS, pois o CME-UFPR esteve fechado. Além disso, na reta final deste trabalho, surgiu

a oportunidade de um intercâmbio acadêmico na Technische Universität Chemnitz – TU Chemnitz, Alemanha. Como foi um processo rápido e, de certa forma, inesperado, optou-se por não realizar alguns experimentos que estavam previsto, com intuito de aceitar a oportunidade do intercâmbio. Pelo fato de o término do intercâmbio coincidir com o término do período de meu mestrado, também optamos por não incluir nenhum resultado obtido na TU Chemnitz neste material, para que assim todos os prazos e requisitos fossem respeitados.

Sendo assim, mesmo com alguns experimentos previstos não terem sido realizados, principalmente a respeito da finalização do trabalho, todos os estudos elaborados foram bem sucedidos, e bons resultados foram obtidos. O dispositivo desenvolvido foi baseado em um eletrodo de malha de aço, que é um material barato, de fácil utilização e modificação. As modificações com polímeros condutores e AuNPs aprimoraram as propriedades e desempenho do eletrodo. Assim, o material desenvolvido apresenta um baixo custo de fabricação e um ótimo desempenho como biossensor, fazendo viável a aplicação como um dispositivo portátil e descartável.

Todas as caracterizações mostraram que o material estudado neste trabalho pode ser aplicado como *biossensor impedimétrico*, o qual demonstrou um ótimo desempenho para a detecção de diferentes biomoléculas em baixas concentrações.

REFERÊNCIAS

- ADARAKATTI, P. S.; KEMPAHANUMAKKAGARI, S. K. Modified electrodes for sensing. In: **Electrochemistry**. [s.l.] The Royal Society of Chemistry, 2019. p. 58–95.
- AN, T. et al. Fabrication of conducting polymer micro/nanostructures coated with Au nanoparticles for electrochemical sensors. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 12, n. 6, p. 4975–4978, 2012.
- ANTONIO, H.; FARIA, M.; ZUCOLOTTI, V. Biosensors and Bioelectronics Label-free electrochemical DNA biosensor for zika virus identification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 131, n. February, p. 149–155, 2019.
- BAIG, N.; RANA, A.; KAWDE, A.-N. Modified Electrodes for Selective Voltammetric Detection of Biomolecules. **Electroanalysis**, v. 30, n. 11, p. 2551–2574, nov. 2018.
- BAILEY, L. B.; CAUDILL, M. A. Folate. In: **Present Knowledge in Nutrition**. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2012. p. 321–342.
- BALINT, R.; CASSIDY, N. J.; CARTMELL, S. H. Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 6, p. 2341–2353, 2014a.
- BALINT, R.; CASSIDY, N. J.; CARTMELL, S. H. Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 6, p. 2341–2353, 2014b.
- BĂNICĂ, F.-G. Materials and Methods in Chemical-Sensor Manufacturing. In: **Chemical Sensors and Biosensors**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2012a. p. 66–100.
- BĂNICĂ, F. What are Chemical Sensors? In: **Chemical Sensors and Biosensors**. [s.l.: s.n.]. p. 1–20.
- BĂNICĂ, F. Electrical-Impedance-Based Sensors. In: **Chemical Sensors and Biosensors**. [s.l.: s.n.]. p. 367–403.
- BĂNICĂ, F. Affinity-Based Recognition. In: **Chemical Sensors and Biosensors**. [s.l.: s.n.]. p. 101–117.
- BĂNICĂ, F. Dynamic Electrochemistry Transduction Methods. In: **Chemical Sensors and Biosensors**. [s.l.: s.n.]. p. 258–313.
- BĂNICĂ, F. Materials and Methods in Chemical-Sensor Manufacturing. In: **Chemical Sensors and Biosensors**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2012f. p. 66–100.
- BATRA, B. et al. Folic acid biosensors: A review. **Process Biochemistry**, v. 92, p. 343–354, maio 2020.
- BATTISTEL, A. et al. Analysis and mitigation of the artefacts in electrochemical impedance spectroscopy due to three-electrode geometry. **Electrochimica Acta**, v. 135, p. 133–138, jul. 2014.
- BOBROWSKI-KHOURY, N. et al. Folate Receptor Alpha Autoantibodies in Autism Spectrum Disorders: Diagnosis, Treatment and Prevention. **Journal of Personalized**

Medicine, v. 11, n. 8, p. 710, 24 jul. 2021.

BOSS, S. D.; AMETAMEY, S. M. Development of Folate Receptor–Targeted PET Radiopharmaceuticals for Tumor Imaging—A Bench-to-Bedside Journey. **Cancers**, v. 12, n. 6, p. 1508, 9 jun. 2020.

BROOKE, R. et al. Recent advances in the synthesis of conducting polymers from the vapour phase. **Progress in Materials Science**, v. 86, p. 127–146, 2017.

CLIFTON, G. T. et al. Folate receptor α : A storied past and promising future in immunotherapy. **Human Vaccines**, v. 7, n. 2, p. 183–190, 27 fev. 2011.

COLOMBO, R. N. P. et al. Porous polymeric templates on ITO prepared by breath figure method for gold electrodeposition. **Electrochimica Acta**, v. 158, p. 187–195, 2015.

CORREIA, A. R. et al. Optimized PAH/Folic acid layer-by-layer films as an electrochemical biosensor for the detection of folate receptors. **Bioelectrochemistry**, v. 137, p. 107685, fev. 2021.

DA SILVA, A.; MINADEO, M.; DE TORRESI, S. Gold Nanoparticles and [PEDOT-Poly(D,L-Lactic Acid)] Composite: Synthesis, Characterization and Application to H₂O₂ Sensing. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, n. May, 2019.

DARUICH DE SOUZA, C.; RIBEIRO NOGUEIRA, B.; ROSTELATO, M. E. C. M. Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 798, p. 714–740, 2019.

DAVID, A. R.; ZIMMERMAN, M. R. Cancer: an old disease, a new disease or something in between? **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 10, p. 728–733, 2010.

DE LAZZARI, A. C. et al. Polypyrrole nanotubes for electrochemically controlled extraction of atrazine, caffeine and progesterone. **Microchimica Acta**, v. 186, n. 7, p. 398, 10 jul. 2019.

DERVISEVIC, M. et al. Boronic Acid vs. Folic Acid: A Comparison of the bio-recognition performances by Impedimetric Cytosensors based on Ferrocene cored dendrimer. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 91, p. 680–686, 2017.

DI TINNO, A.; CANCELLIERE, R.; MICHELI, L. Determination of Folic Acid Using Biosensors—A Short Review of Recent Progress. **Sensors**, v. 21, n. 10, p. 3360, 12 maio 2021.

ENSAFI, A. A. **An introduction to sensors and biosensors**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

FERREIRA, V. C. et al. Attachment of noble metal nanoparticles to conducting polymers containing sulphur – preparation conditions for enhanced electrocatalytic activity. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 10, p. 3567–3574, 2011.

GONÇALVES, R.; PEREIRA, E.; MARCHESI, L. The Overoxidation of poly(3-hexylthiophene) (P3HT) Thin Film: CV and EIS measurements. **International journal of electrochemical science**, v. 12, p. 1983 – 1991, 2017.

GRÜNDLER, P. **Chemical Sensors: An Introduction for Scientists and Engineers**. 1.

ed. [s.l.] Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007. v. 66

HASAN, M. R. et al. Recent development in electrochemical biosensors for cancer biomarkers detection. **Biosensors and Bioelectronics: X**, v. 8, p. 100075, set. 2021.

HRYNIEWICZ, B. M. et al. Influence of the pH on the electrochemical synthesis of polypyrrole nanotubes and the supercapacitive performance evaluation. **Electrochimica Acta**, v. 293, p. 447–457, 2019.

HRYNIEWICZ, B. M.; VIDOTTI, M. PEDOT Nanotubes Electrochemically Synthesized on Flexible Substrates: Enhancement of Supercapacitive and Electrocatalytic Properties. **ACS Applied Nano Materials**, v. 1, n. 8, p. 3913–3924, 2018.

HU, F. et al. Conductive Polymer Nanotubes for Electrochromic Applications. **ACS Applied Nano Materials**, v. 2, n. 5, p. 3154–3160, 24 maio 2019.

HUANG, S. et al. Electrochemical Synthesis of Gold Nanocrystals and Their 1D and 2D Organization. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 42, p. 19823–19830, 2005.

HUI, Y. et al. **Synthesis and electrochemical sensing application of poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-based materials: A review** *Analytica Chimica Acta* Elsevier Ltd, , 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.02.080>>

HULANICKI, A.; GLAB, S.; INGMAN, F. Chemical sensors definitions and classification. **Pure and Applied Chemistry**, 1991.

INCA, I. N. DE C. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 1, n. 1, 2020.

ISLAM, M. N.; CHANNON, R. B. Electrochemical sensors. In: LADAME, S.; CHANG, J. Y. H. (Eds.). **Bioengineering Innovative Solutions for Cancer**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 47–71.

JAIN, A.; CHENG, K. The principles and applications of avidin-based nanoparticles in drug delivery and diagnosis. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 245, p. 27–40, 2017.

JAYANTHI, V. S. P. K. S. A.; DAS, A. B.; SAXENA, U. Recent advances in biosensor development for the detection of cancer biomarkers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 91, p. 15–23, maio 2017.

JOHARI-AHAR, M. et al. An ultra-sensitive impedimetric immunosensor for detection of the serum oncomarker CA-125 in ovarian cancer patients. **Nanoscale**, v. 7, n. 8, p. 3768–3779, 2015.

KALUŽA, D. et al. Polypyrrole – Gold nanocomposites. Templateless synthesis and electrochemical properties. **Electrochimica Acta**, v. 320, p. 134585, 2019.

KANG, J. et al. A Rapid Colorimetric Sensor of Clenbuterol Based on Cysteamine-Modified Gold Nanoparticles. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 1, p. 1–5, 2016.

KIM, M. et al. Impedimetric biosensors for detecting vascular endothelial growth factor

(VEGF) based on poly(3,4-ethylene dioxythiophene) (PEDOT)/gold nanoparticle (Au NP) composites. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, n. MAR, p. 1–11, 2019.

KOUSSI-DAOUD, S. et al. Gold nanoparticles and poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) hybrid films as counter-electrodes for enhanced efficiency in dye-sensitized solar cells. **Electrochimica Acta**, v. 125, p. 601–605, 2014.

LASIA, A. **Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications**. [s.l.: s.n.].

LIU, R.; CHO, S. IL; LEE, S. B. Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) nanotubes as electrode materials for a high-powered supercapacitor. **Nanotechnology**, v. 19, n. 21, p. 215710, 2008.

LUZ, J. G. G. et al. Development and evaluation of a SPR-based immunosensor for detection of anti-Trypanosoma cruzi antibodies in human serum. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 212, p. 287–296, 2015.

METKAR, S. K.; GIRIGOSWAMI, K. Diagnostic biosensors in medicine – A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, n. December 2018, p. 271–283, 2019a.

METKAR, S. K.; GIRIGOSWAMI, K. Diagnostic biosensors in medicine – A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 271–283, 2019b.

MILLER, J. W. Folic Acid. In: **Encyclopedia of Human Nutrition**. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 262–269.

MÜLLER, C.; SCHIBLI, R. Prospects in Folate Receptor-Targeted Radionuclide Therapy. **Frontiers in Oncology**, v. 3, 2013.

NARWAL, V. et al. Cholesterol biosensors: A review. **Steroids**, v. 143, n. December 2018, p. 6–17, 2019.

O'CONNOR, C. et al. Folate transporter dynamics and therapy with classic and tumor-targeted antifolates. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 6389, 18 dez. 2021.

OLIVEIRA, A. E. F.; PEREIRA, A. C. Biossensores e a Indústria Alimentar - Revisão. **Revista Virtual da Química**, v. 8, n. 5, 2016.

OLIVEIRA, J. E. et al. Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 3: Biossensores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 8, n. 1, 2013.

PATIL, P. O. et al. Antibody-Mediated Diagnosis of Biomolecules. In: GOPINATH, S. C. B.; LAKSHMIPRIYA, T. (Eds.). **Nanobiosensors for Biomolecular Targeting**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 165–193.

PHONGPHUT, A. et al. A disposable amperometric biosensor based on inkjet-printed Au/PEDOT-PSS nanocomposite for triglyceride determination. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 178, p. 501–507, 2013.

REZAEI, B.; IRANNEJAD, N. Electrochemical detection techniques in biosensor applications. In: ENSAFI, A. A. (Ed.). **Electrochemical Biosensors**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 11–43.

RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 5, p. 1747–1763, 2010.

ROZLOSNIK, N. New directions in medical biosensors employing poly(3,4-ethylenedioxy thiophene) derivative-based electrodes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 3, p. 637–645, 2009.

SALDAN, I. et al. Electrochemical synthesis and properties of gold nanomaterials. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 22, n. 3, p. 637–656, 2018.

SAM, S. et al. Semiquantitative Study of the EDC/NHS Activation of Acid Terminal Groups at Modified Porous Silicon Surfaces. **Langmuir**, v. 26, n. 2, p. 809–814, 19 jan. 2010.

SAMANTA, D.; SARKAR, A. Immobilization of bio-macromolecules on self-assembled monolayers: Methods and sensor applications. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 5, p. 2567–2592, 2011.

SANDHYARANI, N. Surface modification methods for electrochemical biosensors. In: ENSAFI, A. A. (Ed.). **Electrochemical Biosensors**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 45–75.

SANTOS, M. DE O. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 64, n. 1 SE-RESENHA, 30 mar. 2018.

SCARANTI, M. et al. Exploiting the folate receptor α in oncology. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 17, n. 6, p. 349–359, 9 jun. 2020.

SIMÕES, F. R.; XAVIER, M. G. Electrochemical Sensors. In: DA RÓZ, A. L. et al. (Eds.). **Nanoscience and its Applications**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 155–178.

SINGH, S. et al. Prostate cancer biomarkers detection using nanoparticles based electrochemical biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 137, n. May, p. 213–221, 2019.

SOUTO, D. E. P. et al. Development of a label-free immunosensor based on surface plasmon resonance technique for the detection of anti-Leishmania infantum antibodies in canine serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 46, p. 22–29, 2013.

STÖCKER, T.; KÖHLER, A.; MOOS, R. Why does the electrical conductivity in PEDOT:PSS decrease with PSS content? A study combining thermoelectric measurements with impedance spectroscopy. **Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics**, v. 50, n. 14, p. 976–983, 2012.

TELES, F. R. R.; FONSECA, L. P. Applications of polymers for biomolecule immobilization in electrochemical biosensors. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, n. 8, p. 1530–1543, dez. 2008.

VIDOTTI, M. et al. Biosensors based on gold nanostructures. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 1, p. 3–20, 2011.

WANG, C. et al. Anchoring gold nanoparticles on poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) nanonet as three-dimensional electrocatalysts toward ethanol and 2-propanol oxidation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 541, p. 258–268, 2019.

WOLFART, F. et al. Conducting polymers revisited: applications in energy, electrochromism and molecular recognition. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 21, n. 9, p. 2489–2515, 2017.

YOON, J.-Y. **Introduction to biosensors : from electric circuits to immunosensors**. 2. ed. [s.l.] Springer International Publishing, 2016.

ZHAI, Q.; CHENG, W. Soft and Stretchable Electrochemical Biosensors. **Materials Today Nano**, v. 7, p. 100041, 2019.

ANEXO I

Tabela 10. Aproveitamento acadêmico.

Disciplina	Créditos	Conceito
Métodos eletroquímicos de análise	4	A
Colóides e química de superfície	4	A
Química Analítica Avançada	4	B
Tópicos especiais em química I - Riscologia química e boas práticas laboratoriais	2	B
Tópicos especiais em Química IV - Electrochemistry: fundamental and applications	1	A
Seminários M1	1	A
Seminários M2	1	A
Prática de Docência em Química	1	A

ANEXO II

Produção científica:

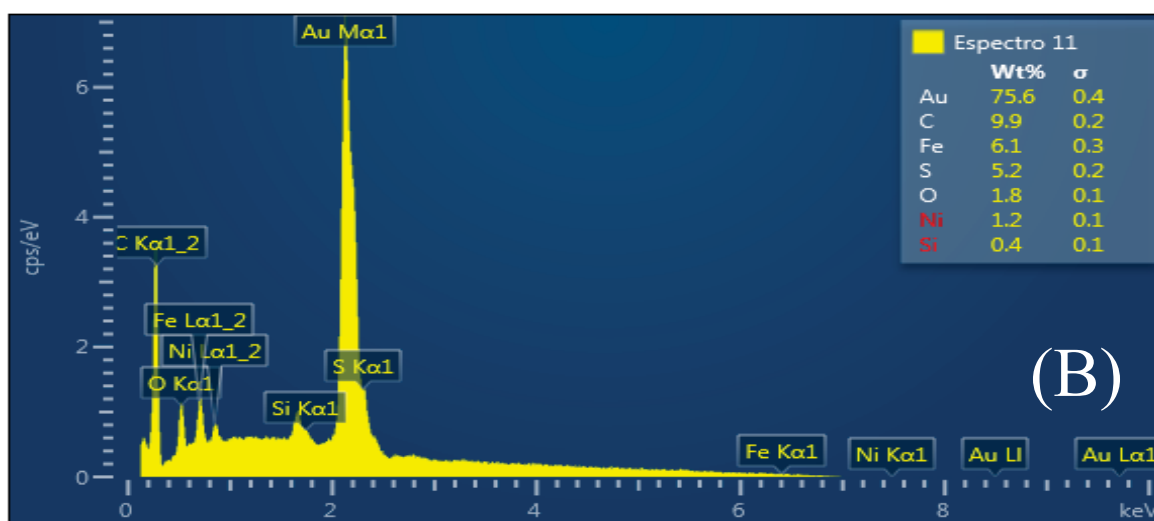
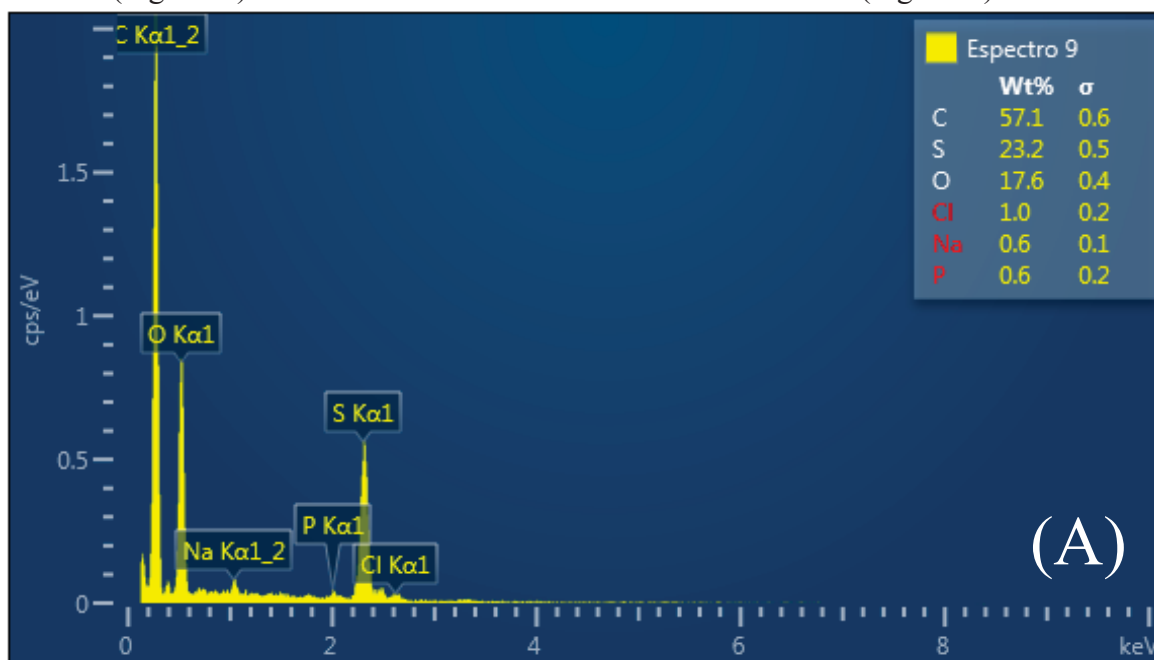
HRYNIEWICZ, B. M.; ALVARENGA, G.; DELLER, A.; BACH-TOLEDO, L.; PESQUEIRA, C.; KOBUKOSKI, V.; VIDOTTI, M. Nanostructured Platforms Based on Conducting Polymers for Sensing. Reference Module in Biomedical Sciences. [s.l.] Elsevier, 2021.

SOARES, ANA L.; HRYNIEWICZ, BRUNA M.; DELLER, ANDREI E.; VOLPE, JAQUELINE; MARCHESI, LUÍS F.; SOUTO, DÊNIO E. P.; VIDOTTI, MARCIO. Electrodes Based on PEDOT Nanotubes Decorated with Gold Nanoparticles for Biosensing and Energy Storage. *Acs Applied Nano Materials*, v. 4, p. 9945-9956, 2021.

Bruna M. Hryniewicz^{a,*}, Jaqueline Volpe^{b,*}, Larissa Bach-Toledo^a, Kamila C. Kurpel^c, Andrei E. Deller^a, Ana Leticia Soares^a, Jeanine M. Nardin^d, Luís F. Marchesi^{a,e}, Fernanda F. Simas^c, Carolina C. Oliveira^c, Luciano Huergo^f, Dênio E. P. Souto^{b,**}, Marcio Vidotti^{a,**}. Development of polypyrrole (nano)structures decorated with gold nanoparticles towards immunosensing for COVID-19 serological diagnosis. *Materials Today Chemistry*, Volume 24, June 2022.

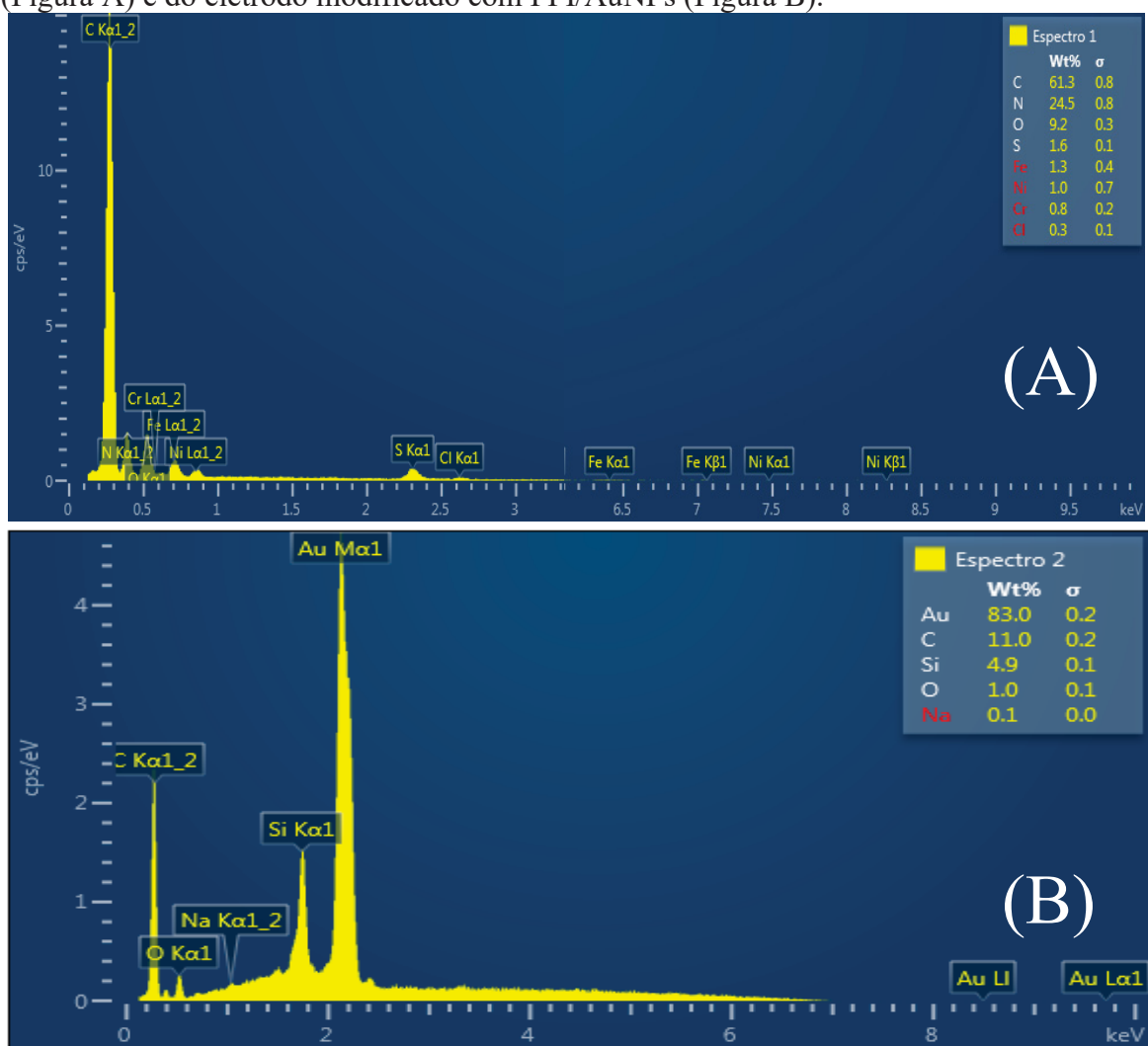
ANEXO III

Figura 25. Espectros de EDS obtidos para a caracterização do eletrodo modificado com PEDOT (Figura A) e do eletrodo modificado com PEDOT/AuNPs (Figura B).



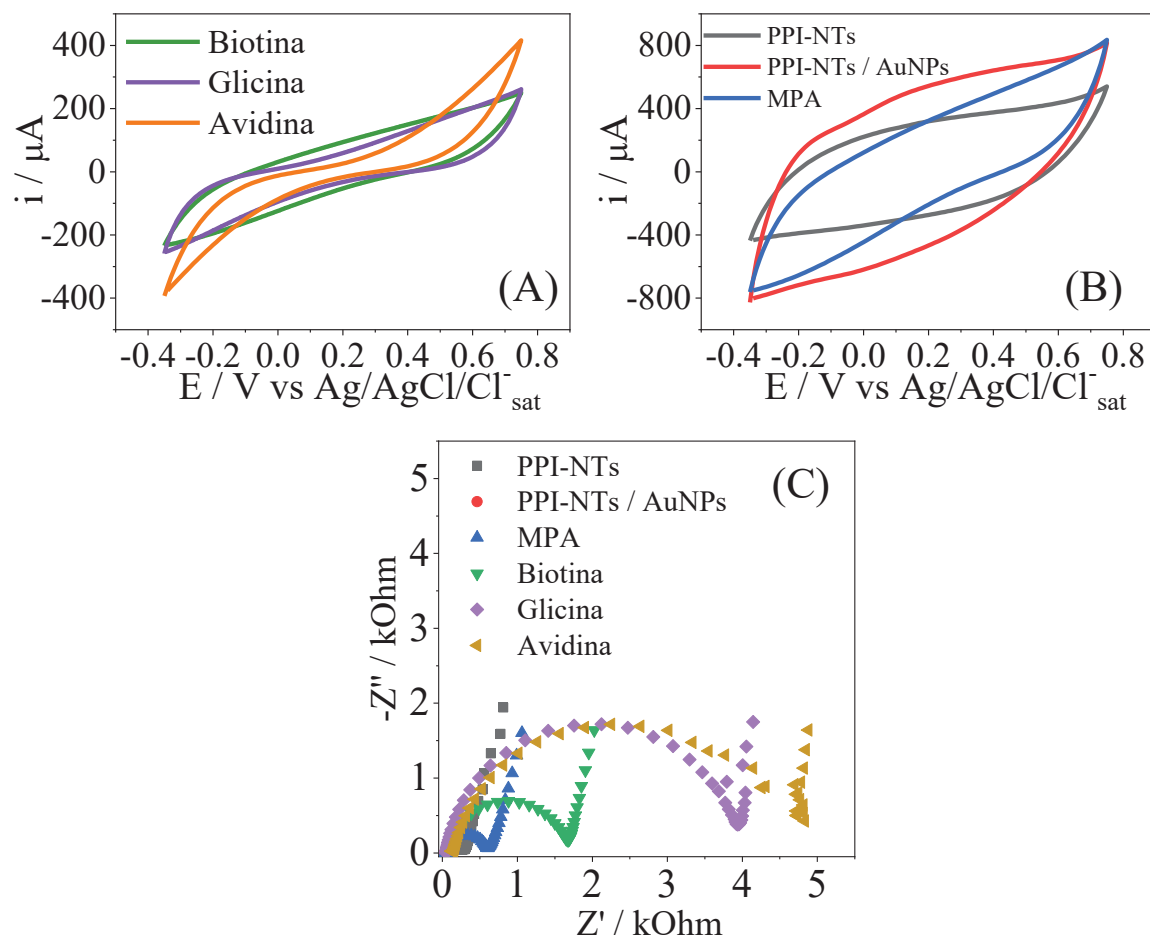
Fonte: O Autor.

Figura 26. Espectros de EDS obtidos para a caracterização do eletrodo modificado com PPI (Figura A) e do eletrodo modificado com PPI/AuNPs (Figura B).



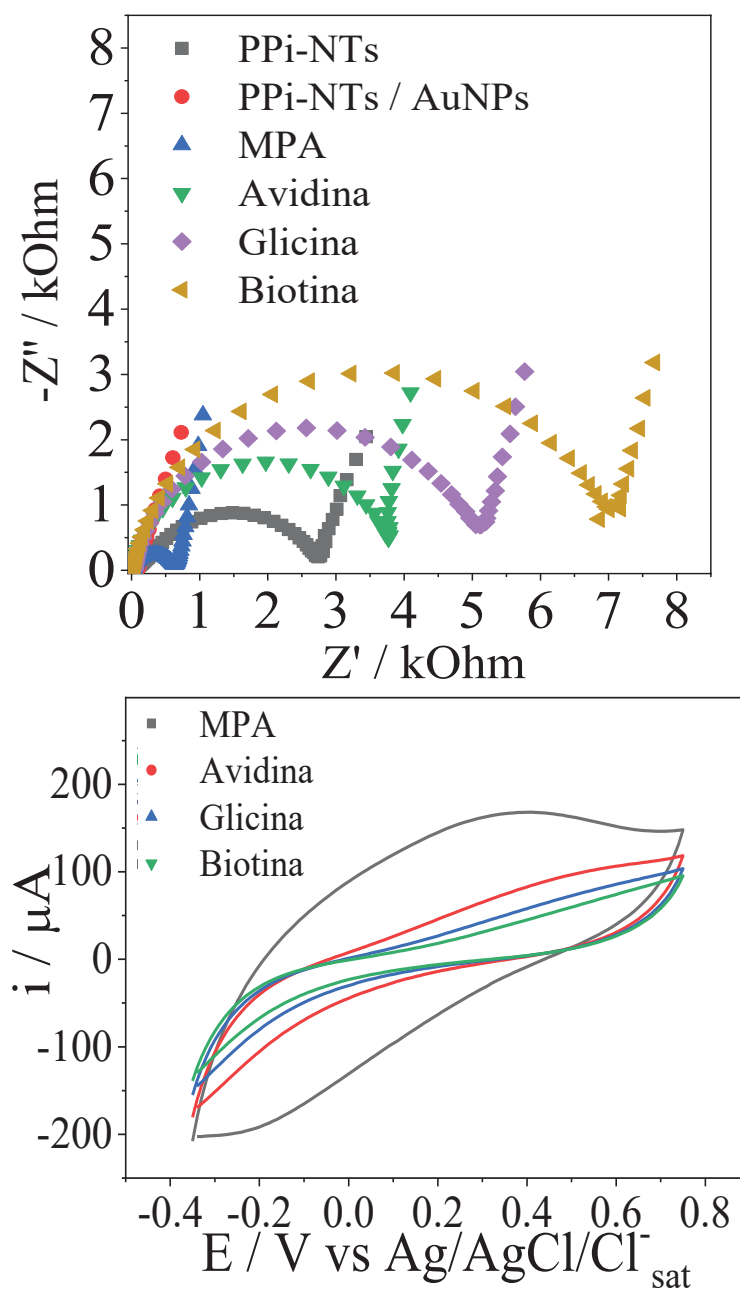
Fonte: O Autor.

Figura 27. Construção do biossensor baseado em PPI/AuNPs para o par avidina/biotina. Voltamogramas cíclicos (A) e (B) mostrando a caracterização de diferentes etapas na construção do biossensor baseado na plataforma, e o Diagrama de Nyquist (C) para a mesma caracterização.



Fonte: O Autor.

Figura 28. Biossensor construído utilizando Avidina como biorreceptor e Biotina como analito. Este experimento comprova que ambas as moléculas podem atuar como biorreceptor.



Fonte: O Autor.

Tabela 11. Construção do biossensor com o eletrodo modificado apenas com PPI e sem utilizar o bloqueio com glicina.

Parâmetro	PPI	FBP	FBP-Ab1	FBP-Ab2	FBP-Ab3	FBP-Ab4
$R_s / k\Omega$	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
$Q_{DL} / 10^{-5} F s^{n-1}$	2,9	1,54	1,42	1,42	1,4	1,39
NDL	0,78	0,83	0,84	0,84	0,85	0,85
$R_{CT} / k\Omega$	0,27	0,58	0,71	0,8	0,91	0,97
$Q_{LF} / 10^{-3} F s^{n-1}$	5,53	5,43	5,13	4,99	4,61	4,43
nLF	0,83	0,84	0,84	0,83	0,82	0,81

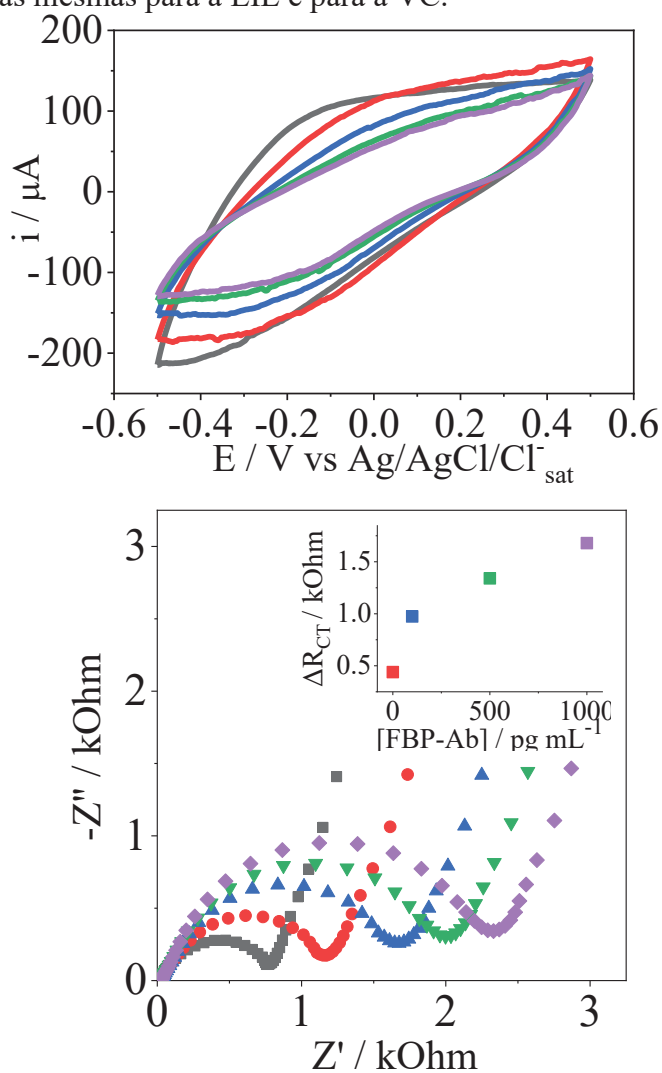
Fonte: O Autor.

Tabela 12. Construção do biossensor com o eletrodo modificado apenas com PPI, utilizando o bloqueio com glicina.

Parâmetro	PPI	FBP	Glicina	FBP-Ab1	FBP-Ab2	FBP-Ab3	FBP-Ab4
$R_s / k\Omega$	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
$Q_{DL} / 10^{-5} F s^{n-1}$	2,9	2	2,25	2,28	2,40	2,41	2,33
NDL	0,78	0,82	0,8	0,8	0,79	0,79	0,80
$R_{CT} / k\Omega$	0,27	0,51	0,56	0,63	0,68	0,71	0,73
$Q_{LF} / 10^{-3} F s^{n-1}$	5,53	4,21	3,77	3,45	3,00	2,87	2,81
nLF	0,83	0,79	0,77	0,75	0,71	0,70	0,70

Fonte: O Autor.

Figura 29. Construção do biossensor utilizando PPI na morfologia de filme. As cores representativas são as mesmas para a EIE e para a VC.



Fonte: O Autor.

Tabela 13. Ajuste dos parâmetros obtidos com PPI-Filme, referente à EIE da Figura 29.

Parâmetro	Bloqueio	FBP-Ab1	FBP-Ab2	FBP-Ab3	FBP-Ab4
$R_s / k\Omega$	0,024	0,025	0,031	0,027	0,029
$Q_{DL} / 10^{-5} F s^{n-1}$	2,38	3	2,72	2,56	2,47
n_{DL}	0,78	0,76	0,77	0,77	0,78
$R_{CT} / k\Omega$	0,774	1,214	1,749	2,115	2,454
$Q_{LF} / 10^{-3} F s^{n-1}$	5,09	4,94	4,93	5,01	5,37
n_{LF}	0,81	0,8	0,8	0,82	0,85

Fonte: O Autor.