



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Programa de Pós-Graduação em Química

Instituto de Química

Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO POLI(ÁCIDO 4-
HIDROXIFENILACÉTICO) ELETROPOLIMERIZADO
SOBRE ELETRODO DE GRAFITE E SUA APLICAÇÃO NO
DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSENSOR
AMPEROMÉTRICO PARA DIAGNÓSTICO DE
LEISHMANIOSE VISCERAL**

Mestrando: *Miquéias Ferreira Gomes*

Orientadora: *Profa. Dra. Ana Graci Brito-Madurro*

Co-Orientador: *Prof. Dr. João Marcos Madurro*

2011

FEVEREIRO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Programa de Pós-Graduação em Química

Instituto de Química

Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO POLI(ÁCIDO 4-HIDROXIFENILACÉTICO) ELETROPOLIMERIZADO SOBRE ELETRODO DE GRAFITE E SUA APLICAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia.

Mestrando: *Miquéias Ferreira Gomes*

Orientadora: Profa. Dra. *Ana Graci Brito-Maduro*

Co-Orientador: Prof. Dr. *João Marcos Maduro*

2011

FEVEREIRO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Química
Programa de Pós Graduação em Química – MESTRADO
E-mail: ppgquimica@ufu.br - Fone: 3239-4385

ALUNO(A): MIQUÉIAS FERREIRA GOMES

NÚMERO DE MATRÍCULA: 100301

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

“Desenvolvimento de imunossensor amperométrico para detecção de leishmaniose visceral utilizando eletrodo de grafite modificado com poli(ácido 4-hidroxifenilacético)”

ORIENTADOR(A):

PROFª DRA. ANA GRACIBRITO MADURRO

A Dissertação foi **APROVADA** em apresentação pública realizada no Auditório D do Bloco 50, no Campus Santa Mônica, no dia 25 de fevereiro de 2011, às 14h00 horas, tendo como Banca Examinadora:

NOME:

ASSINATURA:

Profª Dra. Ana Graci Brito Macurro
(IQUFU)

Profª Dra. Fabiane Caxico de Abreu Gaidino
(UFAL)

Profª Dra. Rosana Maria Nascimento Assunção
(IQUFU)

Ana Graci Brito Macurro
Fabiane Caxico de Abreu Gaidino
Rosana M. N. de Assunção

Uberlândia, 25 de fevereiro de 2011.

Dedico este trabalho àqueles que jamais mediram, ou medirão, esforços para me apoiar durante toda a grande jornada da vida.

Àqueles que jamais questionaram minhas decisões, ou ainda, meus projetos, planos e desejos relacionados a vida pessoal e/ou profissional, mesmo quando estes pareciam precipitados ou, até mesmo, sonhos inalcançáveis.

Àqueles que por inúmeras vezes abriram mão dos seus próprios sonhos, desejos e vontades para que os meus pudessem ser realizados.

Àqueles que trabalharam dia e noite árdua e incansavelmente durante anos e anos para me ajudar a custear os estudos.

Àqueles que por anos caminharam sob sol e chuva rumo ao trabalho para que eu pudesse me deslocar confortavelmente rumo a universidade e, até mesmo, ao meu trabalho.

Àqueles que me ensinaram os maiores e mais importantes valores que um homem pode ter na vida, o caráter, a honestidade e a bondade no coração.

Àqueles que me deram as maiores riquezas do mundo, o equilíbrio psicológico e a sede pelo conhecimento.

Àqueles que são os maiores e melhores amigos e companheiros que uma pessoa pode ter na vida e, além disso, são meus pais e irmãos.

Pai, Mãe, Irmã e Irmão, este trabalho é apenas o primeiro de muitos que serão dedicados a vocês. São vocês a razão deste e de todos os esforços que eu tenho empregado para ser uma pessoa melhor em todos os aspectos da vida.

Eu amo muito todos vocês!

AGRADECIMENTOS

- ✚ *Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela minha saúde física e mental, pela família que tenho e por me iluminar, principalmente, nos momentos de extrema dificuldade, tristeza e solidão!*
- ✚ *Agradeço ao meu pai, Jânio Donizete Ferreira Gomes. Pai dedicado; filósofo de formação e natureza; historiador aplicado; escritor talentoso; cantor ilustre; (...); nobre amigo e leal companheiro. Sua imensa sabedoria, caráter e honestidade sempre me guiaram, e continuarão guiando, com coragem e determinação por todos os caminhos da vida.*
- ✚ *A minha mãe, Eurípia Cândida Gomes. Mãe carinhosa e dedicada; companheira leal e amiga ilustre; um verdadeiro exemplo de dedicação aos filhos. Seus ensinamentos me acompanharão pela vida toda.*
- ✚ *A minha irmã, Letícia Perpétua Gomes de Moraes. Irmã não apenas por laços sanguíneos, mas por atitude. Mãe e esposa dedicada; mulher forte e aguerrida. Seu apoio, sua amizade e sua proteção são exemplos que levarei comigo onde quer que eu esteja.*
- ✚ *Ao meu irmão, Kléber Ferreira Gomes. Nobre irmão; companheiro leal; amigo para toda hora. Sua presença física a muito foi perdida, mas sua companhia jamais será. Sua curta jornada neste mundo foi intensa e suficiente para ensinar grandes valores ao irmão mais novo, valores estes que estarão sempre comigo onde quer que eu vá. Sinto muita saudade.*
- ✚ *As minhas sobrinhas, Carolinna Élide Gomes de Moraes e Laura Gomes de Moraes. Anjos pequenos que vieram para trazer novamente a alegria e a felicidade à família.*
- ✚ *A minha namorada, Pâmela Oliveira Martins. Namorada carinhosa; leal companheira; nobre amiga; mulher forte, sábia e dedicada. Sua companhia enriquece minha vida de alegria e motivação. Devo a você grande parte da realização deste trabalho.*
- ✚ *Aos meus orientadores, Ana Graci Brito Madurro e João Marcos Madurro. Grandes seres humanos; profissionais competentes e dedicados. Vocês possibilitaram a realização deste trabalho que representa, sem dúvida alguma, a etapa mais importante da minha vida profissional. Serei sempre grato pela confiança que vocês depositaram em mim, e estejam certos de que eu farei sempre o possível para não desapontá-los.*

- ✚ *A amiga, Mayta Peixoto, secretária do programa de pós-graduação, pela paciência, colaboração e grande demonstração de amizade.*
- ✚ *Aos meus amigos de infância, Rodrigo Batista, Marcos Denilson e Júlio César. Amigos leais que sempre me receberam com alegria e cuja amizade superou o tempo e a distância.*
- ✚ *Aos amigos, Leandro Máximo, Weberson Oliveira e Fábio Henrique. Companheiros de graduação e de profissão. Ilustres amigos para momentos de laser e diversão e que sempre me motivaram profissionalmente e pessoalmente.*
- ✚ *Ao amigo, Lucas Franco Ferreira. O verdadeiro “Big Irmão”. Grande ser humano que me acolheu em sua casa por vários meses. Muito da realização deste trabalho devo aos conhecimentos que você compartilhou comigo.*
- ✚ *Ao amigo, Diego Leoni Franco. Amigo ilustre. Nunca me negou qualquer tipo de ajuda. As contribuições dadas a mim não se limitam apenas a este trabalho, mas, principalmente, a minha formação pessoal, pois, você é um verdadeiro exemplo de ser humano.*
- ✚ *Aos amigos, Alex Ander de Oliveira e Sandra Mara, por terem me acolhido em sua casa e por compartilharem comigo muitas experiências profissionais e pessoais, bem como, pelos muitos momentos de diversão.*
- ✚ *A amiga, Ana Consuelo Felipe. Grande amiga; Fiel companheira. Sua amizade tornou o trabalho bem mais alegre e prazeroso.*
- ✚ *Ao amigo, Deusmaque Carneiro Ferreira. Ilustríssimo amigo; companheiro fiel; exemplo de ser humano. Sua amizade só veio para enriquecer minha vida profissional e pessoal.*
- ✚ *Aos colegas de laboratório, Lara, Ana Cristina, Sabrina, Héden, Érick, Lucas e Luciano. A convivência com vocês somou, em muito, para minha formação profissional e pessoal.*
- ✚ *Aos nobres colegas de outros grupos de pesquisa, Magayver, Carla, Leandro, Leandra, Júlia, Rodrigo, Moacir, Daniel, dentre outros, que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho e que foram grandes companheiros em muitos momentos de descontração e diversão.*

A todos vocês, meu muito obrigado!

“Tirem as máscaras que os condicionam no mundo da representação. Procurem olhar a realidade além do véu que a encobre (a linguagem). Deixem de ser vaidosos, pretensiosos, convenientes, enfim.”

Jânio Donizete Ferreira Gomes

RESUMO

GOMES, M. F., Caracterização estrutural do poli(ácido 4-hidroxifenilacético) eletropolimerizado sobre eletrodo de grafite e sua aplicação no desenvolvimento de imunossensor amperométrico para diagnóstico de leishmaniose visceral. Dissertação de mestrado, Instituto de Química - UFU, **2011**.

Neste trabalho foi desenvolvido um imunossensor eletroquímico capaz de detectar o anticorpo, livre de marcação, específico para leishmaniose visceral utilizando-se EG modificado com ácido poli(4-HFA) como plataforma e VPD como técnica eletroquímica suporte. Para isso, investigações das principais características estruturais, térmicas e eletroquímicas do ácido poli(4-HFA), obtido por eletropolimerização do ácido 4-HFA, foram conduzidas utilizando-se as técnicas FTIR, UV-vis e Fluorescência. Os espectros de FTIR mostraram que os grupos funcionais presentes no monômero são preservados e que novos grupos são formados após a eletropolimerização, e ainda, que o polímero obtido é tetra-1,2,4,5-substituído, com fortes indícios de que esses dois novos substituintes sejam éteres difenílicos e ligações anel-anel, justificando o aumento na extensão de conjugação e a presença de novos grupos cromóforos observados nos estudos de UV-vis e Fluorescência. Neste sentido, foi possível iniciar as discussões sobre a estrutura do ácido poli(4-HFA), bem como, dos possíveis mecanismos de reação envolvidos na sua formação, e estes estudos foram de grande importância na busca de uma melhor compreensão e discussão dos resultados obtidos. A estabilidade térmica do polímero, avaliada por TGA, mostrou que o ácido poli(4-HFA) apresenta estrutura heterogênea e complexa e que este não apresenta boa estabilidade térmica após 100 °C. Investigou-se também o crescimento do filme polimérico em função do número de varreduras de potencial. Com esta investigação foi possível traçar um perfil para o aumento da resposta eletroquímica desse material em função do tempo de eletropolimerização e, tal perfil, indicou que o número de varreduras potenciais utilizados na eletrossíntese é um bom parâmetro a ser empregado na condução dos estudos deste material. Para o desenvolvimento do imunossensor, a imobilização do antígeno rK39, específico para leishmaniose visceral, sob EG/poli(4-HFA) foi comprovada por meio dos estudos eletroquímicos. A detecção eletroquímica do IgG^+ foi conduzida por meio das técnicas de VC e VPD utilizando Coomassie Brilliant Blue G-250 e Cloreto de hexaminrutênio II como possíveis indicadores da formação do complexo Ag-Ac. O Coomassie mostrou-se eficiente para indicar a modificação da superfície do EG/poli(4-HFA) com rK39, entretanto, não apresentou sensibilidade satisfatória para o IgG^+ , bem como, seletividade perante o alvo não complementar (IgG^- , controle negativo). Já o Cloreto de hexaminrutênio II, além de apresentar alta eficiência para indicar a modificação da superfície do EG/poli(4-HFA) com rK39, também apresentou boa sensibilidade para o IgG^+ e seletividade perante IgG^- , possibilitando o desenvolvimento do imunossensor eletroquímico proposto neste trabalho.

Palavras-chave: ácido poli(4-hidroxifenilacético); eletropolimerização; biossensores; imunossensor; leishmaniose.

ABSTRACT

GOMES, M. F., Structural characterization of poly (4-hidroxyphenylacetic acid) electropolymerized on the graphite electrode and its application in the development of amperometric immunosensor for diagnosis of visceral leishmaniasis. Master's thesis, Institute of Chemistry, Federal University of Uberlandia, 2011.

In this work was developed an electrochemical immunosensor that can detect label free specific antibody for visceral leishmaniasis using graphite electrode modified with poly(4-HPA) as a platform and DPV as electrochemical technique support. Therefore, investigations of main structural characteristics, thermal and electrochemical poly(4-HPA), obtained by electropolymerization of acid 4-HPA, were conducted using the following techniques: FTIR, UV-vis and Fluorescence. The FTIR spectra showed that the functional groups present in the monomer are preserved and that new groups are formed after electropolymerization, and the obtained polymer is 1,2,4,5-tetra-substituted, with strong evidences that these two new substituents are diphenyl ethers and ring-ring bonds, which justifies the increase in the extension of conjugation and the presence of new chromophore groups observed in UV-vis and Fluorescence studies. Thus, it was possible to discuss about the structure of poly(4-HPA), as well as propose the possible reaction mechanisms involved in its formation. These studies were of great importance in the search for a better understanding and discussion of the results. The thermal stability of the polymer, evaluated by TGA shows that the poly(4-HPA) presents a complex and heterogeneous structure and do not exhibits good thermal stability after 100 ° C. It was also investigated the growth of polymer in function of the number of potential scans. Through of this investigation it was possible obtained a profile for the increased electrochemical response of this material in relation to the time of electropolymerization, and such profile showed that the number of potential scans used in electrosynthesis is a good parameter to be used at the studies of this material. For the immunosensor development, the immobilization of the rK39 antigen, specific for visceral leishmaniasis, onto EG/poly(4-HPA) was confirmed through electrochemical studies. A electrochemical detection of IgG⁺ was conducted using CV and DPV techniques, using Coomassie Brilliant Blue G-250 and ruthenium hexamine II chloride as possible indicators of the formation of Antigen-Antibody complex. The Coomassie was efficient to indicate the surface modification of EG/poly(4-HPA) with rK39, however, did not show satisfactory sensitivity for IgG⁺, as well as selectivity for the non-complementary target (IgG⁻, negative control). However, the ruthenium hexamine II chloride, showed high efficiency to indicate the surface modification of EG/poly(4-HFA) with rK39 and good sensitivity for IgG⁺ and selectivity towards IgG⁻; enabling the development of the electrochemical immunosensor proposed in this work.

Keywords: poly(4-hidroxyphenylacetic acid); electropolymerization; biosensors; immunosensor; leishmaniasis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Representação estrutural do ácido 4-hidroxifenilacético ($C_8H_8O_3$).....**1**
- Figura 2:** Representação esquemática do efeito de dopagem ocasionado pela aplicação de uma diferença de potencial elétrico. A dopagem cria lacunas (defeitos) que permitem a movimentação dos elétrons.**5**
- Figura 3:** Escala de condutividade ⁽⁸⁾**6**
- Figura 4:** Principais classes de polímeros condutores (15).**7**
- Figura 5:** Diagrama esquemático do funcionamento de um sensor químico. Somente um componente da amostra é reconhecido pelo biorreceptor. O sinal associado ao processo de reconhecimento é convertido em sinal elétrico pelo transdutor. Este sinal é posteriormente amplificado, condicionado, processado e apresentado em forma de dado. O receptor pode reconhecer o analito mediante mecanismo físico, químico ou biológico ⁽⁴⁷⁾.....**9**
- Figura 6:** Esquema representativo dos quatro principais métodos de imobilização de biomoléculas. (a) adsorção, (b) ligação covalente, (c) Oclusão (d) ligação cruzada (51).....**12**
- Figura 7:** Representação esquemática de: (A) estrutura básica de uma imunoglobulina do tipo G. Fab = fragmento que contém o sítio de ligação com o antígeno (papaína), determinante do anticorpo; a parte terminal desse fragmento realiza o reconhecimento e permite acoplamento com o antígeno. Fc = fração constante da cadeia pesada, cuja função específica é a regulação da imunoresposta frente ao hospedeiro ⁽⁴⁷⁾. (B) formação do complexo antígeno-anticorpo em região específica.**16**

Figura 8: (A) Protozoário Leishmania na forma promastigota (infecciosa); (B) Protozoário Leishmania na forma amastigota (intracelular); (C) Flebotomíneo Lutzomyia longipalpis, popularmente conhecido como “mosquito palha” ou “birigui”, principal espécie transmissora de *L. chagasi* no Brasil; (D) Cão com LV apresentando severa perda de massa muscular; (E) Úlceras características de pessoas com LTA; (F) Úlceras características de pacientes com LM, forma mais agressiva da LTA; (G) Criança com hepatoesplenomegalia (aumento do abdômen ocasionado pelo inchaço do fígado e do baço) característico de pacientes com LV; (H) Fígado e baço com tamanho fora do normal característico de pacientes com LV.....**19**

Figura 9: Sequência de aminoácidos responsável pela formação da proteína recombinante rK39 (antígeno específico para LV).**23**

Figura 10: (A) Célula eletroquímica de três compartimentos; (B) Eletrodo de trabalho, sendo (1) dimensão do EG comparada a de uma moeda, (2) EG conectado ao suporte para análise eletroquímica, e (3) dimensão do suporte comparado a uma caneta esferográfica comum; (C) Eletrodos de (1) referência e (2) auxiliar ou contra-eletrodo, e (3) dimensão comparada a uma caneta esferográfica comum; (D) Potenciostatos utilizados, sendo (1) CH Instruments modelo 760C, e (2) EcoChemie modelo 302N com módulo GPES.....**29**

Figura 11: Variação do potencial aplicado com o tempo em VC, mostrando o potencial inicial, E_i , o potencial final, E_f , os potencial máximo, E_{max} , e mínimo, E_{min} . A velocidade de varrimento $dE/dt = v$ (60).....**31**

Figura 12: VC do eletrodo de grafite em: (A) solução $5,00 \text{ mol dm}^{-3} \text{ K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ contendo $0,10 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KCl}$ e (B) solução HClO_4 $0,50 \text{ mol dm}^{-3}$, sendo $V_a = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e $V_b = 50 \text{ mV s}^{-1}$**34**

Figura 13: Fórmula estrutural e molecular para: (A) sonda redox aniônica e (B) sonda redox catiônica; (1) Ferricianeto de potássio, (2) Ferrocianeto de potássio e (3) cloreto de hexaaminrutênio II.**36**

- Figura 14:** (A) Célula eletroquímica, barras de grafite, eletrodo auxiliar e eletrodo de referência utilizados para extração do poli(4-HFA); (B) Equipamentos utilizados nos estudos estruturais do poli(4-HFA), sendo (1) SDT da TA Instruments para estudos termogravimétricos, (2) IR Prestige-21 da Shimadzu para estudos de Infravermelho, (3) espectrofotômetro da Shimadzu modelo UV-1650PC para estudos de ultravioleta visível, e (4) Fluorímetro Hitachi F-4500 para estudos de fluorescência.....**37**
- Figura 15:** Representação esquemática do espectro eletromagnético.....**37**
- Figura 16:** Voltametria de Pulso Diferencial. (A) Esquema de aplicação de pulso começando em E_{base} . A corrente é medida no início (1) e no fim (2) dos pulsos; $t = 2-4$ s e $(t - t')$ 5-100 ms. (B) Perfil esquemático de um voltamograma de pulso diferencial (corrente vs potencial) (60).....**43**
- Figura 17:** Esquema do procedimento utilizado para construção do imunossensor; (1) EG, (2) poli(4-HFA), (3) antígeno - rK39; (4) BSA; (5) anticorpo específico - IgG+.**45**
- Figura 18:** Representação estrutural do Coomassie Brilliant Blue G-250 ($C_{47}H_{48}O_7N_3S_2Na$).
.....**46**
- Figura 19:** Cloreto de Hexaaminrutênio II, sendo (A) representação estrutural e molecular e (B) representação da geometria molecular (bipirâmide tetragonal ou octaédrica).
.....**47**
- Figura 20:** Voltamogramas cíclicos consecutivos (100 ciclos) do EG em solução de ácido perclórico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo ácido (4-HFA) $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; 50 mV/s ; (a) 1º ciclo, (b) do 5º ao 95º, variando a cada 5 ciclos, e, (b) 100º ciclo.....**50**
- Figura 21:** Processo de oxidação atribuído ao poli(4-HFA) monitorado, a cada 20 varreduras potenciais, da 1ª a 400ª varredura em solução de ácido perclórico $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ contendo ácido (4-HFA) $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; 50 mV/s**51**
- Figura 22:** (A) Monitoramento das cargas de oxidação, em potenciais fixos entre +0,22 e +0,85 V, do poli(4-HFA) em função do número de ciclagens potenciais, e (B) monitoramento das I_{pa} 's do poli(4-HFA) em função do número de ciclagens potenciais.**52**

- Figura 23:** VC obtidos para (a) EG em solução de ferrocianeto/ferricianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$) 5 mmol L^{-1} contendo KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, (b) EG/Poli(4-HFA) em solução de ferrocianeto/ferricianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$) 5 mmol L^{-1} contendo KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, e (c) EG/Poli(4-HFA) em solução KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ 54
- Figura 24:** VC obtidos para (a) EG em solução de cloreto de hexaminrutênio II ($[Ru(NH_3)_6]Cl_2$) 5mmol.L^{-1} contendo KCl $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$, (b) EG/Poli(4-HFA) em solução de cloreto de hexaminrutênio II ($[Ru(NH_3)_6]Cl_2$) 5mmol.L^{-1} contendo KCl $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$, e (c) EG/Poli(4-HFA) em solução KCl $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$ 55
- Figura 25:** Estudo térmico do ácido 4-hidróxifenilacético: (a) TGA e (b) DTA.57
- Figura 26:** Estudo térmico do poli(4-HFA): (A) antes do tratamento térmico, sendo (a) TGA e (b) DTA, e (B) após tratamento térmico, sendo (a) TGA e (b) DTA.58
- Figura 27:** UV-vis para o (a) ácido 4-HFA e para o (b) poli(4-HFA) em acetonitrila...62
- Figura 28:** Fluorescência para (A) ácido 4-HFA, sendo (a) emissão e (b) excitação, e para o (B) ácido poli(4-HFA), sendo (a) excitação, (b) emissão para excitação em 255 nm e (c) emissão para excitação em 317 nm.63
- Figura 29:** Comparação das bandas de emissão do (a) ácido 4-HFA e (b) do poli(4-HFA) excitado em 317nm.....64
- Figura 30:** FTIR do ácido (4-HFA).66
- Figura 31:** (A) ampliação da região das deformações harmônicas observada e identificada por (a) no espectro de FTIR do ácido 4-HFA , (B) perfil esperado para deformações harmônicas de anéis aromáticos para-dissubstituídos, conforme apresentado na Figura 15.....67
- Figura 32:** Perfil esperado para deformações harmônicas de anéis aromáticos, entre 2000 e 1660 cm^{-1} , de acordo com o número de substituintes.....67
- Figura 33:** FTIR para o poli(4-HFA) obtido na extração.69

- Figura 34:** (A) ampliação da região das deformações harmônicas observada e identificada por (a) no espectro de FTIR do ácido 4-HFA, (B) perfil esperado para deformações harmônicas de anéis aromáticos para-dissubstituídos, conforme apresentado na Figura 15.....**70**
- Figura 35:** (A) FTIR do (a) monômero e do (b) polímero. (B) FTIR para o ácido poli(4-HFA) (a) antes e (b) após o tratamento térmico.....**71**
- Figura 36:** Mecanismo proposto para a eletropolimerização do ácido 4-HFA (130). ...**75**
- Figura 37:** Estrutura radicalar envolvida no segundo mecanismo de eletropolimerização proposto para o ácido 4-HFA.**77**
- Figura 38:** Possíveis acoplamentos na eletropolimerização do ácido 4-HFA via radicalar.**77**
- Figura 39:** (A) VC para EG em solução tampão TBS contendo 5,00 mmol.dm⁻³ de CBBG-250. (B) VPD para EG/poli(4-HFA) em solução tampão TBS contendo 5,00 mmol.dm⁻³ de CBBG-250.....**78**
- Figura 40:** (A) VPD obtidos para (a) EG/poli(4-HFA)/rK39/IgG⁺ e (b) EG/poli(4-HFA)/rK39. (B) VPD obtidos após subtração das linhas de base para (a) EG/poli(4-HFA)/rK39/IgG⁺ e (b) EG/poli(4-HFA)/rK39/IgG⁻.....**80**
- Figura 41:** (A) VC em solução de cloreto de hexaminrutênio II ([Ru(NH₃)₆]Cl₂) 5 mmol.L⁻¹ em TBS contendo KCl 0,1 mol.L⁻¹ para (a) EG/Poli(4-HFA), (b) EG/Poli(4-HFA)/rK39/IgG⁻ e (c) EG/Poli(4-HFA)/rK39/IgG⁺; 50 mV/s. (B) Processo de oxidação observado entre -4,0 e -1,0 V nos VC apresentados em A.....**82**
- Figura 42:** VPD obtidos em solução TBS contendo cloreto de hexaminrutênio II ([Ru(NH₃)₆]Cl₂) 5 mmol.L⁻¹ e KCl 0,1 mol.L⁻¹ (A) para (a) IgG⁻ (b) IgG⁺, sendo 0,50 ug de rK39 e 5,01 ug para IgG imobilizados, e (B) para as seguintes massas (em ug) e anticorpo imobilizadas: (a) 1,67; (b) 2,50; (c) 3,34 e (d) 4,17. A massa de antígeno imobilizada foi de 0,50 ug.....**84**

Figura 43: (A) VPD do EG/poli(4-HFA) em solução de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2-}$ contendo KCl nas respectivas concentrações: (a) $42,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,85 \text{ mmol L}^{-1}$; (b) $34,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,70 \text{ mmol L}^{-1}$; (c) $29,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,58 \text{ mmol L}^{-1}$; (d) $25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$; (e) $16,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,33 \text{ mmol L}^{-1}$; (f) $14,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,28 \text{ mmol L}^{-1}$; (g) $12,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$. (B) Valores de carga obtidos em função da concentração do indicador.86

Figura 44: VPD obtidos em solução TBS contendo cloreto de hexaminrutênio II ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$) $12 \mu\text{mol L}^{-1}$ e KCl $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$, sendo (a) EG/poli(4-HFA)/rK39, (b) EG/poli(4-HFA)/rK39/IgG+, e (c) EG/poli(4-HFA)/rK39/IgG-.87

Figura 45: (A) VPD para EG/poli(4-HFA) obtidos em solução TBS contendo cloreto de hexaaminrutênio II ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$) $12 \mu\text{mol L}^{-1}$ e KCl $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$. As medidas foram realizadas após os seguintes tempos (em minutos) de contato entre o eletrodo e a solução: (a) 0; (b) 2; (c) 4; (d) 6; e (e) 8. (B) Valores de I_p obtidos em função do tempo de contato entre eletrodo e solução.88

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Exemplos de polímeros que apresentam grande importância comercial.**3**
- Tabela 2:** Principais sistemas de transdução de sinal físico-químico.**9**
- Tabela 3:** Comparação entre as técnicas utilizadas para imobilização de biomoléculas (63).
.....**12**
- Tabela 4:** Casos confirmados de Leishmaniose Tegumentar Americana e Visceral no Brasil de 2007 a 2010 ⁽⁵⁹⁾.**21**
- Tabela 5:** Monitoramento dos Ep, das Ip e das cargas referentes à oxidação do poli(4-HFA) observados nos VC referentes a sua eletrossíntese.**52**
- Tabela 6:** Valores referentes aos Ep's e as Ip's observados nos VC's em solução de ferrocianeto/ferricianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$) 5 mmol.L⁻¹ contendo KCl 0,10 mol.L⁻¹.**55**
- Tabela 7:** Valores referentes aos Ep's e as Ip's observados nos VC's em solução de cloreto de hexaminrutênio II ($[Ru(NH_3)_6]Cl_2$) 5 mmol.L⁻¹ contendo KCl 0,10 mol.L⁻¹. **56**
- Tabela 8:** Porcentagem de aumento dos Ep's e das Ip's observados em solução contendo $Fe(CN)_6^{4-}/Fe(CN)_6^{3-}$ e $Ru(NH_3)_6^{2+}$ para EG/Poli(4-HFA) compara a EG....**56**
- Tabela 9:** Principais informações observadas nos estudos térmogravimétricos do ácido 4-HFA e do Poli(4-HFA).**60**
- Tabela 10:** Número de onda esperado as funções orgânicas presentes no ácido 4-HFA (68).
.....**68**
- Tabela 11:** Deformações esperadas entre 1011 e 1296 cm⁻¹ (* Aromático) (69).**69**
- Tabela 12:** Principais alterações observadas entre o espectro de FTIR do monômero e do polímero antes e após o tratamento térmico.**72**

Tabela 13: Principais diferenças observadas nos VC para detecção de IgG em solução de cloreto de hexaminrutênio II ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$) 5 mmol.L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ entre -0,4 e -0,1 V.....**83**

Tabela 14: Principais diferenças observadas nos VPD em solução de cloreto de hexaminrutênio II ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$) 5 mmol.L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ para detecção de diferentes concentrações de Ac.....**85**

Tabela 15: Principais características observadas no estudo da concentração do indicador.
.....**87**

LISTA ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

(CH)_x – poliacetileno

Δ - variação

μ - micro

μ^* - orbital molecular anti-ligante do tipo π

4-HFA – Ácido 4-hidroxifenilacético

4-HBA - ácido 4-hidroxibenzóico

CB - Componente Biológico

DTA - Análise Térmica Diferencial

ELIZA - Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

AAB – ácido 2-aminobenzóico

Fc - Fração constante

E_{max} - Energia máxima

E_{min} - Energia mínima

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

Ac – anticorpo

Ag – antígeno

BSA – albumina de soro bovino

C – capacitância

C - Carga

DNA – ácido desoxirribonucléico

DSC – calorimetria exploratória diferencial

dsDNA – dupla fita de DNA (híbrido)

E – potencial

EG – eletrodos de grafite

EG/4-HFA – eletrodos de grafite modificados com filmes poliméricos de poli(4-HFA)

Ep – potencial de pico

FTIR – espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

h – horas

LV – leishmaniose visceral

m – massa

min. – minutos

mL – mililitros

mV s⁻¹ – milivolts por segundo

nm – nanômetros

PC – polímeros condutores

PCR – polymerase chain reaction

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

R – resistência

s – segundos

ssDna – simples fita DNA

TBS - Tris-HCl buffer solution

TG – análise termogravimétrica

UV – ultravioleta

UV-Vis – ultra violeta–visível

V - volts

VC – voltametria cíclica

VPD – voltametria de pulso diferencial

VPN - voltametria de pulso normal

λ - comprimento de onda

v – velocidade de varredura (mV s^{-1})

π - orbital molecular ligante do tipo pi

σ - orbital molecular ligante do tipo sigma

Ω - ohms

$^{\circ}\text{C}$ - Graus Celsius

% - Porcentagem

SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| Resumo | i |
| Abstract | ii |
| Lista de Ilustrações | iii |
| Lista de Tabelas | viii |
| Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos | x |
| 1 - INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 - Polímeros..... | 2 |
| 1.2 - Polímeros Condutores | 4 |
| 1.3 - Biossensores | 8 |
| 1.4 – Imunossensores..... | 15 |
| 1.5 – Leishmaniose | 17 |
| 2 - OBJETIVOS | 24 |
| 2.1 - Objetivo Geral..... | 25 |
| 2.2 – Objetivos Específicos..... | 25 |
| 3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL | 27 |
| 3.1 - Materiais e Soluções..... | 27 |
| 3.2 - ESTUDOS DO ÁCIDO POLI(4-HFA) | 28 |
| 3.2.1 - CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA | 28 |
| 3.2.1.1 – Preparação e construção dos eletrodos | 32 |
| 3.2.1.2 - Condicionamento e Seleção dos Eletrodos de Trabalho | 33 |
| 3.2.1.3 – Eletropolimerização do ácido 4-HFA..... | 35 |
| 3.2.1.4 – Influência de Pares Redox Catiônicos e Aniônicos sob a Resposta Eletroquímica do Poli(4-HFA) | 35 |
| 3.2.2 - CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL | 36 |
| 3.2.2.1 – Análise Termogravimétrica - TGA..... | 38 |
| 3.2.2.2 - Espectroscopia no Ultravioleta Visível (UV-vis) e Fluorescência | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.2.3 – Espectroscopia no Infravermelho - IR..... | 41 |
| 3.3 – ESTUDOS DO IMUNOSSENSOR..... | 43 |
| 3.3.1 – Construção do Imunossensor..... | 43 |
| 3.3.2 - Detecção do alvo complementar (IgG+)..... | 46 |
| 3.3.2.1 - Detecção usando Coomassie Brilliant Blue G-250 - CBBG-250 | 48 |
| 3.3.2.2 - Detecção usando Cloreto de Hexaminrutênio II | 48 |
| 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES | 49 |
| 4.1 – ESTUDO DO POLI(4-HFA)..... | 50 |
| 4.1.1 - CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA | 50 |
| 4.1.1.1 - Eletropolimerização do ácido 4-HFA | 50 |
| 4.1.1.2 – Influência de Pares Redox Catiônicos e Aniônicos sob a Resposta Eletroquímica do Poli(4-HFA) | 53 |
| 4.1.2 - CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL | 57 |
| 4.1.2.1 – Análise Termogravimétrica – TGA..... | 57 |
| 4.1.2.2 – Espectroscopia no Ultravioleta Visível (UV-vis) e Fluorescência..... | 61 |
| 4.1.2.3 – Espectroscopia no Infravermelho - IR..... | 65 |
| 4.1.2.4 - Mecanismo proposto para eletropolimerização do ácido 4-HFA..... | 73 |
| 4.2 – ESTUDO DO IMUNOSSENSOR..... | 78 |
| 4.2.1 - Coomassie Brilliant Blue G-250 como indicador da formação do complexo Antígeno-Anticorpo..... | 78 |
| 4.2.1.1 – Comportamento eletroquímico do CBBG-250..... | 78 |
| 4.2.1.2 - Detecção com Coomassie Brilliant Blue G-250..... | 79 |
| 4.2.2 - Cloreto de Hexaminrutênio II como indicador da formação do complexo antígeno-anticorpo..... | 81 |
| 4.2.2.1 - Detecção com Cloreto de Hexaminrutênio II..... | 81 |
| 4.2.2.2 - Otimização do Imunossensor | 85 |
| 4.2.2.2.1 - Concentração do $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{+2}$ | 85 |
| 4.2.2.2.2 - Tempo de contato com $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{+2}$ | 88 |
| 5 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS..... | 90 |
| 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 93 |



INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de biossensores eletroquímicos tem crescido exponencialmente desde sua primeira aparição na literatura, em 1962, devido às várias potencialidades apresentadas por estes dispositivos. Dentre estas, pode-se destacar sua aplicação no diagnóstico e monitoramento de doenças, principalmente as negligenciadas, como a leishmaniose. Esta crescente está diretamente associada ao avanço das pesquisas relacionadas ao estudo e obtenção de polímeros condutores (PC).

PC são materiais que, além de apresentarem boa estabilidade, condutividade e facilidade de síntese, permitem a modificação da superfície de eletrodos para, dentre outras aplicações, incorporação de biomoléculas, como antígenos e/ou anticorpos, ss-DNA e/ou ds-DNA e enzimas, ou seja, permitem a construção de biossensores com transdução eletroquímica. Desta forma, propor o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico significa, também, propor o estudo de um eletrodo modificado com um PC.

Desta forma, a plataforma utilizada no desenvolvimento deste trabalho consiste em eletrodos de grafite modificados eletroquimicamente com PC derivado do ácido 4-hidroxifenilacético (Figura 1).

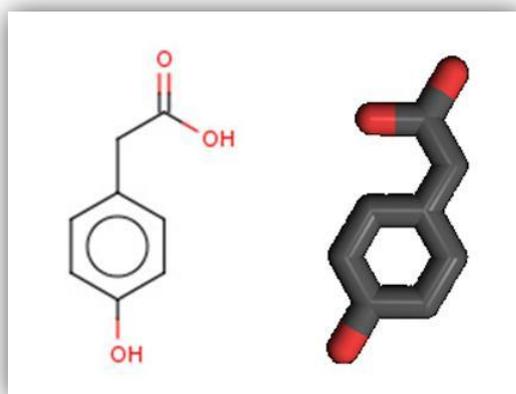


Figura 1: Representação estrutural do ácido 4-hidroxifenilacético ($C_8H_8O_3$).

1.1 - Polímeros

Polímeros são compostos com massa molar da ordem de 10^4 e 10^6 formados pela repetição de um grande número de unidades químicas, justificando a origem da palavra (do grego *poli* “muitos”; *meros* “partes”). A elevada massa molar caracteriza os polímeros como macromoléculas. Existem polímeros orgânicos e inorgânicos, sendo os primeiros os mais estudados e mais importantes comercialmente. As substâncias que dão origem aos polímeros por reação química (reação de polimerização) são chamadas de monômeros (do grego *mono* “uma”; *meros* “parte”)¹. Os polímeros podem ser formados por apenas uma espécie de monômero (homopolímeros) ou por espécies diferentes (copolímeros), e podem ser de origem natural ou sintética².

Polímeros naturais, tais como proteínas, polissacarídeos e os ácidos nucleicos, estão presentes como componentes básicos em sistemas orgânicos vivos, e outros, como o âmbar e a goma são usados pelo homem desde tempos mais remotos³. Os polímeros sintéticos somente surgiram no último século. O primeiro polímero puramente sintético surgiu em 1907, quando resinas de fenol-formaldeído foram produzidas por Baekeland, e, entre elas, o primeiro polímero sintético de uso comercial: o "Bakelite". Desde então, os polímeros sintéticos têm sido desenvolvidos em grande variedade de formas funcionais para atender as aplicações industriais e científicas³.

Além da classificação em homopolímero e copolímero os materiais poliméricos também são classificados quanto ao tipo de reação de polimerização, e, neste caso, são divididos em duas categorias: polímeros de condensação e de adição. Polímeros de condensação são aqueles formados a partir de reações entre dois grupos funcionais com eliminação de pequenas moléculas, como água, ácido clorídrico ou metanol. Polímeros de adição são aqueles formados por meio de reação de adição que ocorrem em compostos que possuem insaturação. Esta classificação foi proposta por Carothers em 1929. Na Tabela 1 são apresentados alguns polímeros e suas respectivas aplicações comerciais.

Tabela 1: Exemplos de polímeros que apresentam grande importância comercial.^a

| POLÍMERO | MONÔMERO(S) | APLICAÇÃO |
|--------------------------------------|--|--|
| HOMOPOLÍMEROS DE ADIÇÃO | | |
| Poliétileno | etileno | <i>balde, sacos de lixo, sacos de embalagens</i> |
| Polipropileno | propileno | <i>cadeiras, poltronas, pára-choques de automóveis</i> |
| PVC | cloro de vinila vinila | <i>tubos para encanamentos hidráulicos</i> |
| Isopor | estireno | <i>isolante térmico</i> |
| Orlon | acrilnitrilo | <i>lã sintética, agasalhos, cobertores, tapetes.</i> |
| Plexiglas "Vidro plástico" Acrílicos | metilacrilato de metila | <i>plástico transparente muito resistente usado em portas e janelas, lentes de óculos.</i> |
| Teflon | tetrafluoretileno | <i>revestimento interno de panelas</i> |
| Borracha fria | isobuteno | <i>pneus, câmaras de ar e objetos de borracha em geral</i> |
| Borracha natural natural | isopreno | |
| Neopreno ou duopreno | cloropreno | |
| Buna | 1,3-butadieno butadieno | |
| COPOLÍMEROS DE ADIÇÃO | | |
| Buna-N ou perbuna | 1,3-butadieno acrilnitrilo | <i>pneus, câmaras de ar e objetos de borracha em geral</i> |
| Buna-S | 1,3-butadieno estireno | |
| HOMOPOLÍMEROS DE CONDENSAÇÃO | | |
| Amido | <i>alfa glicose</i> | <i>alimentos, fabricação de etanol</i> |
| Celulose | <i>beta glicose</i> | <i>papel, algodão, explosivos</i> |
| COPOLÍMEROS DE CONDENSAÇÃO | | |
| Náilon | 1,6-diaminohexano ácido adípico | <i>rodas dentadas de engrenagens, peças de maquinaria em geral, tecidos, cordas, escovas</i> |
| Terilene ou dacron | Etilenoglicol; ácido tereftálico | <i>tecidos em geral (tergal)</i> |
| Baquelite (fórmica) | aldeído fórmico; fenol comum | <i>revestimento de móveis (fórmica), material elétrico (tomada e interruptores)</i> |
| Poliuretano | poliéster ou poliéter; isocianato de <i>p</i> -fenileno | <i>colchões e travesseiros (poliuretano esponjoso), isolante térmico e acústico, poliuretano rígido das rodas dos carrinhos de supermercados</i> |

A estrutura e a organização da cadeia polimérica determinam as propriedades físicas e químicas que o polímero apresentará. Neste caso, as diferentes possibilidades de polimerização somadas aos mais diversos monômeros que potencialmente podem ser

^a Portal São Francisco [Citado em: 02 de fevereiro de 2011]
<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/polimeros/polimeros-4.php>

empregados no processo de polimerização justificam a imensa diversidade e aplicabilidade desses materiais e, logo, sua grande importância econômica e acadêmica.

Contudo, uma nova área de pesquisa e aplicação de polímeros iniciou-se com a descoberta dos polímeros condutores. As propriedades condutoras desses materiais possibilitam sua aplicação no desenvolvimento dos mais diferentes sistemas como, por exemplo, capacitores, diodos emissores de luz, catálise e biossensores.

1.2 - Polímeros Condutores

Desde a década de 60, é conhecido que moléculas orgânicas que apresentam duplas ligações conjugadas podem exibir propriedades semicondutoras. No começo dos anos 70, Shirakawa e Ikeda^{4,5} demonstraram a possibilidade de preparar filmes auto-suportados de poliacetileno (CH)_x pela polimerização direta do acetileno. O polímero produzido apresentou propriedades semicondutoras que atraiu pouco interesse até 1977, quando MacDiarmid e colaboradores⁶ descobriram que, tratando o poliacetileno com ácido ou base de Lewis, era possível aumentar a condutividade em até 13 ordens de grandeza. Esses processos envolviam a remoção ou adição de elétrons da cadeia polimérica (dopagem). A partir de então uma nova classe de polímeros emergiu, os Polímeros Condutores (PC). Desta forma, um PC é um polímero orgânico que possui propriedades elétricas, eletrônicas, magnéticas e ópticas de um metal, mantendo ainda as propriedades físicas, processabilidade, etc., comumente associada com um polímero convencional^{7,8}. Os membros desta nova classe de materiais, chamados de “metais sintéticos”, possuem uma característica em comum: longos sistemas π conjugados, ou seja, uma alternância de ligações simples e duplas ao longo da cadeia. O interesse evidente é combinar em um mesmo material as propriedades elétricas de um semicondutor ou metal com as vantagens de um polímero⁹.

A dopagem de polímeros tem como objetivo criar defeitos (lacunas ou impurezas) ao longo da cadeia polimérica que possibilitem um aumento na condutividade elétrica do material. Durante o processo de dopagem, um polímero orgânico passa de isolante ou semicondutor (faixa de condutividade de 10^{-10} a 10^{-5} S cm⁻¹) para condutor metálico (faixa de condutividade de ~ 1 a 10^4 S cm⁻¹). A condutividade intrínseca é produzida a partir da formação de cargas transportadoras mediante oxidantes (dopagem tipo p) ou redutores

(dopagem tipo n) através da estrutura conjugada ao longo da cadeia polimérica. O processo de dopagem é aleatório e não altera a estrutura do material. A interação impureza-cadeia gera deformações e “defeitos carregados” localizados, responsáveis pelo aumento na condutividade¹⁰ (Figura 2). Os processos de dopagem e desdopagem envolvem contra-íons responsáveis pela estabilização do estado dopado, e podem ser realizados quimicamente ou eletroquimicamente¹¹. O processo de dopagem química é eficiente, mas pouco reprodutível quantitativamente. A dopagem eletroquímica por sua vez, promove um ajuste fino no nível de dopagem através do controle do potencial elétrico.

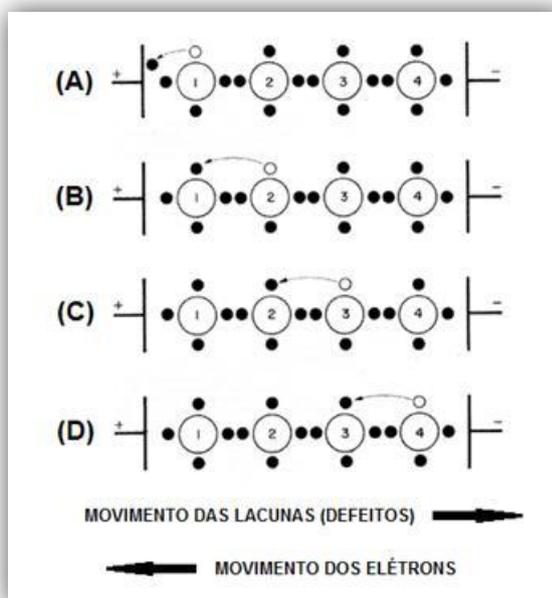


Figura 2: Representação esquemática do efeito de dopagem ocasionado pela aplicação de uma diferença de potencial elétrico. A dopagem cria lacunas (defeitos) que permitem a movimentação dos elétrons.

A condutividade elétrica de muitos polímeros, que apresentam certo grau de condutividade, está na mesma faixa de grandeza da maioria dos semicondutores inorgânicos, como é possível observar na Figura 3.

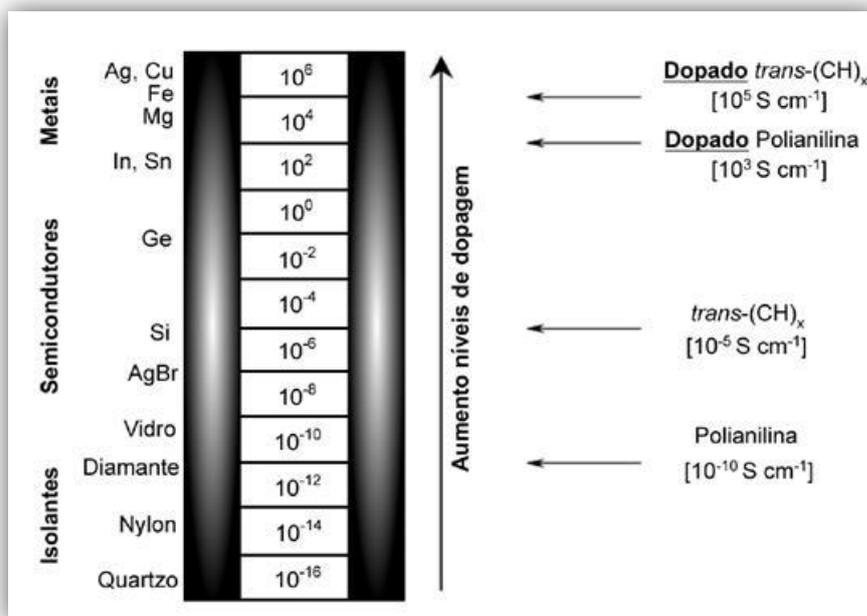


Figura 3: Escala de condutividade¹¹.

Os polímeros podem ser sintetizados, quer por adição de um agente externo (esta abordagem é muitas vezes referida como "síntese química" do PC) ou por reação eletroquímica. A síntese química dos PC é normalmente realizada por oxidantes, tais como: pirossulfato de amônio ((NH₄)₂S₂O₇) ou cloreto férrico (FeCl₃), sendo comumente usada para a preparação de soluções de PC, enquanto deposição eletroquímica é utilizada principalmente para a deposição de filmes de PC sobre substratos condutores. Uma vantagem deste último método é a possibilidade de controlar a espessura do filme pela quantidade de carga passada pelo sistema eletroquímico durante o crescimento do filme, permitindo a realização do processo de geração do polímero a temperatura e pressão ambiente. Contudo, a obtenção de PC utilizando o método eletroquímico é o mais relatado¹². O mecanismo de polimerização mais aceito é citado para sistemas aromáticos e propõe a formação de um cátion-radical a partir da oxidação do monômero, seguida do acoplamento de dois cátions radicais, com desprotonação e reconstituição do sistema aromático^{12,13}. A reação continua com acoplamento de cátions radicais do monômero e cátions radicais dos oligômeros que se formam. As propriedades elétricas e físico-químicas do material eletrossintetizado dependem fortemente das condições de síntese, tais como: concentração do monômero, natureza do meio eletrolítico, temperatura, etc^{12,14,15}. Dentre as famílias dos PC o poliacetileno, polianilina,

polipirrol e politiofeno são as mais estudadas. A maioria destes polímeros são sintetizados por modificações das estruturas apresentadas na Figura 4.

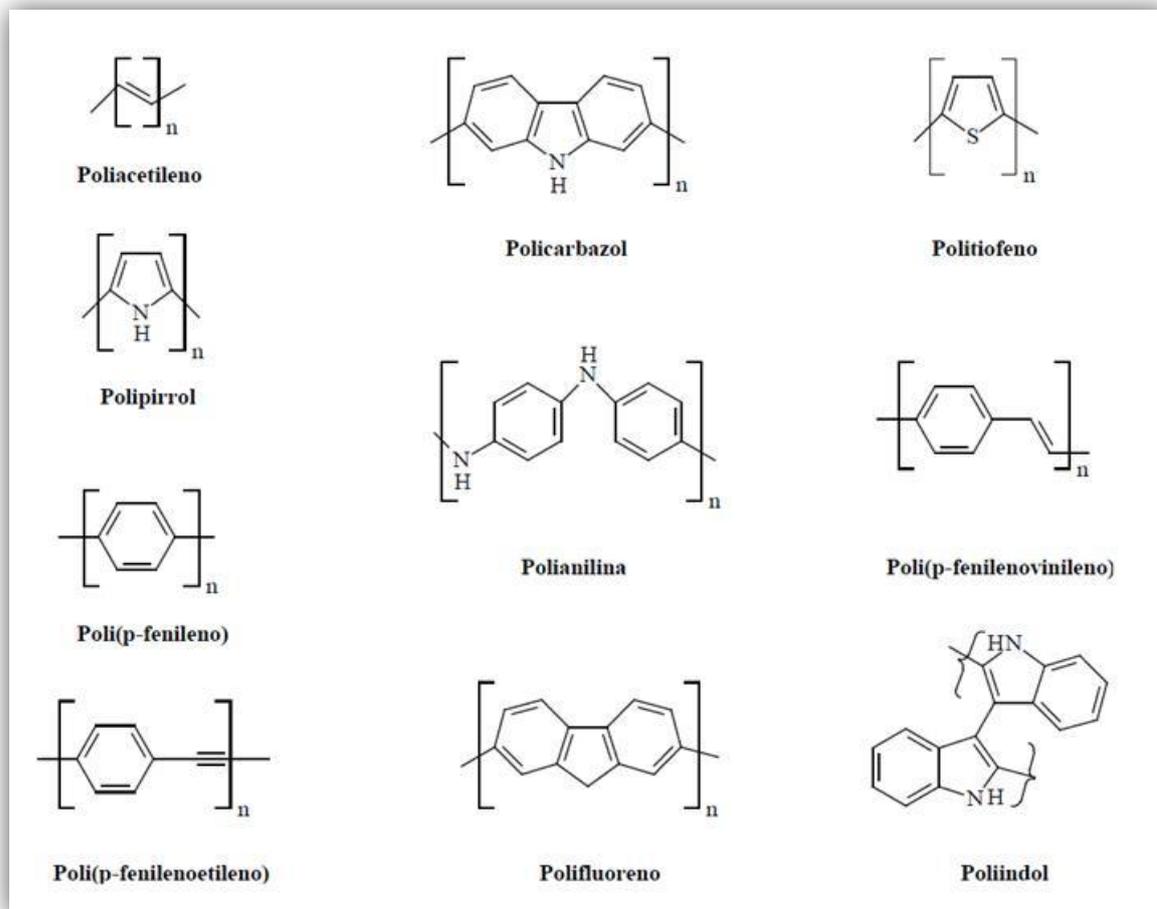


Figura 4: Principais classes de polímeros condutores¹⁶.

Muitos monômeros podem ser eletropolimerizados diretamente sobre um metal ou de eletrodos semicondutores¹⁷, permitindo, assim, uma caracterização *in situ* dos filmes poliméricos por métodos eletroquímicos e espectroscópicos¹⁸. É bem conhecido que as propriedades de polímeros condutores dependem de suas características estruturais. Portanto, muitos esforços têm sido feitos na síntese de novos monômeros e polímeros, com o objetivo de se obter materiais com características ajustáveis para aplicações em eletroquímica e outras áreas¹⁹⁻²¹.

A polimerização eletroquímica de novos monômeros com concomitante deposição de filmes poliméricos tem sido considerada como uma rota efetiva e versátil para a modificação da superfície de um eletrodo por compostos poliméricos orgânicos²², e representam materiais promissores para aplicações em eletrocatalise^{23,24}, sensores²⁵, transistores de efeito de campo²⁶, materiais biologicamente ativos^{27,28}, separação membranas e biomembranas²⁹, baterias²⁹⁻³¹, supercapacitores³²⁻³⁴, elementos micro e nanoeletrônicos³⁵, visores, espelhos, janelas³⁶, diodos emissores de luz³⁷⁻³⁹, dispositivos fotovoltaicos⁴⁰, dispositivos eletrocromáticos^{41,40}, camadas protetoras^{42,43,13} e quimio e biossensores⁴⁴⁻⁴⁷.

O grupo de pesquisa do Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (LAFIP/NANOTEC) têm estudado extensamente a preparação eletroquímica de filmes poliméricos derivados de éteres alquil-arílicos e fenóis⁴⁸⁻⁵⁵. Geralmente os grupos funcionais presentes nos monômeros são preservados após a eletropolimerização. Desta forma, eletrodos modificados com estes filmes encontram-se funcionalizados e isso favorece, em muito, a interação com materiais biológicos, justificando o interesse do grupo no estudo destes materiais com aplicação na construção de biossensores eletroquímicos.

1.3 - Biossensores

Um biossensor é um dispositivo que contém um material biológico, tal como enzimas, anticorpos/antígenos, DNA, bactérias, tecidos, etc. como agente de reconhecimento interligado a um transdutor que converta o sinal biológico num sinal físico e/ou químico (Figura 5)⁵⁶. Uma gama de configurações destes dispositivos confere grande versatilidade no desenvolvimento dos biossensores, que podem ter aplicações diversas, dependendo das características do elemento biológico e do transdutor utilizado. Estes fatores justificam o crescimento acentuado de pesquisas relacionadas aos biossensores, visto que, desde a sua primeira aparição na literatura científica no final de 1970⁵⁷, cerca de 31.900 artigos foram encontrados na literatura aberta⁵⁸. O primeiro biossensor, conhecido como “Eletrodo Enzimático”, foi demonstrado por Clark e Lyons em 1962⁵⁹.

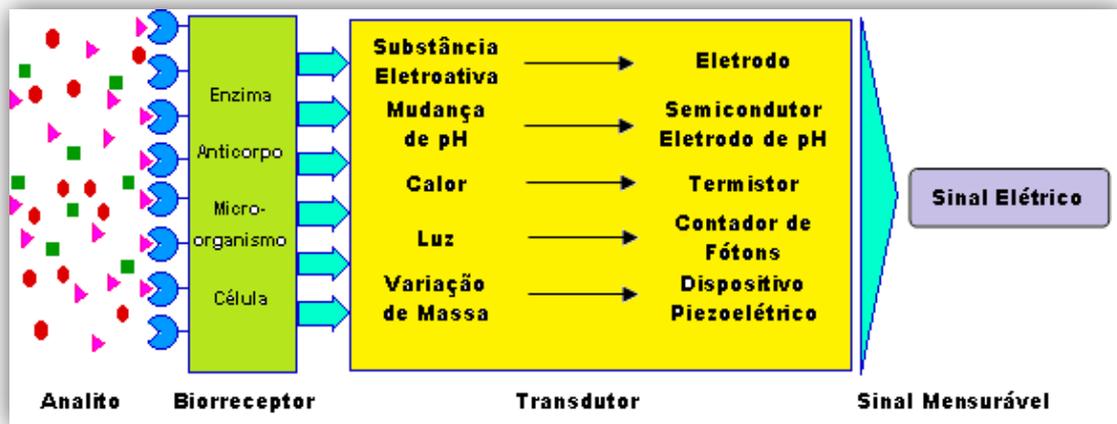


Figura 5: Diagrama esquemático do funcionamento de um sensor químico. Somente um componente da amostra é reconhecido pelo biorreceptor. O sinal associado ao processo de reconhecimento é convertido em sinal elétrico pelo transdutor. Este sinal é posteriormente amplificado, condicionado, processado e apresentado em forma de dado. O receptor pode reconhecer o analito mediante mecanismo físico, químico ou biológico⁶⁰.

Os biossensores podem ser divididos basicamente em duas classes: os catalíticos, que utilizam enzimas imobilizadas e os de afinidade, que utilizam anticorpos, DNA ou peptídeos, como moléculas de bio-reconhecimento^{61,62}. Contudo, também podem ser classificados de acordo com o tipo de transdutor, como mostra a Tabela 2. O tipo de transdução de sinal está diretamente relacionada à característica física ou química do produto gerado pelo componente biológico^{57,62}.

Tabela 2: Principais sistemas de transdução de sinal físico-químico.

| Sistema de Transdução | Medida |
|-----------------------|---|
| Eletroquímico | Amperometria; Potenciometria |
| Elétrico | Condutividade |
| Óptico | Luminescência; Fluorescência; Índice de Refração |
| Térmico | Calorimetria |
| Piezoelétrico Massa | Microbalança de Cristal de Quartzo; Ondas Acústicas de Superfície |

A imobilização das biomoléculas é a etapa mais importante na construção de um biossensor. O objetivo de qualquer metodologia de imobilização é reter a máxima atividade da biomolécula na superfície do transdutor. Analisando os fatores que influenciam as biomoléculas, como as condições do meio ou o procedimento de imobilização, é possível definir a técnica que possui as condições mais adequadas ao sistema em estudo^{63,64}. As técnicas de imobilização de biomoléculas, assim como as de imobilização de mediadores (compostos necessários para assegurar o mecanismo de transferência eletrônica) com maior utilização são as de formação de ligação covalente e adsorção⁶⁴. Outros processos como os de ligação cruzada (*cross-linking*) e oclusão (*entrapment*) também são utilizadas^{65,66}. As principais características de cada procedimento imobilização são descritas abaixo e representadas esquematicamente na Figura 6.

- ❖ **Adsorção física:** baseia-se na formação de forças atrativas de Van der Waals, ligações de hidrogênio e complexos de transição de elétrons entre as biomoléculas e o eletrodo. Este método, não exige qualquer modificação química e possui a vantagem da simplicidade, requerendo apenas uma solução contendo o componente biológico^{67,68}.
- ❖ **Ligação covalente:** esta técnica baseia-se na reação entre grupos funcionais terminais da biomolécula, não essenciais à atividade biológica e grupos reativos da superfície do transdutor, dentre as diversas superfícies pode-se ter um filme polimérico. Embora esta técnica possua a vantagem de dificilmente o componente biológico se desprender da matriz de suporte, é extremamente relevante que durante a utilização, os sítios biológicos sejam preservados. Vários métodos são apontados para a formação da ligação covalente, por exemplo, a formação de ligações via grupos acila, diazônio e tióis^{69,70}.
- ❖ **Oclusão:** esta técnica é utilizada quando o componente biológico é preparado em conjunto com o produto de modificação da superfície do eletrodo, deixando assim as biomoléculas aprisionadas. Um exemplo clássico é a preparação de filmes poliméricos em soluções contendo biomoléculas, onde estas ficam presas dentro da matriz do polímero, durante a polimerização. Poliacrilamida, amido ou nylon, podem ser empregados para aprisionar biomoléculas^{71,72}. Usualmente esta camada de modificação é separada da solução teste por uma membrana semipermeável, de forma

a retardar a lixiviação do componente biológico. O processo de interação pode ser puramente físico ou envolver ligações covalentes⁶⁴.

- ❖ **Ligação Cruzada:** baseia-se na imobilização como resultado da reação do componente biológico com um agente bifuncional em que se formam as ligações covalentes intermoleculares^{73,74}. Os reagentes que permitem o uso desta técnica contêm grupos reativos terminais específicos para os grupos funcionais (por exemplo, aminas) que se encontram nas outras moléculas a imobilizar. A escolha do agente de “crosslinking” é feita, de acordo com os grupos funcionais presentes na biomolécula sendo, no entanto, a escolha final realizada de maneira empírica. Para a maioria das aplicações é necessário manter a estrutura original da proteína, por isso o “crosslinking” é feito em condições pouco agressivas tanto de pH como de tampões. É também importante obter um grau de conjugação entre o agente de “crosslinking” e a proteína, pois em alguns casos (incluindo enzimas em particular) é conveniente que não seja muito elevado de modo a permitir a manutenção da atividade biológica do fixado. A metodologia mais utilizada na aplicação é o mergulhar da superfície de suporte (por exemplo, um eletrodo) numa solução ativa contendo a enzima e o agente bifuncional (por exemplo, glutaraldeído, carbodiimida, etc.) de forma a cobrir toda a superfície, esperar que se forme uma película (períodos que variam entre poucos minutos e várias horas, dependendo do agente) seguindo-se períodos de lavagem e secagem da superfície tratada⁶⁴.

A resposta das moléculas imobilizadas depende da área superficial, porosidade, caráter hidrofílico da matriz imobilizada, condições de reação e metodologia escolhida para a imobilização. A Tabela 3 mostra a comparação das vantagens e desvantagens de cada procedimento de imobilização descrito para as biomoléculas. Observa-se que quando os métodos são comparados, a adsorção destaca-se pela simplicidade e aplicabilidade esperada no processo de imobilização, sendo o procedimento mais simples e de fácil execução. A utilização de superfícies funcionalizadas para incorporação de biomoléculas tem sido amplamente discutida na literatura^{75,76}.

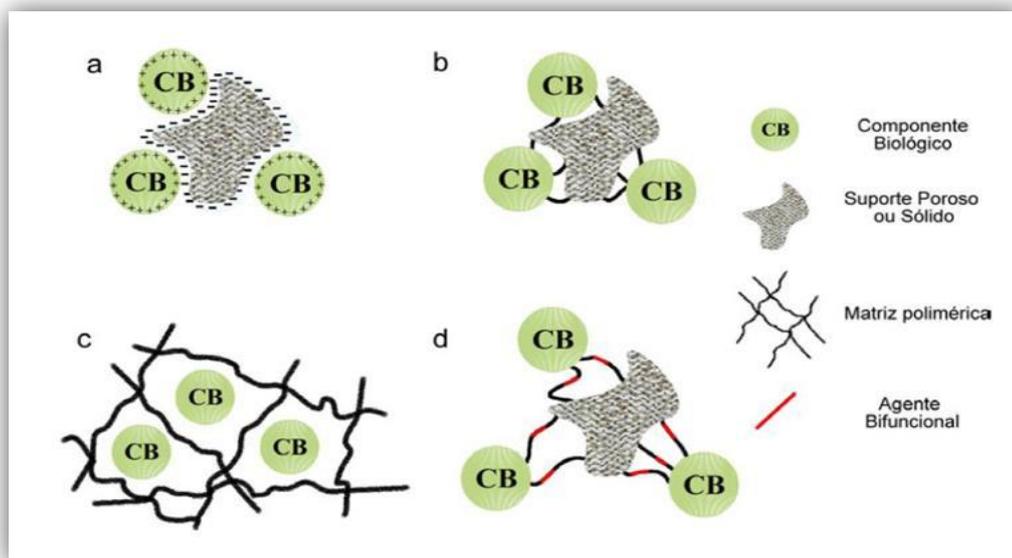


Figura 6: Esquema representativo dos quatro principais métodos de imobilização de biomoléculas. (a) adsorção, (b) ligação covalente, (c) Oclusão (d) ligação cruzada⁶⁴.

Tabela 3: Comparação entre as técnicas utilizadas para imobilização de biomoléculas⁶³.

| MÉTODO | VANTAGENS | DESVANTAGENS |
|--------------------------|---|---|
| <i>Adsorção</i> | Procedimento simples; condições brandas; menos dano à biomolécula. | Interações dependentes do pH, solvente e temperatura, baixa estabilidade. |
| <i>Oclusão</i> | Procedimento simples, não há problemas com o meio. | Resistência difusional, pode causar desnaturação da biomolécula causando baixa sensibilidade e limite de detecção. |
| <i>Ligação Cruzada</i> | Procedimento simples, ligações químicas fortes. | Dificuldade em controlar a reação, grande quantidade de biomolécula, baixa sensibilidade. |
| <i>Ligação Covalente</i> | Estável complexo matriz e biomolécula. Ligação entre grupos específicos biomolécula e matriz. Ideal para produção em massa e comercialização. | Complicado e elevado tempo de produção. Possibilidade de perda de atividade devido a reações envolvendo grupos essenciais da atividade biológica. |

O tipo de biomolécula imobilizada sobre o transdutor determina a classificação do biossensor. Desta forma, têm-se os Genossensores (biossensores contendo oligonucleotídeos, produtos de PCR ou fragmentos de DNA) Biossensores enzimáticos (o componente biológico é uma enzima) Imunossensores (biossensores contendo um antígeno ou anticorpo imobilizado) e Biossensores Microbiológicos (onde o componente biológico é representado por fungos, bactérias organelas vegetais e animais dentre outras). O princípio de funcionamento de cada biossensor pode ser entendido como:

- ❖ **Biossensores Enzimáticos:** baseiam-se na imobilização de enzimas, tendo seu princípio de funcionamento baseado na atividade específica sobre um composto (substrato) ou uma determinada classe de compostos. O funcionamento desses biossensores, pode também envolver a inibição da enzima, pelos referidos compostos, afetando a quantidade de substrato consumido ou produto gerado, ou pelo monitoramento direto da espécie eletroativa gerada/consumida na catálise enzimática^{57,77}.
- ❖ **Biossensores Microbiológicos:** consiste na imobilização de células microbiológicas sobre o transdutor. O princípio de operação destes biossensores é baseado no uso das funções metabólicas e respiratórias do microorganismo para detectar um analito que seja o substrato ou um inibidor destes processos. Lei e colaboradores⁷⁸, reportaram numa revisão sobre o assunto, algumas das recentes aplicações dos biossensores microbiológicos no monitoramento ambiental e para o uso em alimentos, fermentação e campos similares.
- ❖ **Genossensores** baseiam-se na imobilização de fragmentos de DNA ou oligonucleotídeos. A chamada simples fita (ssDNA), após interação com alvo complementar regenera a dupla fita (dsDNA), num processo denominado de hibridização. Este sinal pode ser detectado por meio de intercaladores como brometo de etídio, azul de metileno dentre outros compostos a base de cobalto e rutênio, para redução dos potenciais de oxidação⁷⁹⁻⁸³.
- ❖ **Imunossensores:** baseiam-se no uso de um anticorpo que reage especificamente com uma substância (antígeno) a ser testada. A imobilização do receptor (i.e., antígeno) sobre um substrato é conveniente para aplicações de reconhecimento bio-molecular para detecção da molécula alvo (i.e, anticorpo) presente na solução. A especificidade

da interação antígeno-anticorpo permite o desenvolvimento de imunossensores para diagnósticos clínicos, monitoramento ambiental, dentre outros⁵⁷.

Contudo, as inúmeras possibilidades de configurações e a alta seletividade e sensibilidade destes dispositivos conferem grande versatilidade no seu desenvolvimento, que podem ter aplicações diversas, dependendo das características do elemento biológico e do transdutor utilizado. Tais dispositivos são importantes ferramentas analíticas, devido ao crescimento no interesse em detecção, diagnóstico e determinação nas áreas de alimentos, controle da qualidade da água, saúde, segurança, e monitoramento ambiental⁸⁴. Em trabalho de revisão recente, Goulart e colaboradores⁸⁵ apresentaram comparações entre metodologias de detecção convencional e com os biossensores obtidos a partir de peptídeos sintéticos, imobilizados sobre a superfície de eletrodos de grafite modificados com filmes poliméricos. O potencial de aplicação foi verificado para três doenças utilizadas como modelo, sendo estas a dengue, a hanseníase e a leishmaniose.

Outros trabalhos do grupo LAFIP/NANOTEC que utilizam fragmentos específicos de DNA, como o trabalho para diagnóstico da Dengue⁵³, para o diagnóstico da hanseníase^{63,86}, e para diagnóstico do câncer de próstata⁸⁷, estão reportados na literatura e demonstram o potencial de aplicação destas biomoléculas quando imobilizadas sobre superfícies funcionalizadas com filmes poliméricos. Recentemente o grupo iniciou trabalhos e estudos relacionados à construção de imunossensores eletroquímicos, e o primeiro consiste no desenvolvimento de imunossensor impedimétrico para detecção de leishmaniose visceral.

Baseado nos trabalhos já realizados pelo grupo destacou-se, no presente trabalho, a construção de um imunossensor amperométrico livre de marcação para o diagnóstico de leishmaniose visceral sobre eletrodo de grafite modificado com filme polimérico derivado do ácido 4-HFA.

1.4 – Imunossensores

Imunossensores são biossensores baseados na reação imunológica de um antígeno (Ag) com o anticorpo (Ac), formando o correspondente complexo antígeno-anticorpo⁸⁸. Quando o antígeno ou anticorpo é imobilizado na superfície do eletrodo, dependendo do tipo de resposta de transdução do sinal, a construção de diversos tipos de dispositivos pode ser obtida^{89,90}. Os principais transdutores empregados são os eletroquímicos (amperométricos, potenciométricos e condutimétricos), ópticos (onda evanescente, ressonância superficial de plasma e espectroscopia de interferência reflectométrica) e piezoelétricos (microbalança eletroquímica de cristal de quartzo)⁶⁰. A especificidade da interação antígeno-anticorpo, bem como, o potencial de modificação (inserção de diferentes marcadores para utilização de diferentes transdutores) apresentado principalmente pelos anticorpos, permite o desenvolvimento de imunossensores para diagnósticos clínicos, monitoramento ambiental, dentre outros⁵⁷.

Os anticorpos pertencem à família das glicoproteínas denominada imunoglobulinas (Ig) e são produzidos pelos animais em resposta à presença de substâncias estranhas denominadas imunógenos ou antígenos e funcionam como receptor para os antígenos. Estes possuem estruturas químicas que favorecem a complementaridade com o anticorpo através de ligações não-covalentes. A maneira mais simples e direta dos anticorpos protegerem o hospedeiro contra agentes patogênicos ou seus produtos tóxicos é através da neutralização. Nesse mecanismo o anticorpo se liga ao patógeno (ou toxina) bloqueando o acesso destes as células. Em seguida, o patógeno neutralizado é fagocitado por macrófagos. Esse mecanismo é importante, por exemplo, contra patógenos como os vírus que, ao serem neutralizados pelos anticorpos, são impedidos de penetrar nas células e replicarem.

Um anticorpo pode ligar-se a um antígeno que não seja o de melhor complementaridade através de ligações mais fracas formadas por meio de reações cruzadas. Essas ligações não específicas podem, em sua grande maioria, ser eliminadas durante a construção do imunossensor com a lavagem da superfície.

A Figura 7 apresenta a estrutura básica de um anticorpo e sua especificidade com determinado antígeno.

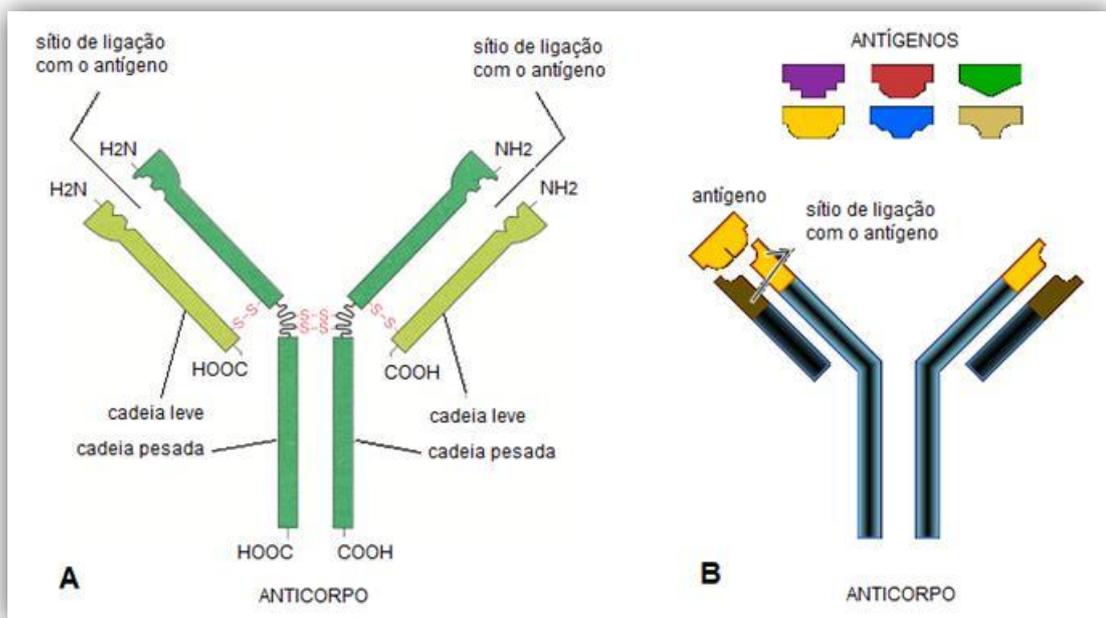
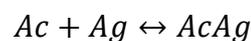


Figura 7: Representação esquemática de: (A) estrutura básica de uma imunoglobulina do tipo G. Fab = fragmento que contém o sítio de ligação com o antígeno (papaína), determinante do anticorpo; a parte terminal desse fragmento realiza o reconhecimento e permite acoplamento com o antígeno. Fc = fração constante da cadeia pesada, cuja função específica é a regulação da imunoresposta frente ao hospedeiro⁶⁰. (B) formação do complexo antígeno-anticorpo em região específica.

Em um imunoenensaio, o anticorpo combina-se especificamente com o correspondente antígeno ou hapteno (substância de baixo peso molecular que por si não é imunogênica, mas pode se ligar ao anticorpo específico), formando um complexo, conforme a equação:



Essa interação é caracterizada pela constante de afinidade, K_a , definida pelas concentrações do complexo (Ag-Ac), do antígeno livre (Ag) e dos sítios livres dos anticorpos (Ac) no equilíbrio, de acordo com a equação:

$$K_a = \frac{[AgAb]}{[Ac][Ag]}$$

Os valores das constantes de afinidade entre 10^4 e $10^{12} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ resultam na alta sensibilidade dos imunoenensaio. Embora estudos para a determinação das constantes tenham

sido realizados, para determinação do anticorpo, antígeno ou hapteno, freqüentemente, o valor da constante não é diretamente empregado. Sob o ponto de vista analítico, a formação do complexo pode ser monitorada pelo método direto (sem qualquer marcador), porém grande parte dos imunoenaios lança mão de marcadores (método indireto). Tanto o antígeno quanto o anticorpo podem ser marcados e, então, são denominados conjugados⁸⁸. Os primeiros imunoenaios empregavam marcadores radioativos, mas a restrição quanto ao emprego de radioisótopos conduziu ao desenvolvimento de ensaios com compostos fluorescentes ou enzimas, sendo o ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), o mais amplamente utilizado em análises clínicas e biológicas.

Contudo, o desenvolvimento de imunossensores, sobre tudo os eletroquímicos, tem representado uma importante estratégia para a detecção simples, rápida e descentralizada da formação do complexo AcAg. Duas grandes classes destes dispositivos se destacam os imunossensores amperométricos, nos quais enzimas são empregadas como marcadores, e os imunossensores impedimétricos, nos quais são realizadas medidas diretas das propriedades elétricas da superfície. No presente trabalho utilizou-se a detecção amperométrica para detecção do anticorpo específico para Leishmaniose Visceral, porém, com anticorpo livre de marcação.

1.5 – Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença crônica, de manifestação cutânea ou visceral, causada por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, da família dos *Trypanosomatidae*. Há cerca de 30 espécies patogênicas para o ser humano conhecidas atualmente. As *leishmania* são protozoários parasitas de células fagocitárias de mamíferos, especialmente de macrófagos. São capazes de resistir à destruição após a fagocitose⁹¹. As formas promastigotas (Figura 8-A) são alongadas e possuem um flagelo locomotor anterior que utilizam nas fases extracelulares do seu ciclo de vida, e esta é a forma infecciosa do protozoário. O amastigota (Figura 8-B) não tem flagelo e corresponde à forma intracelular do protozoário responsável pela sua multiplicação. A principal forma de transmissão do parasita para o homem e outros hospedeiros mamíferos é através da picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, subfamília Phebotominae, conhecidos genericamente por flebotomíneos. A *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* é a principal espécie transmissora de leishmaniose no

Brasil (Figura 8-C)⁹². O calazar ou leishmaniose visceral (LV) e a úlcera de Bauru ou leishmaniose tegumentar americana (LTA) são as formas da doença.

Leishmaniose tegumentar ou cutânea (Figura 8-E) é a forma mais comum de leishmaniose e é caracterizada se por formar úlceras cutâneas (raramente múltiplas), expansivas e persistentes, freqüentemente acompanhadas de lesões graves da nasofaringe, podendo também afetar nariz, boca e garganta⁹². Sua forma mais agressiva é denominada leishmaniose mucocutânea (LM) ou ferida brava (Figura 8-F). Muitas espécies de *Leishmania* são responsáveis pela manifestação desta forma da doença em todo o mundo. No Norte de África, Médio Oriente e Ásia Central destaca-se a *Leishmania major*, cujos principais hospedeiros são roedores. Na Etiópia e no Quênia a *Leishmania aethiopica* é a principal espécie do protozoário, e o *Hyrax* (espécie de roedor) é o principal hospedeiro. A *L. tropica* existe em países da costa Sul e Leste do Mediterrâneo e no Médio Oriente, e os humanos são os principais hospedeiros. A *Leishmania mexicana* encontra-se no México, na Guatemala e Belize, e os hospedeiros são os roedores e marsupiais. No Brasil e nos demais países da América do Sul a *Leishmania amazonensis*, *brasiliensis* e *peruviana* são as espécies causadoras da doença, e os cães, gambás e roedores são os hospedeiros⁹².

A Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como calazar e febre negra, é a forma mais severa de leishmaniose. Os órgãos viscerais (fígado, baço e medula óssea) são diretamente afetados pelo parasita (Figuras 8-G e 8-H), daí a sua denominação. A LV é uma doença crônica grave, potencialmente fatal para o homem, cuja letalidade pode alcançar 10% quando não se institui o tratamento adequado, também por isso, é a segunda maior assassina parasitária no mundo, depois da malária, responsável por uma estimativa de 60.000 que morrem da doença a cada ano entre milhões de infecções mundiais⁹². *Leishmania donovani*, *infantum infantum* e *infantum chagasi* são as três espécies de *Leishmania* responsáveis pela manifestação desta forma da doença em todo o mundo. A *L. donovani* é a mais freqüente causa de leishmaniose visceral e existe no subcontinente indiano e na África equatorial (rara em Angola e Moçambique). A *L. infantum infantum* provoca uma variante menos grave da leishmaniose visceral e existe na região mediterrânica, incluindo países do Norte de África, Turquia, Israel, Grécia, Itália, sul da França, Portugal e Espanha e ainda nos Balcãs, Irão, algumas regiões da China e Ásia central. Seu reservatório são os cães, lobos, raposas e os próprios seres humanos. A *L. infantum chagasi* é considerada uma subespécie de *L. infantum* que existe no Brasil e demais países da América Latina, e os hospedeiros são cães e gambás⁹².



Figura 8: (A) Protozoário *Leishmania* na forma promastigota (infecciosa); (B) Protozoário *Leishmania* na forma amastigota (intracelular); (C) Flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, popularmente conhecido como “mosquito palha” ou “birigui”, principal espécie transmissora de *L. chagasi* no Brasil; (D) Cão com LV apresentando severa perda de massa muscular; (E) Úlceras características de pessoas com LTA; (F) Úlceras características de pacientes com LM, forma mais agressiva da LTA; (G) Criança com hepatoesplenomegalia (aumento do abdômen ocasionado pelo inchaço do fígado e do baço) característico de pacientes com LV; (H) Fígado e baço com tamanho fora do normal característico de pacientes com LV.

Atualmente, a LV é endêmica em 62 países, com um total estimado de 200 milhões de pessoas sob risco de adquirirem a infecção⁹³. Aproximadamente 90% dos casos ocorrem em cinco países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil⁹⁴.

No Brasil os estudos sobre essa doença tiveram início no século XX com o médico paraense Gaspar Viana após a descrição, em 1913, do primeiro caso de necropsia de um

paciente oriundo de Boa Esperança, Mato Grosso. Em 1934, 41 casos foram identificados em lâminas de viscerotomias praticadas post-mortem, em indivíduos oriundos das Regiões Norte e Nordeste⁹¹. Em 1954, o médico sanitarista Thomaz Corrêa Aragão identificou os cães e as raposas como os principais hospedeiros do parasita. A doença, desde então, vem sendo descrita em vários municípios brasileiros, apresentando mudanças importantes no padrão de transmissão, inicialmente predominando em ambientes silvestres e rurais e mais recentemente em centros urbanos. De 2000 a 2009 foram registrados 34.583 casos de LV no país, com média anual de 3.458 casos confirmados. Nesse mesmo período, ocorreram 1.771 óbitos por LV, representado por uma letalidade de 5,1%⁹¹. No ambiente doméstico, o cão é considerado um importante hospedeiro e fonte de infecção para os vetores (Figura 1-D), sendo um dos alvos nas estratégias de controle⁹⁵. O agente etiológico é a *L. chagasi*, espécie semelhante à *L. infantum*⁹³. Atualmente sabe-se que a LV clássica acomete pessoas de todas as idades, mas na maior parte das áreas endêmicas do Brasil, 80% dos casos registrados ocorrem em crianças com menos de 10 anos. A Tabela 4 mostra os dados do Ministério da Saúde referentes ao número de casos confirmados e notificados de leishmaniose no Brasil no período de 2007 a 2010.

O ministério da saúde informou um total de 4 óbitos por LTA em 2010, sendo um no Tocantins e 3 em Minas Gerais. Para a LV foram 8 óbitos, sendo 5 no nordeste (um no Maranhão e no Piauí e 3 no Ceará) e 1 em Tocantins, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul. Em Uberlândia/MG foram notificados 15 casos de LV e 21 de LTA no período de 2007 a 2010, sendo 3 para cada tipo da doença em 2010, e nenhuma morte foi notificada até janeiro de 2011 segundo informações do SINAN/NET.

Dye & Willians⁹⁶, baseados em dados de áreas endêmicas do Brasil, concluíram que crianças são mais susceptíveis à leishmaniose visceral quando são mais jovens e mais desnutridas, porém permanece desconhecida se a imunidade à leishmaniose visceral adquirida com a idade é sempre adquirida com resultado de infecção.

Loureiro e colaboradores⁹⁷ analisaram, através de revisão da literatura, os diferentes exames diagnósticos utilizados nas formas cutânea, cutâneo mucosa e cutâneo difusa da leishmaniose, discutindo sua metodologia e indicação no curso evolutivo desta doença endêmica em muitas áreas do Brasil.

Tabela 4: Casos confirmados de Leishmaniose Tegumentar Americana e Visceral no Brasil de 2007 a 2010 ⁹².

| UF Notificação | Leishmaniose Tegumentar Americana | | | | | Leishmaniose Visceral | | | | |
|----------------------------|-----------------------------------|-----------|------------|--------------|--------------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | Total | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | Total |
| <i>Rondônia</i> | - | 1 | 13 | 428 | 442 | 3 | - | - | - | 3 |
| <i>Acre</i> | - | 3 | 40 | 523 | 568 | - | - | - | - | - |
| <i>Amazonas</i> | - | - | 27 | 757 | 785 | 1 | 4 | 3 | 1 | 9 |
| <i>Roraima</i> | - | - | 13 | 562 | 576 | 2 | 2 | 6 | 7 | 17 |
| <i>Para</i> | - | - | 100 | 854 | 956 | 370 | 366 | 301 | 64 | 1101 |
| <i>Amapá</i> | - | - | 8 | 258 | 267 | 1 | 1 | - | - | 2 |
| <i>Tocantins</i> | 1 | 2 | 79 | 285 | 372 | 424 | 488 | 464 | 229 | 1605 |
| <i>Maranhão</i> | - | 2 | 90 | 803 | 902 | 301 | 404 | 370 | 137 | 1212 |
| <i>Piauí</i> | - | - | 4 | 21 | 25 | 363 | 452 | 267 | 20 | 1102 |
| <i>Ceara</i> | - | - | 39 | 427 | 466 | 550 | 556 | 677 | 274 | 2057 |
| <i>Rio Grande do Norte</i> | - | - | 3 | 77 | 80 | 71 | 93 | 96 | 42 | 302 |
| <i>Paraíba</i> | - | - | 11 | 61 | 72 | 25 | 41 | 21 | 18 | 105 |
| <i>Pernambuco</i> | - | - | 9 | 246 | 255 | 76 | 85 | 83 | 31 | 275 |
| <i>Alagoas</i> | - | - | 4 | 6 | 10 | 32 | 25 | 31 | 16 | 104 |
| <i>Sergipe</i> | - | - | 2 | 2 | 4 | 75 | 40 | 45 | 41 | 201 |
| <i>Bahia</i> | 1 | 4 | 109 | 2892 | 3012 | 233 | 197 | 349 | 188 | 967 |
| <i>Minas Gerais</i> | 1 | 1 | 77 | 795 | 876 | 423 | 526 | 579 | 262 | 1790 |
| <i>Espírito Santo</i> | - | - | 8 | 44 | 52 | - | 3 | 8 | 2 | 13 |
| <i>Rio de Janeiro</i> | - | - | 6 | 48 | 55 | 3 | - | 6 | 1 | 10 |
| <i>São Paulo</i> | - | - | 30 | 152 | 186 | 264 | 307 | 231 | 111 | 913 |
| <i>Paraná</i> | - | 4 | 10 | 119 | 133 | 3 | 3 | 1 | 5 | 12 |
| <i>Santa Catarina</i> | 1 | - | 2 | 4 | 7 | 1 | 1 | - | - | 2 |
| <i>Rio Grande do Sul</i> | - | - | 1 | 1 | 2 | - | - | 9 | - | 9 |
| <i>Mato Grosso do Sul</i> | - | - | 2 | 51 | 53 | 234 | 252 | 195 | 108 | 789 |
| <i>Mato Grosso</i> | - | - | 112 | 1142 | 1257 | 31 | 55 | 68 | 33 | 187 |
| <i>Goiás</i> | - | - | 13 | 266 | 280 | 19 | 28 | 23 | 14 | 84 |
| <i>Distrito Federal</i> | - | - | 7 | 22 | 29 | 57 | 61 | 59 | 26 | 203 |
| Total | 4 | 17 | 819 | 10846 | 11722 | 3562 | 3990 | 3892 | 1630 | 13074 |

Segundo Gontijo e Melo⁹⁵, diferentes técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico de leishmaniose visceral humana e canina. Muitos avanços têm ocorrido nos últimos anos, mas a despeito do grande número de testes disponíveis para o diagnóstico da LV, nenhum apresenta 100% de sensibilidade e especificidade.

As dificuldades encontradas no diagnóstico dessa doença justificam sua maior incidência em regiões mais pobres onde o acesso a métodos avançados para diagnósticos clínicos é bastante limitado. Segundo Dourado e colaboradores⁹⁸ em áreas endêmicas, afastadas dos grandes centros, há carência de profissionais para a realização do diagnóstico da LV e muitas vezes são aplicados apenas critérios básicos como características clínicas e aspectos epidemiológicos.

O diagnóstico clínico é complexo, pois a doença no homem pode apresentar sinais e sintomas que são comuns a outras patologias presentes nas áreas onde incide a LV, como, por exemplo, Doença de Chagas, Malária, Esquistossomose, Febre Tifóide e Tuberculose. Com isso o diagnóstico laboratorial torna-se o único responsável pelo diagnóstico da doença. No Brasil, os testes mais utilizados no diagnóstico de LV humana e canina são a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), sendo considerados, sobretudo este último, testes de escolha para inquéritos populacionais. A RIFI apresenta baixa especificidade, exige na sua execução, pessoal treinado por ser uma reação dispendiosa e ainda não está adaptada para estudos epidemiológicos em larga escala. Uma das principais limitações da técnica é a ocorrência de reações cruzadas com leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar⁹⁹. O teste de ELISA é o mais utilizado para imunodiagnóstico de leishmaniose visceral. É um teste rápido de fácil execução e leitura, sendo um pouco mais sensível e um pouco menos específico que a RIFI. O teste é sensível, permitindo a detecção de baixos títulos de anticorpos, mas é pouco preciso na detecção de casos subclínicos ou assintomáticos¹⁰⁰.

A escolha do antígeno é importante porque o uso de antígenos bruto ou de todo parasitas, muitas vezes resulta em uma baixa especificidade na detecção de doença de anticorpos anti-*Leishmania* específicos¹⁰¹. Nos últimos anos, vários antígenos de *Leishmania* foram caracterizados, a fim de melhorar o potencial de vacinas e métodos de diagnóstico da doença. A proteína recombinante rK39 contém uma repetição de 39 aminoácidos (Figura 9) que é parte de uma proteína predominante na *Leishmania chagasi* amastigotas. Os doentes com LV apresentam elevados níveis de anticorpos para rk39 e têm sido utilizados em vários formatos de imunoensaio¹⁰²⁻¹¹¹.

Leu Glu Gln Gln Leu Arg Asp Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu
Ala Thr Ala Ala Ala Lys Met Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Thr

Figura 9: Sequência de aminoácidos responsável pela formação da proteína recombinante rK39 (antígeno específico para LV).

O SUS oferece tratamento específico e gratuito para a doença. O tratamento é feito com uso de medicamentos específicos a base de antimônio, repouso e uma boa alimentação. A droga de primeira escolha para tratamento de casos de LV é o antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a dose do Glucantime® deve ser calculada em $\text{mg/Sb}^{+5}/\text{Kg}/\text{dia}$. O esquema de tratamento é de 20 $\text{mg/Sb}^{+5}/\text{Kg}/\text{dia}$ por um período de 20 a 30 dias. Para as gestantes e pacientes que tenham contra-indicação ou que tenham apresentado toxicidade ou refratariedade ao uso dos antimoniais pentavalentes, a droga de escolha é a anfotericina B, na dose de 1 $\text{mg}/\text{Kg}/\text{dia}$ por um período de 14 a 20 dias consecutivo, não ultrapassando a dose diária de 50mg. No caso de pacientes com mais de 50 anos de idade, transplantados renais, cardíacos e hepáticos, sugere-se a anfotericina B lipossomal, na dose de 3 $\text{mg}/\text{kg}/\text{dia}$, durante 7 dias, ou 4 $\text{mg}/\text{kg}/\text{dia}$, durante 5 dias.

É importante ressaltar que quanto antes for diagnosticado a doença maior a possibilidade de recuperação e cura. Isso justifica a constante busca por novos formatos de imunoensaios, bem como, de novos dispositivos que possam viabilizar o diagnóstico e, conseqüentemente, o tratamento da doença. Desta forma, melhores estratégias de prevenção poderão ser criadas na busca por uma redução no número de casos confirmados e, principalmente, no número de óbitos ocasionados pela doença no Brasil e no mundo.



OBJETIVOS

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Caracterizar poli(ácido 4-hidroxifenilacético) - *poli(4-HFA)*, obtido eletroquimicamente em eletrodo de grafite (EG), e desenvolver um sistema para detecção amperométrica de Leishmaniose Visceral (LV) utilizando EG modificado com poli(4-HFA) - EG/poli(4-HFA), como matriz suporte.

2.2 – Objetivos Específicos

- ❖ Estudar o crescimento do poli(4-HFA) em (EG) de acordo com o números de varreduras potenciais;
- ❖ Avaliar o comportamento eletroquímico do poli(4-HFA) em soluções contendo pares redox aniônicos e catiônicos;
- ❖ Desenvolver técnicas de extração do poli(4-HFA) para estudos de caracterização estrutural;
- ❖ Caracterizar a estabilidade térmica do poli(4-HFA) por meio da técnica de Análise Termogravimétrica – TGA;
- ❖ Caracterizar a estrutura do poli(4-HFA) por meio das técnicas de Espectroscopia de Infravermelho (IR), Espectroscopia de UV visível (UV-vis) e Fluorescência;
- ❖ Imobilizar o antígeno rK39 em EG modificado com poli(4-HFA);
- ❖ Detectar a formação do complexo Ag-Ac através da técnica de Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) utilizando-se o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* (CBBG-250) como indicador;
- ❖ Detectar a formação do complexo Ag-Ac através da técnica de VPD utilizando-se *Cloreto de Hexaaminrutênio II* como indicador;
- ❖ Analisar o desempenho do imunossensor (sensibilidade, limite de detecção e seletividade) frente ao analito alvo.

The background is a solid dark blue. On the right side, there are intricate, glowing white patterns that resemble smoke or light trails, swirling and overlapping. The word "EXPERIMENTAL" is written in a black, handwritten-style font across the middle of the image.

EXPERIMENTAL

3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 - Materiais e Soluções

As soluções estoque utilizadas nos estudos foram preparadas em água milli-Q, com resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, conforme descrito abaixo.

- ❖ *Solução de Ácido Perclórico ($0,50 \text{ mol dm}^{-3}$):* pipetou-se $43,20 \text{ cm}^3$ de HClO_4 concentrado (Merck, 98%) e o volume foi transferido para um balão volumétrico de $1,0 \text{ dm}^3$ sendo completado com água deionizada.
- ❖ *Solução de ferrocianeto/ferricianeto de potássio ($5,00 \text{ mmol dm}^{-3}$; contendo $0,10 \text{ mol.dm}^{-3}$ de KCl):* pesou-se $0,1646 \text{ g}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Reagen, 99%) ; $0,2112 \text{ g}$ de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Vetec, 99%) e $0,7456 \text{ g}$ de KCl (Vetec, 99%). As massas foram transferidas para um balão volumétrico de $100,0 \text{ cm}^3$ e o volume completado com água deionizada.
- ❖ *Solução de cloreto de hexaaminrutênio II ($5,00 \text{ mmol.dm}^{-3}$; contendo $0,10 \text{ mol.dm}^{-3}$ de KCl):* pesou-se $0,0343 \text{ g}$ de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$ (Aldrich, 99,9%) e $0,1864 \text{ g}$ de KCl (Vetec, 99%). As massas foram transferidas para um balão de $25,0 \text{ cm}^3$ e o volume completado com água deionizada.
- ❖ *Solução Tampão Tris-HCl - TBS (50 mmol dm^{-3} de Tris-HCl; pH 7,50, contendo 150 mmol dm^{-3} de NaCl):* pesou-se $3,9410 \text{ g}$ de Tris-HCl (Ultra pure, 99%) e $4,3830 \text{ g}$ de NaCl (Vetec, 99%). As massas foram transferidas para um balão volumétrico de $500,0 \text{ cm}^3$, antes de completar o volume, o pH foi ajustado para o valor de 7,50 com solução de NaOH $0,10 \text{ mol.dm}^{-3}$.
- ❖ *Solução de Coomassie Brilliant Blue G-250 ($5,00 \text{ mmol dm}^{-3}$ em solução tampão TBS):* pesou-se $0,04270 \text{ g}$ de CBBG-250. A massa foi transferida para um balão de $10,0 \text{ cm}^3$ e o volume completado com água deionizada.
- ❖ *Solução de BSA 0,5 %:* pesou-se $0,0500 \text{ g}$ de albumina de soro bovino - BSA (Gold Lab), transferiu-se para um balão volumétrico de $10,0 \text{ cm}^3$, sendo o volume ajustado com solução tampão TBS.

- ❖ *Solução de rK39 (6,67 ng mL⁻¹):* as amostras do antígeno rK39 foi preparada a partir de diluições da solução estoque fornecidas pelo Laboratório de Nanobiotecnologia - INGEB/UFU. Desta forma, da amostra dosada como 2,00 µg.mL⁻¹, pipetou-se 0,5 mL e completou-se com solução tampão TBS para o volume final de 150 mL.
- ❖ *Solução de IgG+ (66,7 ng mL⁻¹) :* as amostras do anticorpo IgG+ (Visceral) foi preparada a partir da diluição da solução estoque fornecidas pelo Laboratório de Nanobiotecnologia - INGEB/UFU, contendo 11,8 µg.mL⁻¹. Assim, pipetou-se 0,5 mL do anticorpo positivo para LV, e completou-se com solução tampão TBS para o volume final de 150 mL.
- ❖ *Solução de IgG- (66,7 ng mL⁻¹) :* as amostras do anticorpo IgG- (controle negativo) foi preparada a partir da diluição da solução estoque fornecidas pelo Laboratório de Nanobiotecnologia - INGEB/UFU, contendo 6,87 µg.mL⁻¹. Assim, pipetou-se 1,5 mL do anticorpo negativo para LV, e completou-se com solução tampão TBS para o volume final de 150 mL.

3.2 - ESTUDOS DO ÁCIDO POLI(4-HFA)

3.2.1 - CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

Os estudos eletroquímicos do ácido poli(4-HFA) foram conduzidos em célula eletroquímica de três compartimentos (Figura 10-A), sendo os eletrodos de grafite (Figura 10-B), eletrodos de Ag/AgCl em KCl 3,00 mol dm⁻³ e placa de platina com área 1,0 cm² (Figura 10-C), utilizados como eletrodos de trabalho, referência e auxiliar, respectivamente. Os potenciostatos utilizados foram CH Instruments modelo 760C, e EcoChemie modelo 302N com módulo FRA2 (Figura 10-D). A técnica eletroquímica utilizada nesses estudos foi a Voltametria Cíclica (VC).

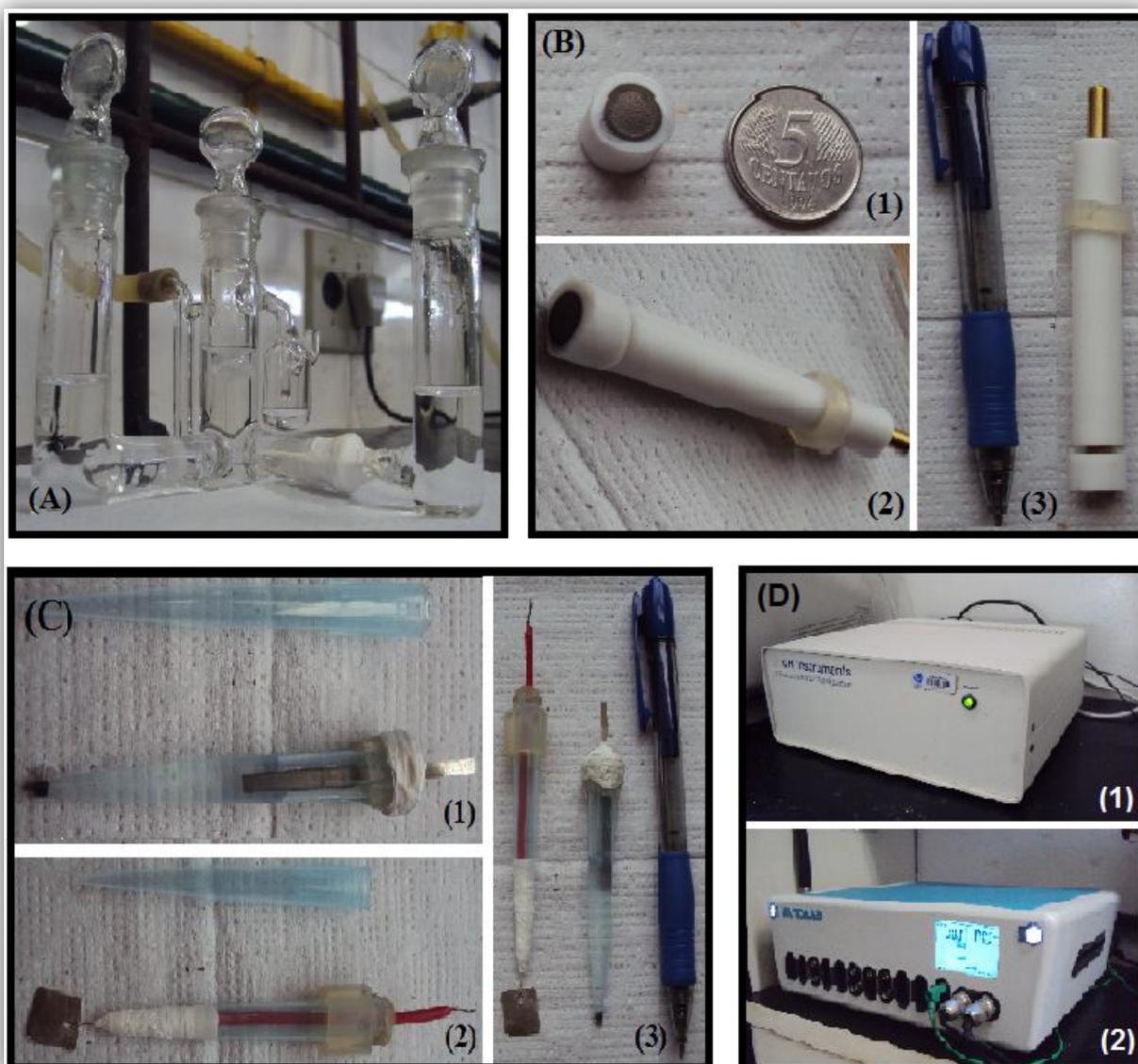


Figura 10: (A) Célula eletroquímica de três compartimentos; (B) Eletrodo de trabalho, sendo (1) dimensão do EG comparada a de uma moeda, (2) EG conectado ao suporte para análise eletroquímica, e (3) dimensão do suporte comparado a uma caneta esferográfica comum; (C) Eletrodos de (1) referência e (2) auxiliar ou contra-eleto, e (3) dimensão comparada a uma caneta esferográfica comum; (D) Potenciostatos utilizados, sendo (1) CH Instruments modelo 760C, e (2) EcoChemie modelo 302N com módulo GPES.

De todos os métodos disponíveis para estudar os processos eletroquímicos, os métodos de varrimento potencial, como a VC, são os mais usados. Estes métodos consistem na

aplicação, ao eletrodo de trabalho, de um potencial que varia continuamente com o tempo, o que conduz à ocorrência de reações de oxidação e/ou de redução de espécies eletroativas na solução (reações faradaicas), possivelmente à adsorção de espécies de acordo com o potencial, e a uma corrente capacitiva devida à carga da dupla camada elétrica¹¹². A corrente observada é, portanto, diferente da corrente no estado estacionário. A sua principal utilização tem sido para diagnosticar mecanismos de reações eletroquímicas, para a identificação de espécies presentes em solução e para a análise semiquantitativa de velocidade de reações¹¹². Essas técnicas tem se tornado importantes ferramentas para eletrossíntese de novos materiais devido, principalmente, a possibilidade de espécies eletroativas serem adsorvidas na superfície do eletrodo de trabalho.

A eletrossíntese do ácido poli(4-HFA) foi feita utilizando-se a VC como técnica eletroquímica suporte⁵¹. Nesta técnica o varrimento de potencial é feito em duas direções (Figura A-1). Primeiramente o varrimento é feito apenas numa direção, parando num valor escolhido, E_f , por exemplo, para $t=t_1$. Em seguida a direção de varrimento é invertida e variada até E_{min} , e depois invertida e variada até E_{max} . Os parâmetros importantes são: o potencial inicial, E_i ; a direção de varrimento inicial; a velocidade de varrimento, v ; o potencial máximo, E_{max} ; o potencial mínimo, E_{min} ; e, o potencial final, E_f .

Uma corrente faradaica, I_f , devido à reação no eletrodo, é registrada na zona relevante de potencial onde ocorre a reação. Há também uma contribuição capacitiva: ao varrer o potencial, a carga da dupla camada varia; esta contribuição aumenta com o aumento da velocidade de varrimento. A corrente total é:

$$I = I_c + I_f = C_d \frac{dE}{dt} + I_f = vC_d + I_f. \quad \text{Equação 1}^{112}$$

Assim, $I_c \propto v$ e $I_f \propto v^{1/2}$. Isso significa que, para velocidades de varrimento muito elevadas, a corrente capacitiva deve ser subtraída de modo a obter valores exatos das correntes de velocidade.

Dentre os aspectos mais importantes dos voltamogramas cíclicos (corrente *versus* potencial), os mais abordados neste trabalho foram a reversibilidade dos sistemas, o deslocamento das correntes de pico catódica ($I_{p,c}$) e anódica ($I_{p,a}$), bem como, dos potenciais de pico catódico (E_{pc}) e anódico (E_{pa}), e a adsorção de espécies eletroativas na superfície do eletrodo de trabalho¹¹².

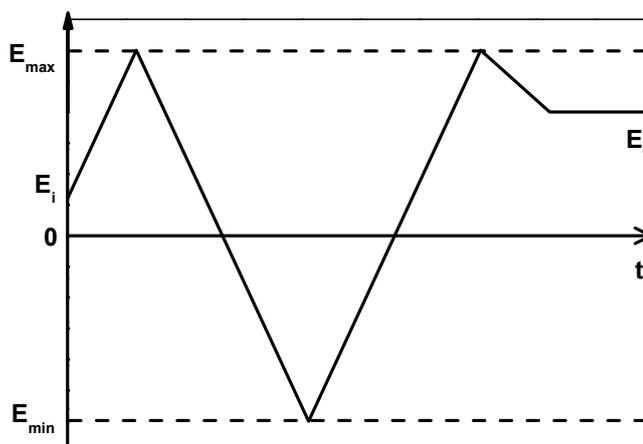


Figura 11: Variação do potencial aplicado com o tempo em VC, mostrando o potencial inicial, E_i , o potencial final, E_f , os potencial máximo, E_{max} , e mínimo, E_{min} . A velocidade de varrimento $|dE/dt| = v$ ¹¹².

Numa reação reversível, os picos de corrente catódica e anódica são aproximadamente iguais em valores absolutos, mas com sinais opostos. Desde modo para uma reação reversível, a diferença entre os potenciais de pico ΔE_p é descrita por:

$$\Delta E_p = |E_{pa} - E_{pc}| = \frac{59 \text{ mV}}{n} \quad \text{Equação 2}^{112}$$

onde n é o numero de elétrons envolvidos na semi-reação.

A irreversibilidade causada por cinéticas lentas de transferência de elétrons resulta em valores de ΔE_p que excedem os valores previstos, ou seja, maiores que $60 \text{ mV}/n$. Contudo, na prática os valores de ΔE de até 100 mV são considerados para reações reversíveis¹¹².

Para uma reação reversível, ou seja, uma reação que ocorre com velocidade suficientemente alta para estabelecer um equilíbrio dinâmico de transferência de massa na interface, a etapa de transferência de massa irá governar a velocidade global do processo. A corrente do pico (em amperes) neste caso é dada pela equação de Randles-Sevcik¹¹³:

$$I_{p,a} = 2,686 \times 10^5 n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad \text{Equação 3}^{112}$$

onde n é o número de elétrons envolvidos no processo, A é a área do eletrodo (cm^2), D é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) e C é a concentração da espécie em solução (mol dm^{-3}) e v é a velocidade de varredura (V s^{-1}). De acordo com essa equação, para as reações reversíveis a corrente de pico deve variar linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura.

Quanto ao deslocamento nos potenciais e nas correntes de pico, estes são ocasionados devido ao aumento da resistência entre o eletrodo de trabalho e o de referência. Quando a solução entre estes eletrodos não é alterada, então, a adsorção de espécies eletroativas na superfície do eletrodo de trabalho é responsável por esse aumento na resistência que, neste caso, conduz a um alargamento dos picos, uma maior separação entre $E_{p,a}$ e $E_{p,c}$, e a uma diminuição nas correntes de pico. Essas alterações são tão maiores quando menor for a eletroatividade da substância adsorvida.

3.2.1.1 – Preparação e construção dos eletrodos

Os discos de grafite foram obtidos a partir de cortes, feitos com micro-retífica, em barras de grafite (100 x 0,6 mm; 99,9999% de pureza) da Alfa Aesar, e utilizados para construção dos eletrodos de trabalho. A espessura dos discos de grafite obtidos foi de 1 a 2 mm, com área geométrica nominal da superfície de, aproximadamente, $29,7 \text{ mm}^2$. Posteriormente, o grafite foi colado, com cola de prata 24 h, a uma base de latão e, em seguida, encaixado a uma base de teflon. Os espaços vazios entre o teflon e o eletrodo foram preenchidos com cola Araldite® 24 h após o tempo de cura da cola de prata. A superfície dos eletrodos foi lixada com lixa d'água 200 e 1200 (Marca 3M) para remoção do excesso de Araldite® e polimento, respectivamente, após o tempo de cura da cola Araldite®. O polimento final foi realizado com suspensão aquosa de alumina $0.30 \mu\text{m}$ (Micropolish A, Buehler) sobre feltro e, em seguida, foram limpos em água com ultrassom por 10 min., enxaguados com água destilada em abundância e secos com N_2 ultra puro. Finalmente estes eletrodos de grafite foram conectados ao suporte de base para utilização. Após a utilização os eletrodos foram desmontados e para reinício do processo de construção.

Para construção dos eletrodos de referência (Ag/AgCl em KCl $3,00 \text{ mol dm}^{-3}$), primeiramente foi feita a deposição eletroquímica de AgCl , em cerca de 2 cm de uma fita de prata (5 cm). Cerca de 10 mL de solução de HCl $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ foram usados nesse

procedimento. Ponteiras de micropipetas, com capacidade para 1 mL (ponteira azul), foram preparadas para construção dos eletrodos. Esse procedimento consiste em tampar a extremidade menor dessas ponteiras com pedras semipermeáveis e, em seguida, preenche-las com solução de KCl $3,00 \text{ mol dm}^{-3}$. Finalmente, as fitas de prata contendo AgCl foram colocadas no interior dessas ponteiras, e, cerca de 1 cm, foi deixado na parte externa para posterior conexão com o potenciostato.

Placas de platina (área $1,0 \text{ cm}^2$) foram utilizadas para construção dos eletrodos auxiliares (contra-eletrodos). Um pequeno fio de platina foi fixado, através de furos de tamanho suficiente, a cada uma das placas utilizadas, em seguida, fios de cobre foram ligados aos de platina para garantir tamanho satisfatório ao eletrodo. Ponteiras de micropipetas, com capacidade para 1 mL (ponteira azul), foram utilizadas como revestimento desses eletrodos de modo a permitir maior robustez e, assim, facilitar o manuseio dos mesmos. Por fim, os eletrodos foram revestidos com teflon para garantir que apenas a platina mantivesse contato com a solução durante os experimentos.

3.2.1.2 - Condicionamento e Seleção dos Eletrodos de Trabalho

Os eletrodos de grafite foram avaliados utilizando-se solução aquosa do par redox $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $5,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ contendo KCl $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$ como eletrólito suporte. A escolha deste par redox se deve ao fato do mesmo apresentar comportamento eletroquímico muito bem conhecido e definido, sendo considerado, portanto, como um padrão eletroquímico⁶¹. Nesta avaliação todos os parâmetros da Equação 3 são constantes (concentração do par redox e concentração do eletrólito suporte). Neste caso, uma correlação entre as correntes de pico, bem como, entre os ΔE_p , pode ser diretamente relacionada à área eletroquímica efetiva dos eletrodos de grafite, e este foi o parâmetro utilizado para seleção dos eletrodos de grafite.

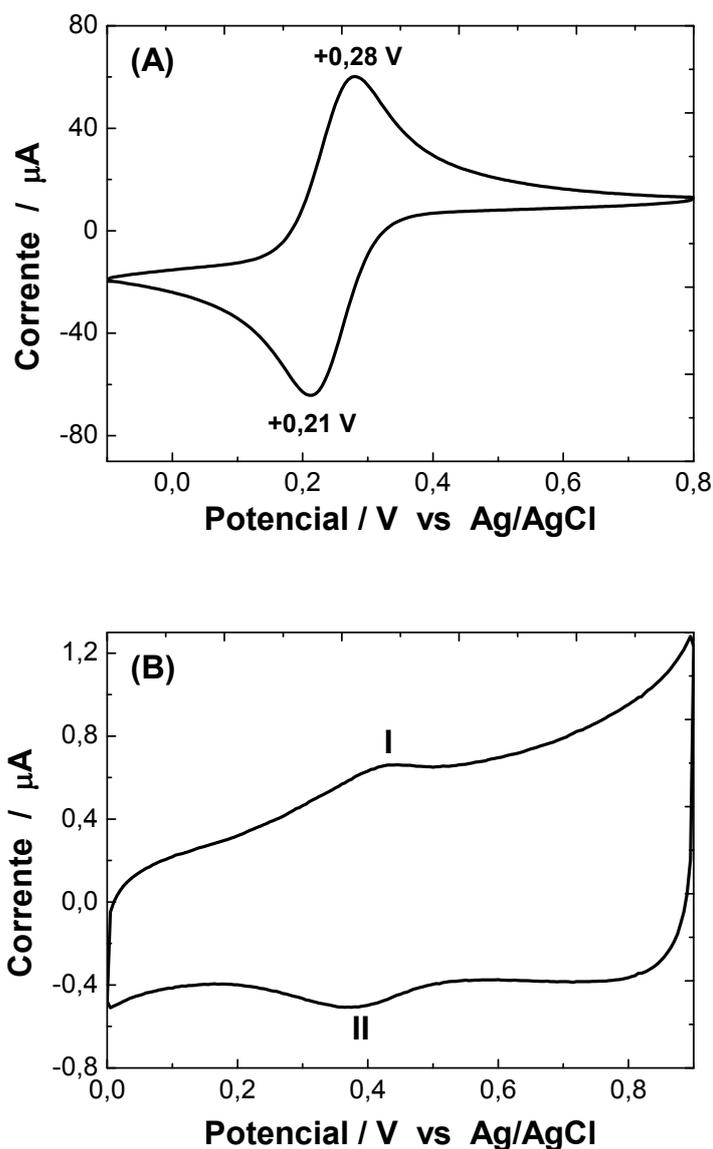


Figura 12: VC do eletrodo de grafite em: (A) solução 5,00 mmol dm⁻³ K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] contendo 0,10 mol dm⁻³ KCl e (B) solução HClO₄ 0,50 mol dm⁻³, sendo $V_a = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e $V_b = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

A Figura 12-A mostra o comportamento eletroquímico típico do par redox ferrocianeto/ferricianeto de potássio sobre os eletrodos de grafite. Observa-se um ΔE de 70 mV e uma relação de $I_{p,a}/I_{p,c}$ de 1,08, satisfazendo as condições do processo reversível. O perfil adequado para os eletrodos a serem utilizados foi definido como uma variação máxima de 10% destes dois parâmetros.

Com relação ao parâmetro de condicionamento, os eletrodos foram submetidos a sucessivos ciclos de varredura de potencial na região de +0,00 a +0,90 V, em solução de ácido perclórico (Figura 12-B) garantindo, assim, uma limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo para melhor utilização no processo de eletropolimerização. Foi verificado um valor de 177,83 μC na carga envolvida no processo. O perfil adequado para os eletrodos a serem utilizados, foi definido como uma variação máxima de 10% deste valor. O processo redox I e II destacado no gráfico indica a oxidação e a redução do EG, respectivamente.

3.2.1.3 – Eletropolimerização do ácido 4-HFA

A eletropolimerização do ácido 4-HFA foi feita utilizando-se VC como técnica eletroquímica. Foram realizados 100 ciclos de potencial, na faixa de -0,70 a +1,20 V, em solução aquosa de HClO_4 contendo ácido 4-HFA a $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. A velocidade de varredura foi de 50 mV s^{-1} . Para este procedimento utilizou-se célula eletroquímica de três compartimentos, com volume total de trabalho em cerca 25 mL. Após eletropolimerização, os eletrodos contendo os filmes poliméricos foram lavados com água em abundância, e secos sob fluxo de $\text{N}_{2(\text{g})}$ ultra puro. Posteriormente 10 ciclos de potencial foram realizados nas mesmas condições da eletropolimerização, porém, em solução contendo somente HClO_4 . Este procedimento garante melhor remoção de “*monômeros residuais*” que ficam adsorvidos na superfície dos EG/poli(4-HFA) após a lavagem.

3.2.1.4 – Influência de Pares Redox Catiônicos e Aniônicos sob a Resposta Eletroquímica do Poli(4-HFA)

As propriedades de troca de iônica foram investigadas pelo estudo da reação de transferência eletrônica nas superfícies modificadas com poli(4-HFA) utilizando-se solução de ferrocianeto/ferricianeto de potássio (Figura 13-A) e cloreto de hexaaminrutênio II (Figura 13-B) por serem complexos inorgânicos aniônicos e catiônicos, respectivamente. Medidas por VC foram conduzidas em $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ na faixa de potencial de -0,20 a +0,80 V e de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$ na faixa de potencial de -0,40 a +0,15V. Estudos também foram conduzidos somente em solução do eletrólito suporte (solução aquosa de KCl), na mesma

região de potencial utilizada na investigação dos pares redox, afim de verificar a contribuição da eletroatividade dos filmes poliméricos no processo de transferência eletrônica dos pares redox utilizados.

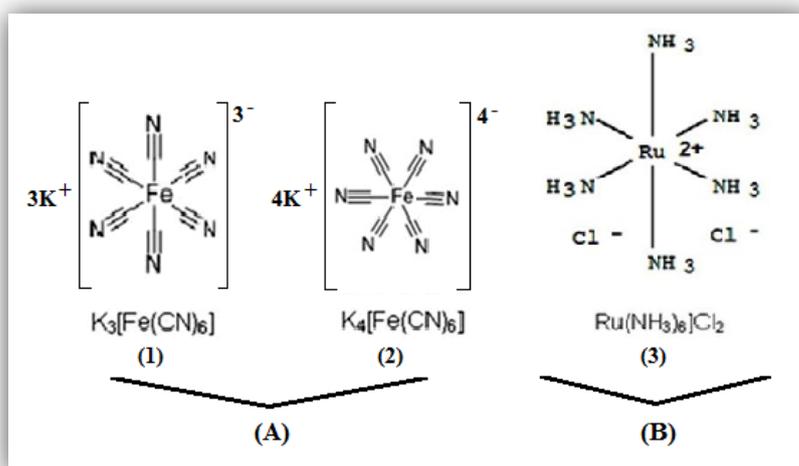


Figura 13: Fórmula estrutural e molecular para: (A) sonda redox aniônica e (B) sonda redox catiônica; (1) Ferricianeto de potássio, (2) Ferrocianeto de potássio e (3) cloreto de hexaaminrutênio II.

3.2.2 - CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

Para obtenção de poli(4-HFA) em quantidade suficiente para que os estudos estruturais pudessem ser conduzidos seguiu-se o mesmo procedimento de eletropolimerização, porém, sobre eletrodos de trabalho formado por 4 cilindros de grafite (30 x 0,6 mm), com área geométrica de aproximadamente $6,21 \text{ cm}^2$, e com eletrodo cilíndrico de aço inoxidável como contra-eletródo (Figura 14-A). Após a eletropolimerização os eletrodos de trabalho foram imersos em acetonitrila (Vetec, UV/HPLC Espectroscópico 99,8 %) e mantidos em banho-sônico durante 2 h. O material extraído foi, então, seco com cristais Na_2SO_4 anidro e, em seguida, concentrado em rotaevaporador. Durante o período de utilização o material coletado foi mantido protegido da luz e umidade em dessecador a vácuo.

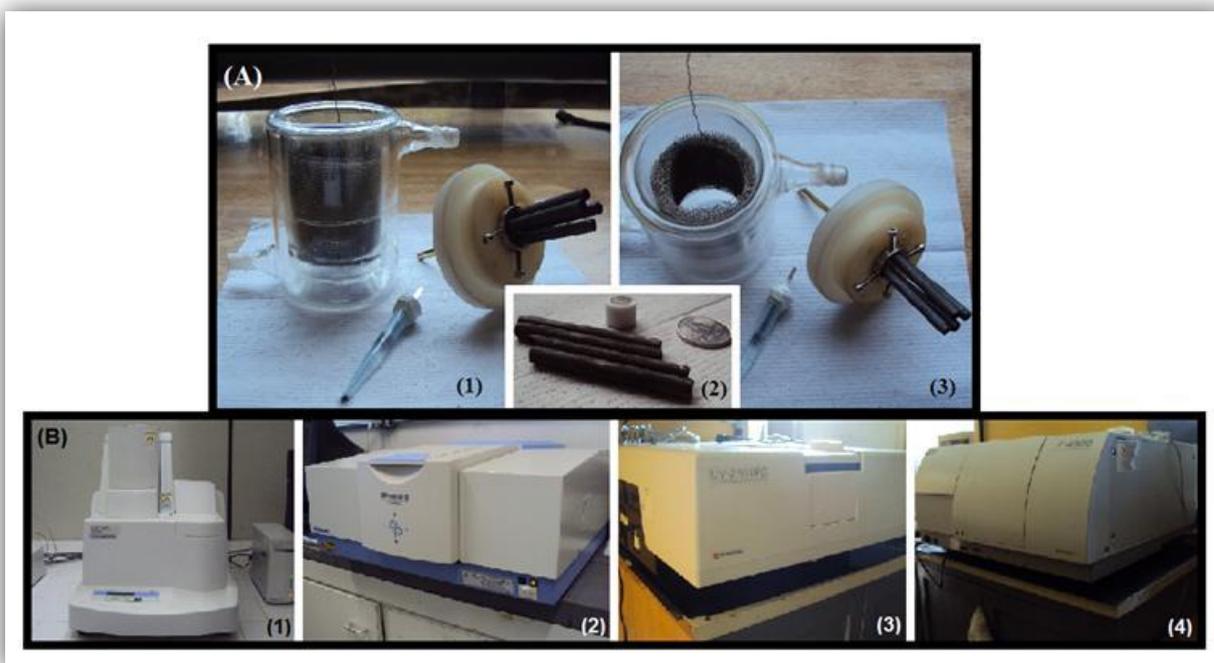


Figura 14: (A) Célula eletroquímica, barras de grafite, eletrodo auxiliar e eletrodo de referência utilizados para extração do poli(4-HFA); (B) Equipamentos utilizados nos estudos estruturais do poli(4-HFA), sendo (1) SDT da TA Instruments para estudos termogravimétricos, (2) IR Prestige-21 da Shimadzu para estudos de Infravermelho, (3) espectrofotômetro da Shimadzu modelo UV-1650PC para estudos de ultravioleta visível, e (4) Fluorímetro Hitachi F-4500 para estudos de fluorescência.

Os estudos estruturais do ácido poli(4-HFA) foram conduzidos utilizando-se as técnicas de Análise Termogravimétrica, Espectroscopia no Ultravioleta Visível, Fluorescência e Espectroscopia no Infravermelho. Os respectivos equipamentos são apresentados na Figura 14-B.

3.2.2.1 – Análise Termogravimétrica - TGA

A análise térmica foi definida por Mackenzie¹¹⁴ como sendo “*um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física de uma substância e/ou seus produtos de reação é medida, enquanto a amostra é submetida a uma programação de temperatura*”.

Dentre as técnicas termoanalíticas mais utilizadas encontram-se a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), na qual se acompanha a variação da energia entre a amostra e a referência, a Análise Térmica Diferencial (DTA), na qual se acompanha a variação de temperatura da amostra em relação a um material inerte de referência, e a Análise Termogravimétrica (TGA), na qual se mede a variação da propriedade física massa, da amostra em função do tempo (com a temperatura constante), ou em função da temperatura.

No caso particular da Análise Termogravimétrica, o tipo mais comum de experimentos empregando esta técnica é a “Termogravimetria Dinâmica”, em que se submete a amostra a uma variação constante de temperatura (controlada por um programador), em um forno, enquanto uma balança monitora sua massa. O aparelho utilizado para a técnica é chamado “Termobalança” e para que se tenha resultados, é preciso que se originem produtos de decomposição térmica voláteis, ou que ocorra incorporação de átomos ou moléculas, provenientes dos gases da atmosfera do forno, respectivamente aumentando ou diminuindo a massa original da amostra¹¹⁵.

Os estudos de estabilidade térmica foram feitos utilizando-se TGA acoplada a DTA como técnicas termoanalíticas suporte. Todas as medidas foram conduzidas sobre atmosfera de nitrogênio ($70 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$), com taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$ de 25 a $600 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.2.2 - Espectroscopia no Ultravioleta Visível (UV-vis) e Fluorescência

A espectrofotometria na região ultravioleta visível do espectro eletromagnético (Figura 15) é uma das técnicas analíticas mais empregadas, em função de robustez, custo relativamente baixo e grande número de aplicações desenvolvidas, e ainda, devido à

possibilidade de acoplamento a diversas técnicas ou processos, como cromatografia, eletroforese e análises em fluxo (116). Esta técnica é baseada na variação da energia total de uma dada molécula após absorção de radiação no UV-Vis.

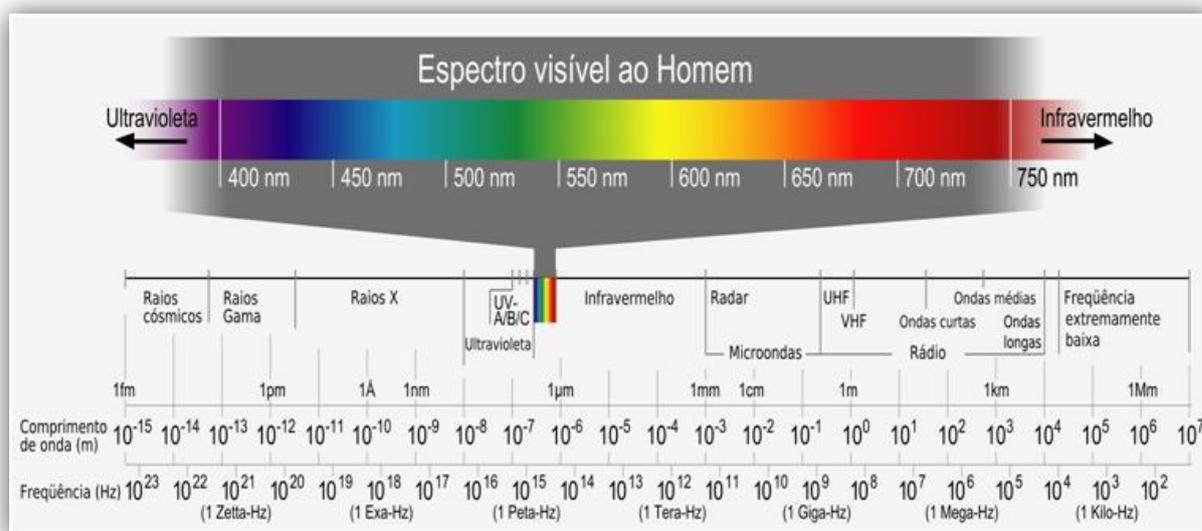


Figura 15: Representação esquemática do espectro eletromagnético.

A energia total de uma molécula é a soma das energias de ligação ou energia eletrônica, vibracional e rotacional. A magnitude destas energias diminui na ordem: $E_{\text{elet.}}$, $E_{\text{vib.}}$, $E_{\text{rot.}}$. A absorção de energia da região do ultravioleta produz modificação da energia eletrônica da molécula em consequência de transições dos elétrons de valência da molécula. As transições correspondem à excitação de um elétron de um orbital molecular totalmente ocupado (usualmente um orbital p não ligante ou um orbital π ligante) a um orbital de energia superior (geralmente o primeiro orbital antiligante π^* ou σ^*). Um orbital antiligante é designado pelo asterisco. Assim, por exemplo, indica-se a transição de um elétron de um orbital ligante π para um orbital antiligante π^* por $\pi \rightarrow \pi^*$ ¹¹⁷.

Um espectro de ultravioleta visível (UV-vis) é um gráfico de frequência ou comprimento de onda de absorção *versus* intensidade de absorção (em transmitância ou absorvância). A relação entre a energia absorvida em uma transição eletrônica e a frequência ($\bar{\nu}$), comprimento de onda (λ) ou número de ondas ($\bar{\nu}$) da radiação que produz a transição é

$$\Delta E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} = h\bar{\nu}c, \quad \text{Equação 4}^{117}$$

onde h é a constante de Planck e c a velocidade da luz. ΔE é a energia absorvida por uma molécula em uma transição eletrônica a partir de um estado de menor energia (estado fundamental) para um estado de maior energia (estado excitado). A energia absorvida depende da diferença de energia entre o estado fundamental e o estado excitado. Quanto menor for essa diferença, maior será o comprimento de onda de absorção. Na prática, a espectrometria no ultravioleta é limitada, na maior parte, aos sistemas conjugados, pois, estes apresentam geometria molecular altamente favorável a ocorrência de transições eletrônicas (simetria). O excesso de energia acumulado no estado excitado pode provocar dissociação ou ionização da molécula ou pode, ainda, ser reemitido na forma de calor ou de luz. A emissão de luz resulta na fluorescência ou fosforescência¹¹⁷.

As características principais de uma banda de absorção são a sua posição e a sua intensidade. A posição da absorção corresponde ao comprimento de onda da radiação cuja energia é igual à necessária para que ocorra a transição eletrônica. Já a intensidade de absorção depende de dois fatores: a probabilidade de interação entre a energia radiante e o sistema eletrônico, de modo a permitir a passagem do estado fundamental a um estado excitado, e a polaridade do estado excitado. Assim, a intensidade de absorção é inversamente proporcional a probabilidade de ocorrência dessas transições. Uma absorção com $E_{\max} > 10^4$ é considerada intensa. As absorções em que $E_{\max} < 10^3$ são consideradas de fraca intensidade. As transições de baixa probabilidade são chamadas de “transições proibidas”¹¹⁷.

A espectrofotometria é fundamentada na lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético. Para medidas de absorção de radiação em determinado comprimento de onda, tem-se:

$$A = \log (I_0/I) = \varepsilon bc \quad \text{Equação 5}^{117}$$

onde A é a absorvância, I_0 é a intensidade da radiação monocromática que incide na amostra e I é a intensidade da radiação que emerge da amostra. A absorvidade molar (ε) é uma grandeza característica da espécie absorvente, cuja magnitude depende do comprimento de onda da radiação incidente. O termo c é a concentração da espécie absorvente e b , a distância percorrida pelo feixe através da amostra¹¹⁶.

A definição dos termos utilizados nas discussões dos espectros eletrônicos apresentados neste trabalho é dada a seguir.

- ❖ **Cromóforo:** é um grupo insaturado covalente, responsável pela absorção eletrônica (por exemplo, C=C, C=O ou C=C-O-C=C);
- ❖ **Auxócromo:** é um grupo saturado que, quando ligado a um cromóforo, altera tanto o comprimento de onda como a intensidade da absorção (por exemplo, OH e CH₂CO₂H).
- ❖ **Deslocamento batocrômico:** é o deslocamento de uma absorção para um comprimento de onda maior devido a efeitos de substituição ou de solvente (isto é, um deslocamento para o vermelho).

Os espectros de absorção na região do UV-Vis foram obtidos usando espectrofotômetro da Shimadzu modelo UV-1650PC. As medidas foram realizadas em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm. Os espectros de fluorescência foram realizados a temperatura ambiente utilizando-se Fluorímetro Hitachi F-4500. Acetonitrila (Vetec, UV/HPLC espectroscópico 99,8%), foi utilizada como solvente em todas as medidas espectrofotográficas.

3.2.2.3 – Espectroscopia no Infravermelho - IR

A espectroscopia de absorção no Infra-Vermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica analítica baseada na frequência com que ligações químicas vibram quando submetidas à passagem de radiação nessa região do espectro eletromagnético.

A radiação infravermelha na faixa aproximada de 10.000 cm⁻¹ a 100 cm⁻¹ converte-se, quando absorvida por uma molécula orgânica, em energia de vibração molecular. O processo também é quantizado, porém, o espectro vibracional aparece como uma série de bandas em vez de linhas, porque cada mudança de nível de energia vibracional corresponde a uma série de mudanças de níveis de energia rotacional¹¹⁸. São essas as bandas de vibração-rotação, em particular as que ocorrem entre 4.000 cm⁻¹ e 400 cm⁻¹, que são utilizadas para identificar muitas características estruturais de moléculas orgânicas e inorgânicas. A frequência ou o comprimento de onda de uma absorção depende das massas relativas dos átomos, das constantes de força das ligações e da geometria molecular¹¹⁹.

As vibrações moleculares podem ser classificadas em deformações axiais e deformações angulares. Uma vibração de deformação axial é um movimento rítmico ao longo do eixo da ligação que faz com que a distância interatômica aumente e diminua alternadamente. As vibrações de deformação angular correspondem a variações ritmadas dos ângulos de ligação em relação a um conjunto arbitrário de coordenadas da molécula¹¹⁸. Somente as vibrações que levam à alteração rítmica do momento de dipolo da molécula são observadas nos espectros de FTIR convencionais, tal como fora utilizado neste trabalho. Grupos funcionais que têm momento de dipolo intenso dão origem, em geral, a absorções intensas em frequência maiores. Torna-se claro, então, que mesmo uma molécula muito simples pode dar um espectro muito complexo.

Um espectro de infravermelho é característico da molécula como um todo, porém, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independentemente da estrutura da molécula. É justamente a presença dessas bandas que permite, através do exame detalhado do espectro, de consulta a tabelas e da comparação do espectro da substância desconhecida ao de um composto padrão, a obtenção de informações estruturais úteis para a identificação e/ou caracterização de compostos desconhecidos¹¹⁸.

A definição dos termos utilizados nas discussões dos espectros eletrônicos apresentados neste trabalho é dada a seguir.

- ❖ **Bandas de combinação:** corresponde a soma de duas outras vibrações.
- ❖ **Vibrações harmônicas:** são bandas múltiplas de uma dada frequência fundamental. No caso de compostos aromáticos mononucleares essas bandas aparecem entre 2.000 e 1.600 cm^{-1} , e são muito utilizadas para identificar o número e a posição de substituintes no benzeno.

Os espectros de FTIR apresentados neste trabalho são dados em número de onda ($\bar{\nu}$) em cm^{-1} versus intensidade de absorção em transmitância. É importante lembrar que $\bar{\nu}$ é proporcional à frequência, logo, à energia de vibração das ligações. Todo estudo foi feito em pastilhas de KBr numa faixa de 600 a 4500 cm^{-1} . A resolução foi de 2 ou 4 cm^{-1} e o número de ciclos igual 20. Espectros de FTIR também foram registrados após tratamento do poli(4-HFA) sob aquecimento em mufla, por 4 horas, em atmosfera inerte de nitrogênio, a 100 °C.

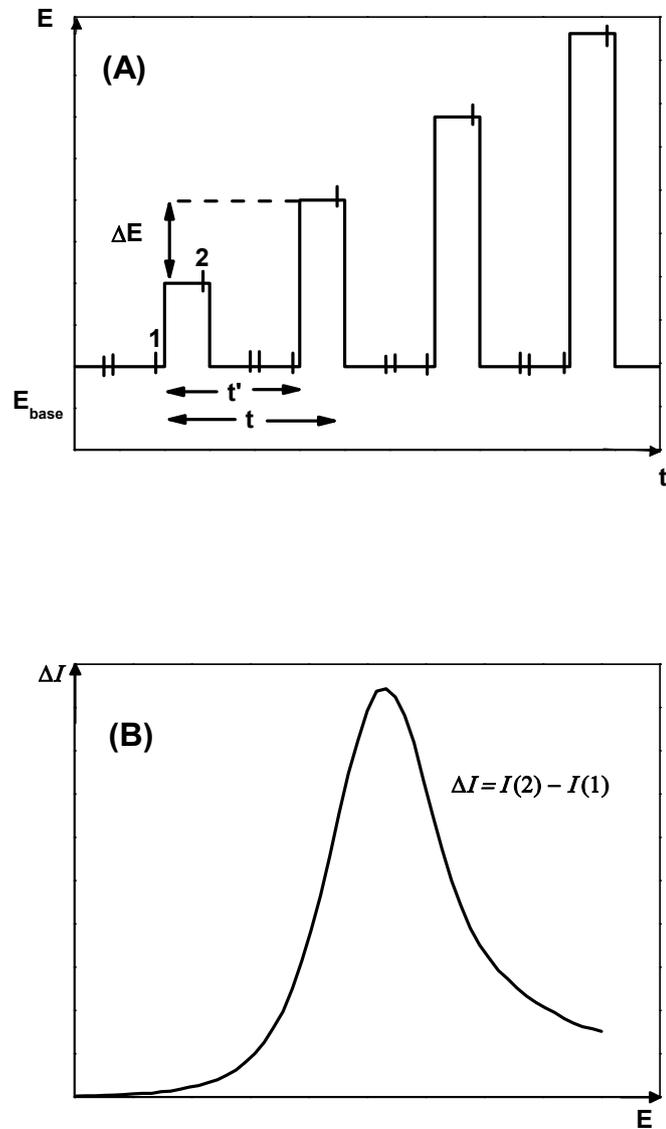


Figura 16: Voltametria de Pulso Diferencial. (A) Esquema de aplicação de pulso começando em E_{base} . A corrente é medida no início (1) e no fim (2) dos pulsos; $t = 2-4$ s e $(t - t')$ 5-100 ms. (B) Perfil esquemático de um voltamograma de pulso diferencial (corrente vs potencial)¹¹².

Os estudos eletroquímicos do imunossensor foram conduzidos em células eletroquímicas de um compartimento com capacidade total de $1,0 \text{ cm}^3$. O processo de

montagem destas células consiste, primeiramente, em envolver o eletrodo de trabalho com um pequeno copo plástico (obtido a partir de pipetas Pasteur), e, em seguida, vedar toda a conexão com teflon. Após esse procedimento a célula foi montada em um suporte universal.

A técnica eletroquímica suporte utilizada nestes estudos foi a Voltametria de Pulso Diferencial (VPD). Nesta técnica escolhe-se um valor base de potencial, E_{base} , e aplica-se ao eletrodo. A partir deste valor, aplicam-se pequenos pulsos de crescente amplitude, sendo este aumento sempre igual (Figura 16-A). Depois de aplicar um pulso, a corrente capacitiva extingue-se mais rapidamente do que a corrente faradaica, assim, a corrente é medida imediatamente antes e após a aplicação do pulso e registra-se a diferença entre elas. Desta forma, a aplicação desta técnica permite aumentar a sensibilidade, bem como, obter melhores características para aplicações analíticas. Como VPD é uma técnica diferencial, a resposta é semelhante à primeira derivada de um voltamograma diferencial, isto é, um pico (Figura 16-B).

Contudo, a VPD foi escolhida por ser uma técnica que apresenta maior sensibilidade que a voltametria cíclica e, até mesmo, que a voltametria de pulso normal (VPN), se tratando de eletrodos sólidos como os EG utilizados neste trabalho¹¹². Essa diferença de sensibilidade ocorre especialmente quando compostos orgânicos estão envolvidos nos processos eletroquímicos. Como estes conduzem freqüentemente à adsorção no eletrodo, é possível que uma técnica diferencial discrimine os efeitos que são mais ou menos constantes antes e depois da aplicação do pulso¹¹².

3.3.1 – Construção do Imunossensor

Antes da imobilização do antígeno (rK39) obteve-se a linha base do sistema contendo apenas os EG/poli(4-HFA). Neste procedimento esses eletrodos foram colocados em contato com a solução tampão TBS por cerca de 30 minutos para garantir maior estabilização da linha base. Em seguida, registros da linha base foram obtidos até estabilização utilizando-se VPD. Após o procedimento os eletrodos foram retirados da solução tampão e secos imediatamente com fluxo de $N_{2(g)}$ ultra puro.

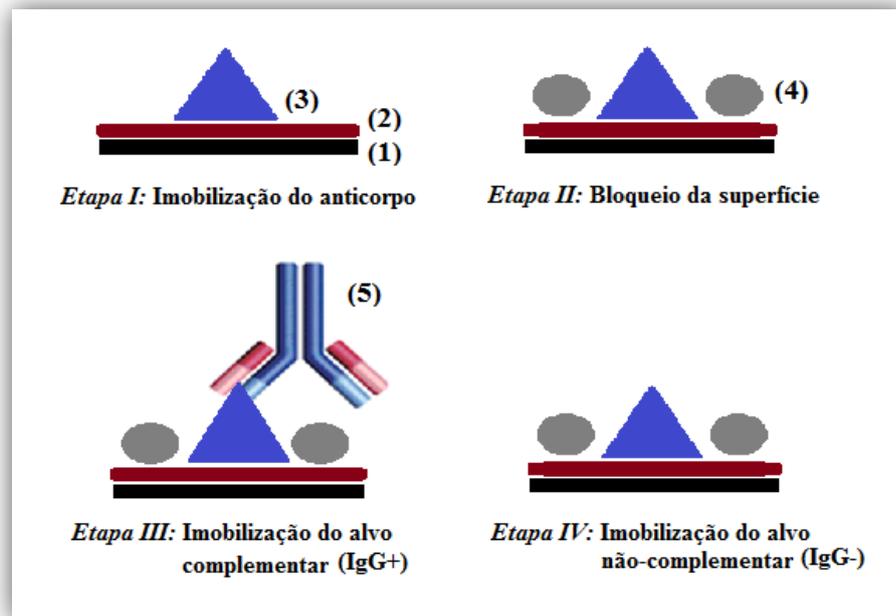


Figura 17: Esquema do procedimento utilizado para construção do imunossensor; (1) EG, (2) poli(4-HFA), (3) antígeno - rK39; (4) BSA; (5) anticorpo específico - IgG⁺.

Depois de obtida a linha base para EG/poli(4-HFA) seguiu-se com o procedimento de construção do imunossensor (Figura 17). Primeiramente o antígeno foi imobilizado sobre EG/poli(4-HFA) (Etapa I). Para este procedimento, 15 μL da solução de rK39, foi colocada sobre a superfície do eletrodo, e o mesmo foi mantido a temperatura ambiente até evaporação do solvente. Posteriormente o eletrodo foi lavado em tampão TBS por 6 s, e seco com $\text{N}_{2(\text{g})}$ ultra puro. Em seguida gotejou-se 15 μL da solução de BSA à superfície EG/poli(4-HFA)/rK39 (Etapa II) e, novamente, o mesmo foi mantido a temperatura ambiente até a evaporação do solvente. Este procedimento tem como objetivo bloquear a superfície contra adsorções não específicas. Após evaporação do solvente o eletrodo foi lavado em solução de tampão TBS por 6 s, e seco com $\text{N}_{2(\text{g})}$ ultra puro. Neste ponto obtêm-se o imunossensor. Posteriormente, realizou-se imobilização dos anticorpos positivo (IgG⁺) e negativo (IgG⁻, controle negativo) para a LV (Etapas III e IV). Cerca de 15 μL de solução de cada anticorpo foi adicionada sobre a superfície dos imunossensores (EG/poli(4-HFA)/rK39/BSA) e mantidos a temperatura ambiente até a evaporação do solvente para, assim, promover a reação de formação do complexo Ag-Ac. Finalmente, os sistemas EG/poli(4-HFA)/rK39/BSA/IgG⁺ e EG/poli(4-HFA)/rK39/BSA/IgG⁻, foram lavados por 6 s, em tampão TBS e seco com $\text{N}_{2(\text{g})}$

ultra puro. Como o IgG- não possui especificidade com o rK39, espera-se que este não seja imobilizado nos imunossensores (Etapa IV).

3.3.2 - Detecção do alvo complementar (IgG+)

Dois sistemas de detecção do IgG+ foram propostos neste trabalho. No primeiro utilizou-se o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG-250) como indicador. No segundo o indicador utilizado foi o complexo inorgânico Cloreto de Hexaaminrutênio II.

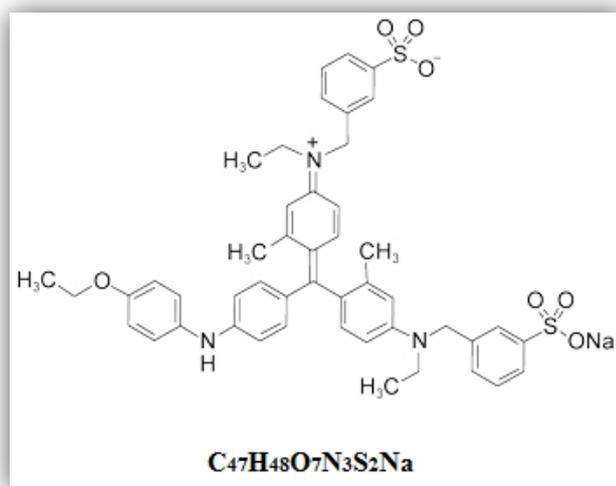


Figura 18: Representação estrutural do Coomassie Brilliant Blue G-250 (C₄₇H₄₈O₇N₃S₂Na).

O corante CBBG-250 (Figura 18) é um composto derivado de dissulfonato de trifenilmetano comumente usados como base para a detecção e quantificação de proteínas em eletroferese em gel e, também, em imunossaios, tais como, a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Esses corantes apresentam grande facilidade de formar ligações com proteínas através de seus aminoácidos. Estas características somadas às suas propriedades ópticas justificam a aplicabilidade desses corantes nos ensaios citados. O fato de o ELISA e o RIFI serem testes laboratoriais padrão ouro mundialmente indicado como comprovação final no diagnóstico da ocorrência ou não de

anticorpos de *Leishmania* sp no homem¹²⁰, e ainda, de o CBBG-250 ser muito aplicado a essas técnicas, justificam o interesse do grupo LAFIP/NANOTEC em investigar uma possível aplicação desse corante como indicador da formação do complexo antígeno-anticorpo em imunossensores eletroquímicos.

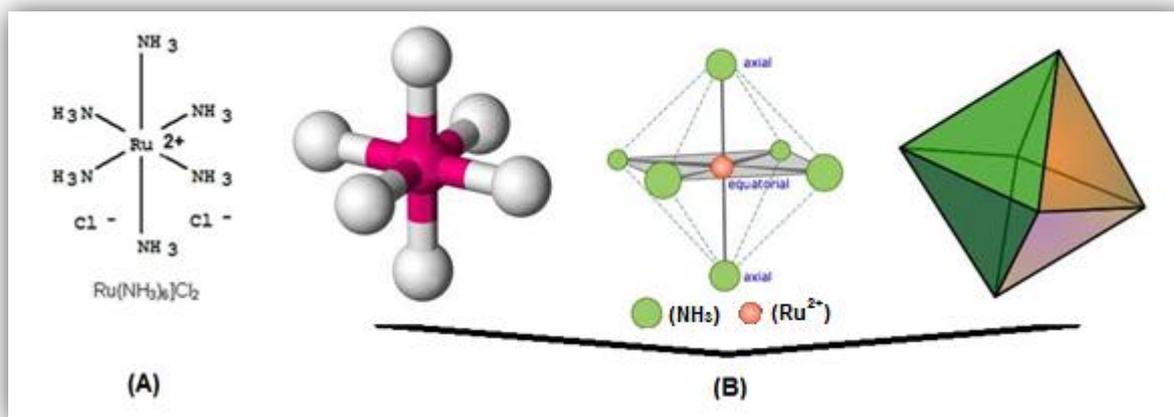


Figura 19: Cloreto de Hexaaminrutênio II, sendo (A) representação estrutural e molecular e (B) representação da geometria molecular (bipirâmide tetragonal ou octaédrica).

O cloreto de hexaaminrutênio II é sal de coloração preta cujo cátion é um complexo inorgânico que possui, no seu centro, um átomo de rutênio com duas cargas positivas rodeado por seis grupamentos amina dispostos em uma bipirâmide tetragonal (Figura 19). O comportamento eletroquímico deste complexo é bastante conhecido e faz dessa substância uma importante ferramenta no estudo de processos de transferência eletrônica em eletrodos antes e após a modificação de suas superfícies por meio da adsorção de diferentes substâncias. Essa característica despertou o interesse no grupo LAFIP/NANOTEC no sentido de investigar uma possível aplicação dessa substância como indicador da modificação de eletrodos após imobilização de biomoléculas e, conseqüentemente, no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos.

3.3.2.1 - Detecção usando Coomassie Brilliant Blue G-250 - CBBG-250

A resposta eletroquímica do CBBG-250 foi monitorada após cada etapa de imobilização das biomoléculas, isso significa dizer que, para cada estudo de detecção, no mínimo 4 eletrodos foram usados. Neste procedimento, 15 μL da solução de CBBG-250 foram gotejadas sobre a superfície dos eletrodos e, posteriormente, esses foram mantidos a temperatura ambiente até evaporação do solvente. Em seguida, essas superfícies foram lavadas em solução de tampão TBS por 6 s e secos com $\text{N}_{2(\text{g})}$ ultra puro. Finalmente, medidas de VPD foram feitas numa faixa de potencial de -0,6 a 0,3 V, com velocidade de varredura de 0,4 V/s.

3.3.2.2 - Detecção usando Cloreto de Hexaaminrutênio II

A resposta eletroquímica do cloreto de hexaaminrutênio II foi monitorada, assim como na detecção com CBBG-250, após cada etapa de imobilização das biomoléculas, porém, com procedimento de detecção diferente. Neste caso, após imobilização das biomoléculas os eletrodos foram imersos em solução de cloreto de hexaaminrutênio II, na célula eletroquímica de um compartimento utilizada para medidas de VPD, por 2 minutos. Este procedimento garante melhor estabilização dos mesmos nessa solução. Em seguida, medidas de VPD foram feitas numa faixa de potencial de -0,4 a 0 V, com velocidade de varredura de 0,4 V/s.



*RESULTADOS E
DISCUSSÕES*

4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 – ESTUDO DO POLI(4-HFA)

4.1.1 - CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

4.1.1.1 - Eletropolimerização do ácido 4-HFA

A eletropolimerização do ácido 4-HFA foi feita por VC, 100 ciclos, com faixa de potencial de -0,7 a 1,2 V⁵¹ (Figura 20). O primeiro ciclo revela a presença de um processo de oxidação irreversível em +0,95 V, atribuída à oxidação do monômero. Este pico diminui com a ciclagem potencial contínua devido a uma limitação no acesso do monômero à superfície do eletrodo ocasionado pela presença do filme polimérico formado e, também, ao consumo constante do monômero⁵¹. Dois picos redox, +0,59 e +0,32 V, crescem com o número de varreduras. Estes picos são atribuídos ao processo de oxidação e redução do filme poli(4-HFA)⁵¹. As correntes de pico atribuídas ao polímero aumentam rapidamente nos primeiros ciclos e tendem a ficar constantes nos últimos ciclos.

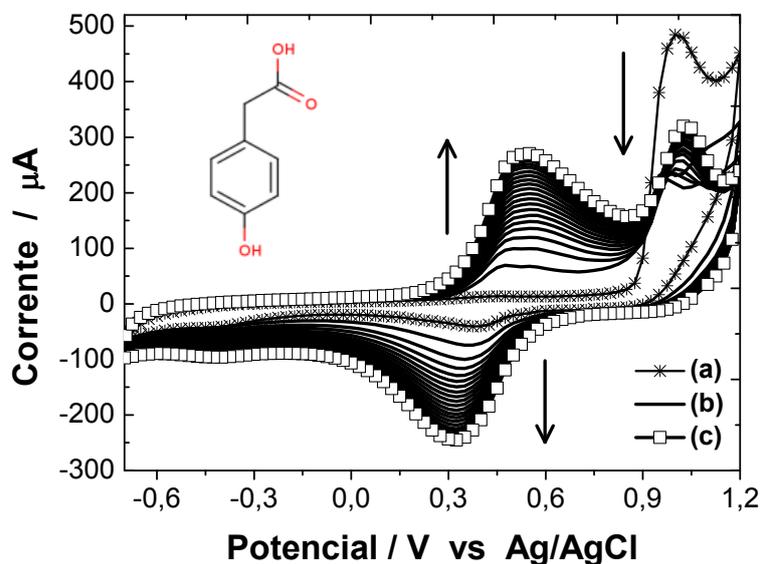


Figura 20: Voltamogramas cíclicos consecutivos (100 ciclos) do EG em solução de ácido perclórico 0,5 mol L⁻¹ contendo ácido (4-HFA) 2,5x10⁻³ mol L⁻¹; 50mV/s; (a) 1º ciclo, (b) do 5º ao 95º, variando a cada 5 ciclos, e, (b) 100º ciclo.

Para investigar o quanto a resposta do poli(4-HFA) aumenta com determinado número de varreduras potenciais, e ainda, se a eletropolimerização deixa de ocorrer após determinado número de ciclos, foi feito o monitoramento nos valores de carga e I_p envolvidos no processo de oxidação do filme até o 400^a ciclo da eletropolimerização. Para este estudo, as cargas foram monitoradas em potenciais fixos de +0,22 a +0,85 V, a cada 20 ciclos (Figura 21).

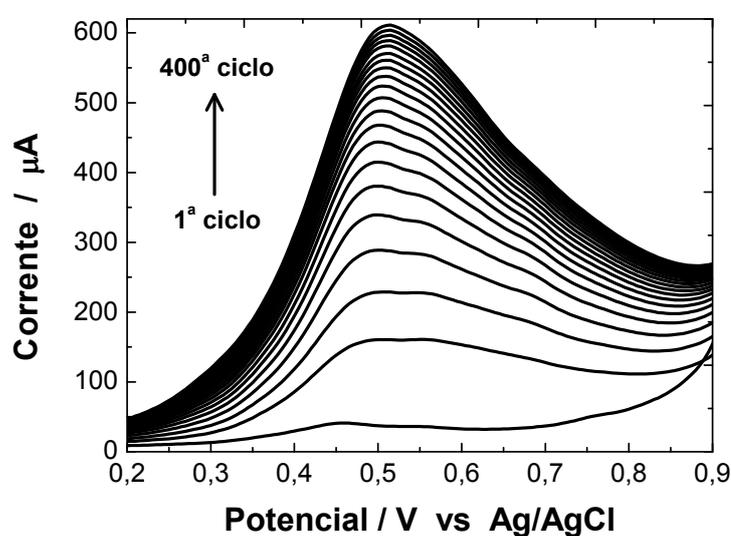


Figura 21: Processo de oxidação atribuído ao poli(4-HFA) monitorado, a cada 20 varreduras potenciais, da 1^a a 400^a varredura em solução de ácido perclórico 0,5 mol.L⁻¹ contendo ácido (4-HFA) 2,5x10⁻³ mol.L⁻¹; 50 mV/s.

Os resultados obtidos permitiram constatar que nos primeiros vinte ciclos a carga de oxidação aumenta em, aproximadamente, 79,59%. Esse aumento diminui para 36,80% do 20^a para o 60^a ciclo, e para 16,30% do 60^a ao 100^a ciclo. A partir do 100^a ciclo, essa variação no aumento de resposta oscila entre 2% e 3% e mantém-se constante até o 400^a ciclo (Figura 22-A). Quanto as I_{pa} 's a porcentagem de aumento de resposta é semelhante ao descrito para as cargas, porém, com valores consideravelmente reduzidos após o 260^a ciclo (Figura 22-B). Essa diferença de aumento de resposta entre as cargas e as I_{pa} 's é justificada pelo sutil alargamento observado para o processo de oxidação do filme que provoca um pequeno

aumento nos valores de carga mesmo não ocorrendo aumento significativo das I_{pa} 's. A Tabela 5 apresenta um resumo dos resultados obtidos.

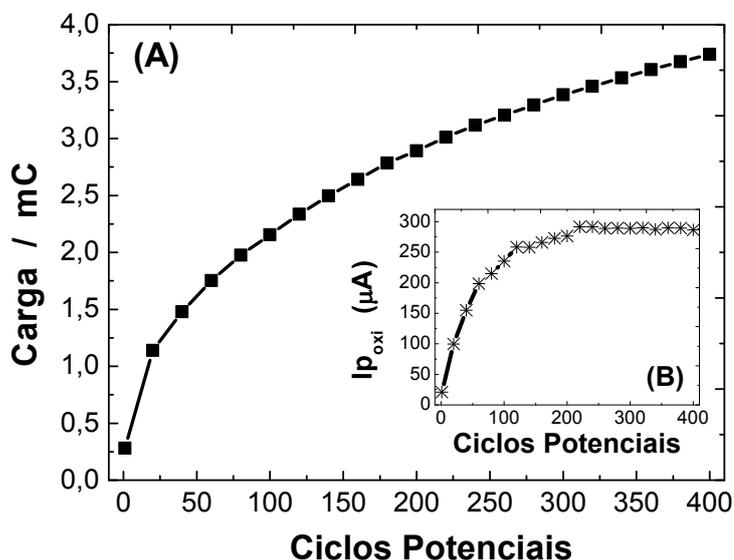


Figura 22: (A) Monitoramento das cargas de oxidação, em potenciais fixos entre +0,22 e +0,85 V, do poli(4-HFA) em função do número de ciclagens potenciais, e (B) monitoramento das I_{pa} 's do poli(4-HFA) em função do número de ciclagens potenciais.

Tabela 5: Monitoramento dos E_p , das I_p e das cargas referentes à oxidação do poli(4-HFA) observados nos VC referentes a sua eletrossíntese.

| Oxidação | | | | | | | |
|----------|-----------|------------------|------------|-------|-----------|------------------|------------|
| Ciclo | E_p (V) | I_p (μ A) | Carga (mC) | Ciclo | E_p (V) | I_p (μ A) | Carga (mC) |
| 20 | 0,53 | 138,01 | 1,139 | 220 | 0,53 | 390,01 | 3,011 |
| 60 | 0,53 | 218,35 | 1,751 | 260 | 0,53 | 415,57 | 3,205 |
| 100 | 0,53 | 269,49 | 2,155 | 300 | 0,53 | 441,14 | 3,383 |
| 140 | 0,53 | 316,96 | 2,496 | 340 | 0,53 | 463,05 | 3,532 |
| 180 | 0,53 | 357,14 | 2,784 | 380 | 0,53 | 484,96 | 3,673 |
| 200 | 0,53 | 371,75 | 2,891 | 400 | 0,53 | 495,92 | 3,739 |

O perfil descrito para o aumento das cargas e das I_p envolvidas no processo de oxidação do poli(4-HFA) é consistente com a deposição deste na superfície do EG, pois, a

medida com que o filme vai ocupando essa superfície o processo de eletropolimerização é dificultado devido a um menor contato entre o eletrodo e os monômeros presentes na solução⁵¹, levando a valores de carga maiores a cada varredura potencial devido, principalmente, ao aumento do ΔE_{oxi} , e a valores de I_{pa} tendendo à constância.

Contudo, considerando a porcentagem no aumento de resposta do filme e o tempo gasto na sua eletrossíntese (76 s/ciclo), a realização de 100 ciclos potenciais apresenta-se como uma boa referência, pois, para se obter um aumento de resposta superior a 10% a partir de então, no mínimo mais 80 ciclos são necessários, e isso representa um aumento de 104 minutos no tempo de eletropolimerização.

Outra característica do poli(4-HFA) observada nesse estudo foi que os E_p 's não variam significativamente em função do número de varreduras potenciais durante a eletrossíntese. Esse comportamento indica que o filme polimérico obtido não representa uma resistência ao circuito elétrico em questão, e isso está relacionado com o aumento contínuo da extensão de conjugação do filme com o número de varreduras potenciais, e, também, justifica a boa condutividade elétrica apresentada por este material e, conseqüentemente, sua aplicabilidade no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos.

4.1.1.2 – Influência de Pares Redox Catiônicos e Aniônicos sob a Resposta Eletroquímica do Poli(4-HFA)

A adsorção de uma substância eletroativa sobre a superfície de um eletrodo altera as propriedades de transferência eletrônica do sistema. Essa alteração tem sido usualmente avaliada no estudo das reações redox de complexos inorgânicos como ferrocianeto/ferricianeto de potássio e cloreto de hexaaminrutênio como sondas de investigação aniônica e catiônica, respectivamente¹²¹⁻¹²⁷. Neste sentido, a investigação das propriedades de transferência eletrônica e transporte iônico do sistema EG/Poli(4-HFA) foram conduzidos em soluções contendo o par redox $Fe(CN)_6^{4-}/Fe(CN)_6^{3-}$ e o $Ru(NH_3)_6^{2+}$.

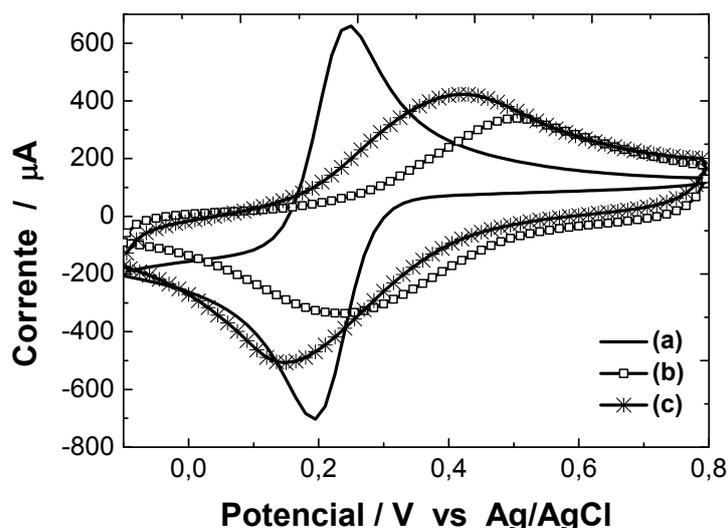


Figura 23: Voltamogramas cíclicos obtidos para eletrodo de grafite: (a) sem filme em solução de ferrocianeto/ferricianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$) 5 mmol L^{-1} contendo KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, (b) modificado com poli(4-HFA) em solução de ferrocianeto/ferricianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$) 5 mmol L^{-1} contendo KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, e (c) modificado com poli(4-HFA) em solução KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

Os estudos com o par redox $Fe(CN)_6^{4-}/Fe(CN)_6^{3-}$ mostraram a ocorrência de um deslocamento no $E_{p_{oxi}}$ de $+0,24$ para $+0,42 \text{ V}$ ($\Delta E_{p_{oxi}} = +0,18 \text{ V}$) e no $E_{p_{red}}$ de $+0,19$ para $+0,14 \text{ V}$ ($\Delta E_{p_{red}} = -0,05 \text{ V}$), após formação do polímero. Estes valores de ΔE_p 's indicam que o circuito elétrico apresenta maior resistência no sistema contendo EG/Poli(4-HFA) comparado àquele contendo apenas o EG. Uma diminuição nas I_p 's em, aproximadamente, 35,36% para I_{pa} e de 28,08% para I_{pc} , representando valores de ΔI_{pa} e ΔI_{pc} de $-238,85$ e $+197,72 \text{ } \mu\text{A}$, respectivamente, foi observada. Varreduras potenciais conduzidas em solução contendo apenas o eletrólito suporte (KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) mostraram que a interação do EG/Poli(4-HFA) com o par redox em questão contribui em apenas 19,23% para I_{pa} e 34,12% para I_{pc} . Estes resultados indicam que o sistema contendo apenas EG é melhor condutor elétrico na solução contendo o par redox em questão, quando comparado àquele contendo EG/Poli(4-HFA). Tais resultados são apresentados na Figura 23 e na Tabela 6.

Tabela 6: Valores referentes aos Ep's e as Ip's observados nos VC's em solução de ferrocianeto/ferricianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$) 5 mmol.L⁻¹ contendo KCl 0,10 mol.L⁻¹.

| | Ep _{oxi} (V) | Ep _{red} (V) | Ipa (μA) | Ipc (μA) |
|------------------------|-----------------------|-----------------------|----------|----------|
| EG | 0,24 | 0,19 | 660,29 | -700,11 |
| EG/Poli(4-HFA) | 0,42 | 0,14 | 421,44 | -507,68 |
| EG/Poli(4-HFA)* | 0,50 | 0,23 | 339,99 | -334,60 |

* valores obtidos em solução contendo apenas KCl 0,10 mol.L⁻¹.

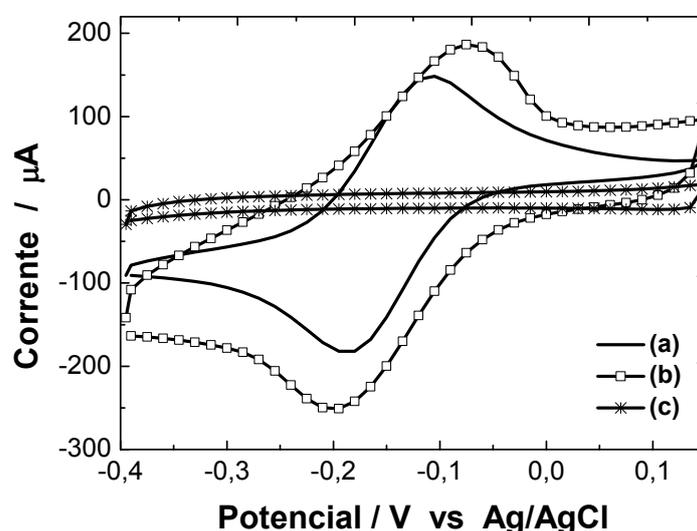


Figura 24: VC obtidos para (a) EG em solução de cloreto de hexaminrutênio II ($[Ru(NH_3)_6]Cl_2$) 5mmol.L⁻¹ contendo KCl 0,10 mol.L⁻¹, (b) EG/Poli(4-HFA) em solução de cloreto de hexaminrutênio II ($[Ru(NH_3)_6]Cl_2$) 5mmol.L⁻¹ contendo KCl 0,10 mol.L⁻¹, e (c) EG/Poli(4-HFA) em solução KCl 0,10 mol.L⁻¹.

Já os estudos conduzidos em solução contendo o $Ru(NH_3)_6^{2+}$ apresentaram valores de ΔE_p de, aproximadamente, +0,03 V e -0,02 V para oxidação e redução, respectivamente, indicando, assim como nos estudos com $Fe(CN)_6^{4-}/Fe(CN)_6^{3-}$, que o sistema contendo EG/Poli(4-HFA) apresenta maior resistência que aquele contendo apenas EG. Um aumento nas I_{pa} e I_{pc} de, aproximadamente, 20,85% e 27,60%, respectivamente, foi observado. Esse aumento representa valores de ΔI_p de +38,64 μA para I_{pa} e -67,46 μA para I_{pc} , após a modificação do EG com o filme polimérico. As varreduras potenciais conduzidas em solução

contendo apenas o eletrólito suporte mostram que esse aumento na condutividade elétrica é inteiramente atribuído a interação do filme com o $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+}$, já que estes respondem em faixas de potencial diferente. Esses resultados são apresentados na Figura 24 e na Tabela 7.

Tabela 7: Valores referentes aos E_p 's e as I_p 's observados nos VC's em solução de cloreto de hexaminrutênio II ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$) 5 mmol.L^{-1} contendo KCl $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$.

| | $E_{p_{\text{oxi}}}$ (V) | $E_{p_{\text{red}}}$ (V) | I_{pa} (μA) | I_{pc} (μA) |
|------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
| EG | -0,10 | -0,18 | 148,69 | -182,84 |
| EG/Poli(4-HFA) | -0,07 | -0,20 | 187,33 | -250,43 |
| EG/Poli(4-HFA)* | - | - | - | - |

* valores obtidos em solução contendo apenas KCl $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$.

Comparando os valores de ΔE_p 's obtidos para as sondas redoxes utilizadas (Tabela 8), pôde-se concluir que o complexo catiônico ($\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+}$) representa uma resistência ao circuito elétrico significativamente menor que o complexo aniônico ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$), e isso reflete diretamente nos valores de I_p 's, pois, quanto menor a resistência maior a condutividade elétrica. Os resultados comparativos indicam que o poli(4-HFA) apresenta caráter aniônico por possuir maior afinidade por sondas redoxes positivas. Esta informação é extremamente valiosa no que diz respeito à construção de biossensores eletroquímicos a partir de EG/Poli(4-HFA), pois, permite uma melhor otimização das estratégias aplicadas para a imobilização de biomoléculas em sua superfície.

Tabela 8: Porcentagem de aumento dos E_p 's e das I_p 's observados em solução contendo $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ e $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+}$ para EG/Poli(4-HFA) compara a EG.

| | $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ | | $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+}$ | |
|--|---|---------|---------------------------------|---------|
| | Oxidação | Redução | Oxidação | Redução |
| % E_p (V) | 43,0 | 27,0 | 30,0 | 10,0 |
| % I_p (μA) | 13,0 | 23,9 | 20,8 | 27,6 |

4.1.2 - CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

4.1.2.1 – Análise Termogravimétrica – TGA

Os estudos térmicos do ácido 4-HFA e do polímero poli(4-HFA) foram feitos utilizando a técnica de TG descrita acoplada ao DTA (Análise Térmica Diferencial).

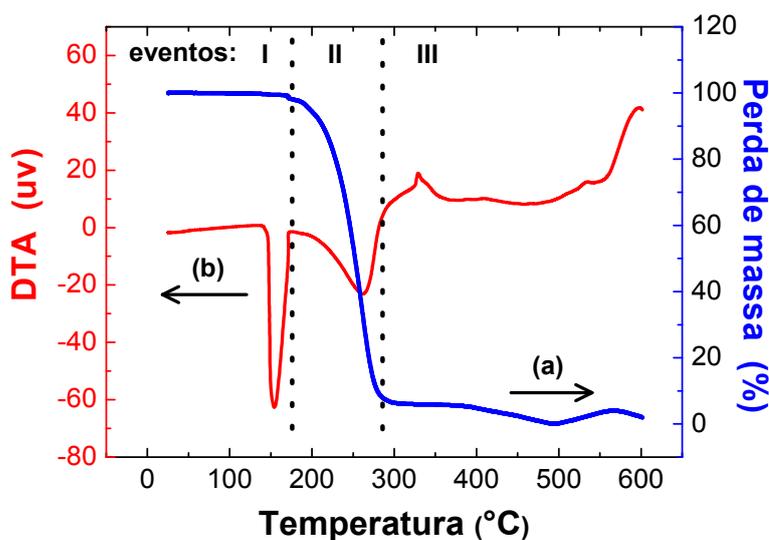


Figura 25: Estudo térmico do ácido 4-hidróxifenilacético: (a) TGA e (b) DTA.

Nos termogramas do ácido 4-HFA (Figura 25) uma endoterma entre 140 °C e 170 °C foi observada e corresponde à fusão do material que é reportado na literatura entre 148 e 151 °C¹²⁸ (evento I). Essa endoterma é acompanhada por uma perda de 0,33% da massa da amostra, indicando saída de água de absorção. Logo após a fusão observou-se uma segunda endoterma entre 149,10 e 292,00 °C (evento II) que representa a perda de 93,17% da massa da amostra e é atribuída ao início da decomposição do material. A segunda etapa dessa decomposição encontra-se entre 292,00 e 479,73 °C (evento III), e representa a perda dos 6,52% da massa restante. O aumento da temperatura pode favorecer a ocorrência de reações entre as moléculas do material, o que, conseqüentemente, leva a formação de moléculas maiores. Estas novas estruturas possuem maior massa molar média que o material de partida, logo, apresentam maior resistência térmica justificando os dois eventos observados na decomposição térmica do material em questão.

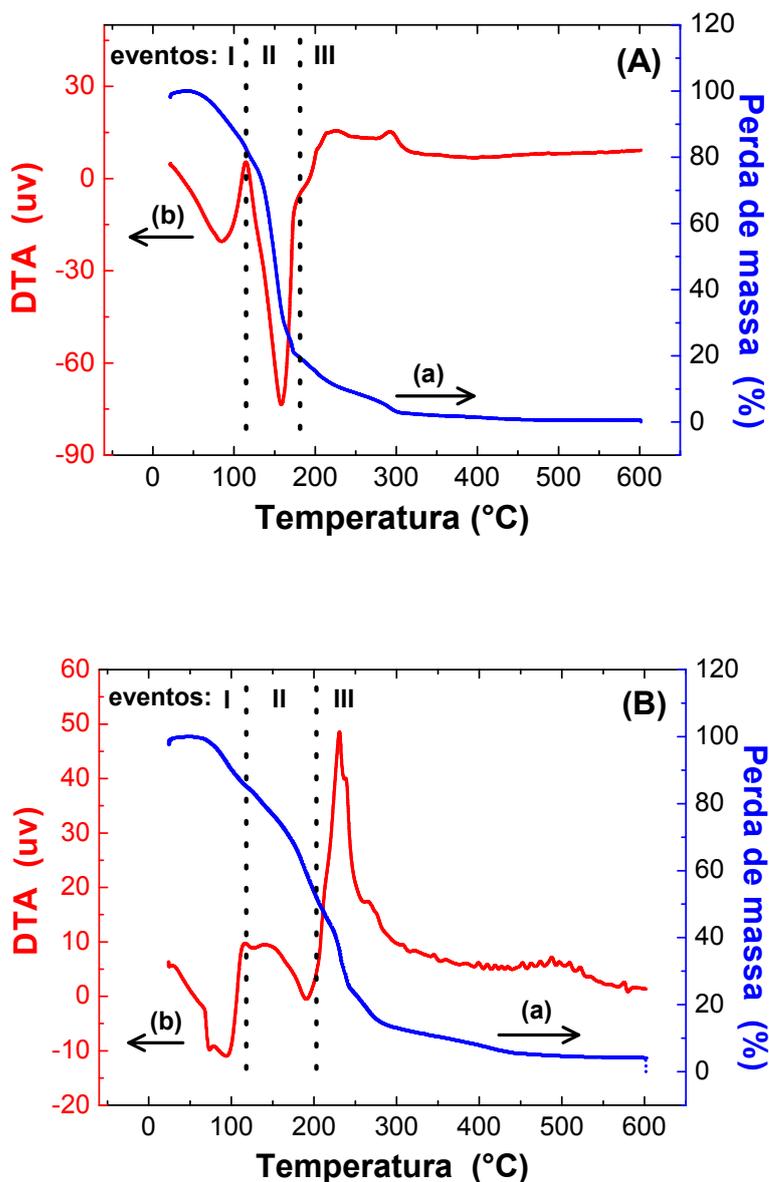


Figura 26: Estudo térmico do poli(4-HFA): (A) antes do tratamento térmico, sendo (a) TGA e (b) DTA, e (B) após tratamento térmico, sendo (a) TGA e (b) DTA.

O perfil dos termogramas obtidos para o poli(4-HFA) (Figura 26-A) indica que a perda de massa ocorre preferencialmente devido a decomposição do material, pois, esta ocorre em uma extensa faixa de temperatura, observada entre 22,33 e 442,24 °C, onde um total de 99,07% da massa da amostra é perdida. Três endotermas acompanham essa perda de massa. A primeira (evento I) encontra-se entre 22,33 e 110,99 °C e, provavelmente, está relacionada com a saída de solvente remanescente da extração (acetonitrila; P.E. 82 °C¹²⁸) e

água (material hidrofílico), e representa uma perda de 14,62% da massa da amostra. A segunda (evento II) indica o primeiro estágio da decomposição do polímero e encontra-se entre 110,99 e 197,80 °C, onde uma perda de mais 68,91% da massa foi observada. Essa endoterma pode estar associada a decomposição de oligômeros de menor massa molar média. Processos de fusão e decomposição de monômeros remanescentes da eletropolimerização também podem estar associados a essa endoterma por esta encontra-se em faixa de temperatura semelhante aquela observada nos termogramas do monômero. Os outros 15,54% da massa são perdidos em uma faixa de temperatura consideravelmente maior que as anteriores, entre 176,00 e 442,24 °C (evento III), e indicam a decomposição de oligômeros de maior massa molar média. Os 0,93% restantes da massa não sofrem decomposição até os 600 °C analisados.

Considerando esses resultados uma segunda condição foi estudada visando eliminar as respostas que possam estar relacionadas à presença do solvente usado na extração e de água hidrofílica. Para explorarmos tal estratégia, a amostra foi submetida a uma temperatura constante de 120 °C na estufa durante, aproximadamente, 4 horas. A temperatura foi escolhida com base na temperatura final da primeira endoterma observada na Figura 26-A.

A decomposição do material continua ocorrendo numa extensa faixa de temperatura após o tratamento térmico (Figura 26-B), porém, com valores maiores que aqueles observados antes desse tratamento. Essa faixa de temperatura encontra-se entre 56,41 e 546,57 °C e representa a perda de 95,65% da massa da amostra. Três endotermas acompanham essa decomposição. A primeira (evento I) é observada numa faixa de temperatura semelhante aquela apresentada pelo material antes do tratamento térmico, entre 28,70 e 112,21 °C, e representa uma perda de 13,91% da massa da amostra. O perfil dessa endoterma indica a ocorrência de três etapas diferentes que, provavelmente, correspondem a saída de acetonitrila, de água hidrofílica e/ou de hidratação e de contra-íons que, possivelmente, foram aprisionados no filme durante a eletropolimerização. A segunda endoterma (evento II) é observada entre 147,39 e 208,24 °C e representa a perda de mais 27,99% de massa. Essa endoterma pode estar relacionada a decomposição de oligômeros de baixa massa molar média presentes na amostra. E a terceira (evento III), observada entre 208,24 e 509,50 °C, representa a perda dos outros 53,75% de massa e, provavelmente, indica a decomposição de oligômeros de maior massa molar média. Os 4,35% de massa restante, não sofrem alteração até os 600 °C analisados.

A Tabela 9 apresenta as principais diferenças observadas nos diagramas de TG do monômero e do polímero antes e após tratamento térmico.

Tabela 9: Principais informações observadas nos estudos termogravimétricos do ácido 4-HFA e do Poli(4-HFA).

| | Temperatura (°C) | Perda de Massa (%) | Eventos relacionados |
|-----------------------------|------------------|--------------------|---|
| Monômero | 148,54 | 0,33 | Água de absorção; Fusão. |
| | 149,10 - 292,00 | 93,17 | Decomposição |
| | 292,00 - 479,73 | 6,52 | Decomposição de oligômeros. |
| Polímero¹ | 22,33 - 110,99 | 14,62 | Perda de acetonitrila e água. |
| | 110,99 - 197,80 | 68,91 | Decomposição de monômeros remanescentes e oligômeros de menor massa molar média. |
| | 176,00 - 442,24 | 15,54 | Decomposição de oligômeros de maior massa molar média. |
| | Até 600 | 0,93 | Não ocorre decomposição. |
| Polímero² | 28,70 - 112,21 | 13,91 | Perda de acetonitrila e água. |
| | 147,39 - 208,24 | 27,99 | Fusão de monômeros remanescentes e decomposição de oligômeros de menor massa molar média. |
| | 208,24 - 509,50 | 53,75 | Decomposição de oligômeros de maior massa molar média. |
| | Até 600 | 4,35 | Não ocorre decomposição. |

¹ antes do tratamento térmico; ² após o tratamento térmico.

Durante o processo de eletropolimerização ânions e cátions interagem com a estrutura polimérica no seu estado oxidado e reduzido, respectivamente. Neste sentido, o aprisionamento de contra-íons na malha polimérica do filme é uma característica inerente a esse processo. Além destes, moléculas de água também podem ser aprisionadas formando as chamadas águas de hidratação. A presença dessas substâncias na estrutura do polímero, somadas à do solvente utilizado na extração do material, justificam as diferentes etapas observadas no primeiro evento (evento I) de perda de massa o ácido poli(4-HFA). Etapas estas que ficaram nítidas após o tratamento térmico no qual o polímero foi submetido. Os dois outros eventos de perda de massa ocorrem, também, com diferentes etapas e podem estar associados à decomposição de oligômeros de diferentes massas molares médias. Com o

aumento da temperatura as substâncias presentes na estrutura do filme tendem a deixar-la permitindo que esta melhor se organize proporcionando um aumento na rigidez e uniformidade do material e, conseqüentemente, aumentando a possibilidade de ocorrência de reações de intercruzamento entre as cadeias poliméricas. Estes fatores podem justificar as diferentes etapas observadas no segundo e terceiro eventos da decomposição do polímero, bem como, os diferentes termogramas obtidos antes e após o tratamento térmico deste.

Contudo, os resultados obtidos mostram que o poli(4-HFA) possui certa estabilidade térmica até 110 °C, porém, com perda gradativa de substâncias que compõem sua estrutura e que são essenciais para as propriedades eletroquímicas do material, e isto foi comprovado com os estudos termoeletroquímicos discutidos anteriormente. Após essa temperatura o material sofre diferentes processos de decomposição e de modificações estruturais. No entanto, sua estabilidade térmica não é um fator agravante no que diz respeito a sua aplicabilidade como plataforma para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos, pois, os procedimentos utilizados para construção destes não requerem temperaturas superiores a 100 °C.

4.1.2.2 – Espectroscopia no Ultravioleta Visível (UV-vis) e Fluorescência

Após a polimerização de compostos que apresentam ligações conjugadas, como C=C, C=C-C=O e Ar-OH, espera-se a formação de um material que apresente melhor transição eletrônica que o material de partida devido a obtenção de uma maior extensão de conjugação dessas ligações. Para verificar tal modificação estrutural foi feito o estudo de UV-vis e de fluorescência do poli(4-HFA) obtido por polimerização via eletroquímica do ácido (4-HFA). Esse estudo permite avaliar, também, se essa eletropolimerização ocorre em diferentes posições formando, assim, uma estrutura não uniforme.

O benzeno produz três bandas de absorção características em comprimentos de onda de 184, 204 e 246 nm. Estas bandas originam-se de transições $\pi \rightarrow \pi^*$. A banda a 184 nm é intensa e provém de uma transição permitida. Já as bandas mais fracas a 204 e 256 nm resultam de transições proibidas na molécula do benzeno, altamente simétrica¹¹⁷. O espectro de UV-vis para o ácido 4-HFA apresenta apenas as duas últimas bandas esperadas para o anel aromático, porém, com significativo deslocamento para maiores comprimentos de onda. A

primeira dessas bandas aparece a 223 nm e a segunda a 277 nm apresentando ombro a 284 nm (Figura 27). A presença dos grupos substituintes hidroxila e acético no anel benzênico justificam o deslocamento batocrômico observado, pois, esse possibilita hiperconjugação entre os elétrons π ressonantes do anel com os elétrons σ da ligação C-H do grupo acético, e aquele por ser um grupamento auxocrômico¹¹⁷. Os ácidos carboxílicos saturados apresentam uma banda de absorção fraca próxima de 200 nm resultante da transição proibida $n \rightarrow \pi^*$ que, no caso do ácido 4-HFA, é sobreposta pela banda de absorção do anel aromático em 223 nm.

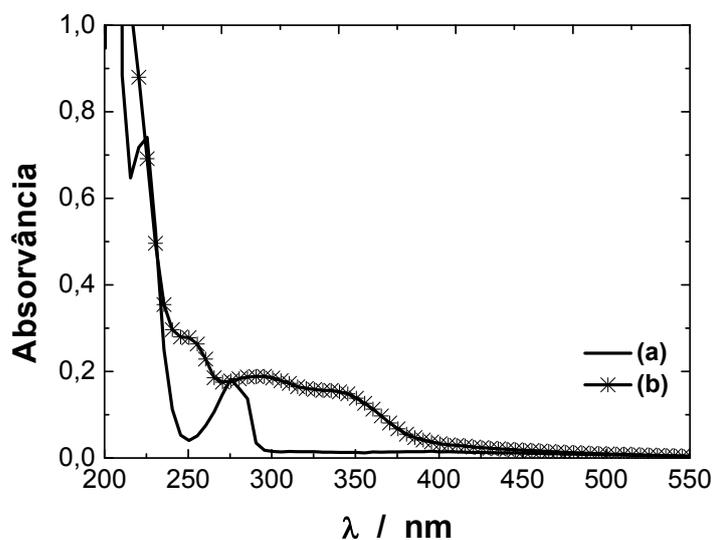


Figura 27: UV-vis para o (a) ácido 4-HFA e para o (b) poli(4-HFA) em acetonitrila.

O ácido poli(4-HFA) apresentou bandas de absorção a 251 nm e a 293 nm com ombro a 342 nm (Figura 27). Essas bandas são largas, de baixa intensidade e o comprimento de onda limite de absorção está acima de 450 nm. Comparando os espectros do monômero e do polímero notou-se que esse perfil dá-se a um considerável deslocamento batocrômico das bandas observadas para o monômero ocasionado, possivelmente, pela substituição de hidrogênios do anel aromático por novos grupos auxocrômicos e/ou fortemente indutores de elétrons durante a eletrossíntese. Notou-se ainda que, enquanto o monômero absorve em comprimentos de onda inferiores a 300 nm, o polímero absorve acima de 450 nm, logo, o polímero apresenta maior absorção na região do visível (acima de 380 nm) que o monômero e necessita de menos energia para que transições eletrônicas sejam criadas. Isso ocorre porque a eletropolimerização forma uma estrutura com maior extensão de conjugação comparada com a do monômero e que, essa nova estrutura, possui menor diferença de energia entre os orbitais

π e π^* . Desse modo, espera-se que o ácido poli(4-HFA) apresente condutividade elétrica consideravelmente maior que o monômero, e esse fato pôde ser comprovado pelos estudos eletroquímicos discutidos anteriormente.

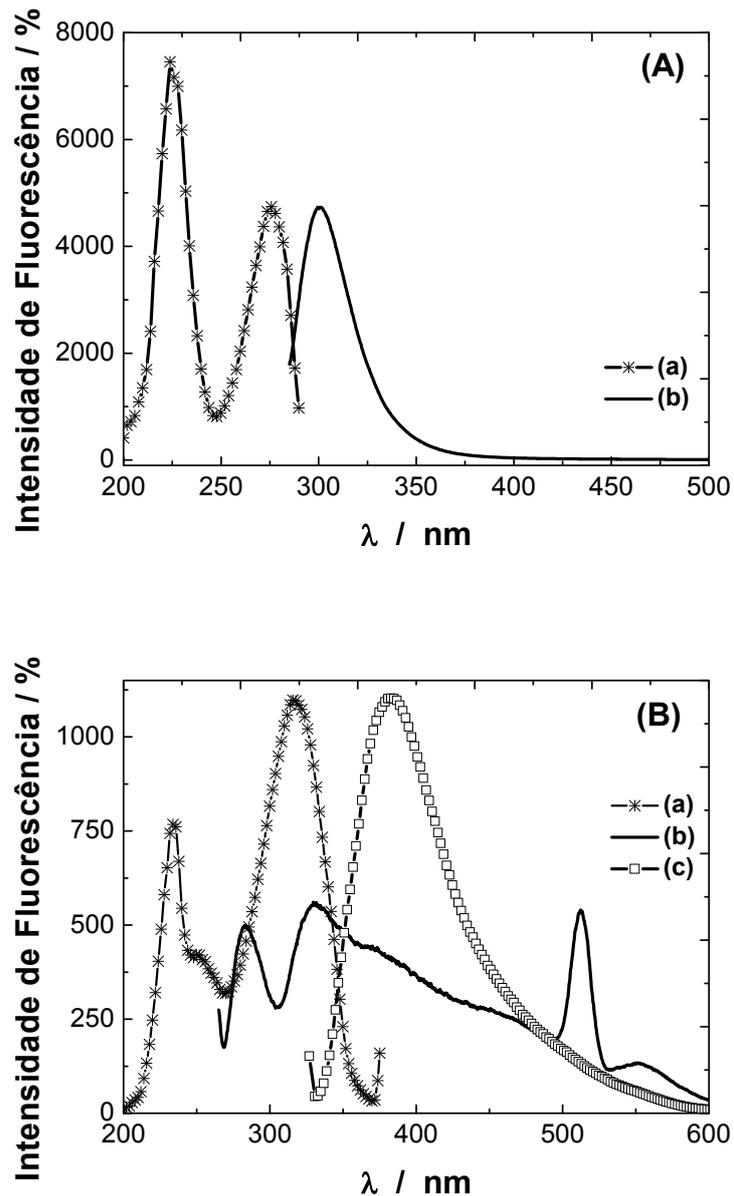


Figura 28: Fluorescência para (A) ácido 4-HFA, sendo (a) emissão e (b) excitação, e para o (B) ácido poli(4-HFA), sendo (a) excitação, (b) emissão para excitação em 255 nm e (c) emissão para excitação em 317 nm.

O espectro de fluorescência para o 4-HFA (Figura 28-A) mostrou uma banda de excitação em torno de 275 nm, e uma emissão em torno de 300 nm. Essas bandas são muito semelhantes, o que indica que os grupos que absorvem são os mesmos que emitem. Esse fenômeno é denominado efeito homotético¹¹⁷. Os espectros de UV-vis indicaram que o ácido poli(4-HFA) possui novos substituintes no anel aromático e ainda, que estes contribuem para o aumento da extensão de conjugação. Neste sentido, diferentes grupos cromóforos eram esperados para o polímero, e isso pôde ser observado no seu espectro de excitação e emissão de fluorescência (Figura 28-B). Nesse espectro, a excitação é caracterizada por uma banda em torno de 240 nm e outra mais intensa em torno de 300 nm. Vários espectros de emissão foram estudados para excitações em diferentes comprimentos de onda, no entanto, as emissões obtidas para excitações em 255 e 317 nm demonstraram claramente a presença de cromóforos diferentes na estrutura do polímero. Há certa semelhança entre as bandas de excitação e emissão, o que indica a existência do efeito homotético também no polímero. Comparando os espectros de fluorescência do monômero e do polímero (Figura 29), foi possível notar que o deslocamento batocrômico apresentado nos espectros de UV-vis do polímero em relação ao monômero, também ocorre para os máximos de emissão de fluorescência. Este efeito prova, novamente, que o polímero apresenta melhor deslocalização eletrônica dos elétrons π .

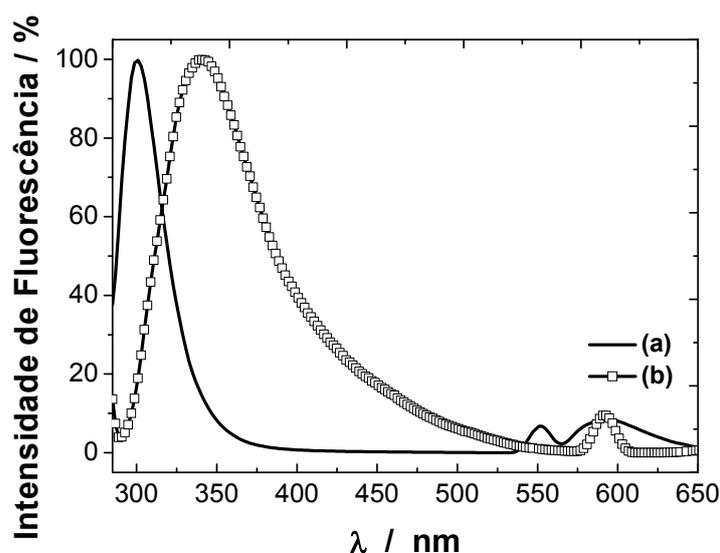


Figura 29: Comparação das bandas de emissão do (a) ácido 4-HFA e (b) do poli(4-HFA) excitado em 317nm.

Contudo, os estudos de UV-vis e de fluorescência permitiram comprovar a condutividade elétrica do ácido poli(4-HFA) por meio da diferença de energia entre os orbitais π e π^* . Permitiram ainda supor que o anel aromático possui novos substituintes após a eletropolimerização e que estes substituintes contribuem para o aumento da extensão de conjugação, ou seja, são cromóforos. Neste sentido, estudos de FTIR fizeram-se necessários para que as discussões a respeito da identificação desses novos substituintes, bem como, de suas posições no anel aromático, fossem iniciadas.

4.1.2.3 – Espectroscopia no Infravermelho - IR

Os estudos de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foram realizados com objetivo de estudar os grupos funcionais predominantes no polímero obtido a partir da eletropolimerização do ácido (4-HFA). Foram feitas leituras de FTIR para o monômero e para o polímero, e para este, duas situações foram analisadas. Primeiramente o FTIR foi feito diretamente no material obtido na extração, em seguida o ácido poli(4-HFA) foi submetido a temperatura constante de 100 °C durante 4 horas em atmosfera inerte. Essa temperatura foi escolhida com base no pré-aquecimento no qual alguns eletrodos modificados são submetidos para construção de genossensores eletroquímicos, e o objetivo desse tratamento térmico foi verificar se os grupos funcionais sofrem modificações nessas condições, bem como, de eliminar possíveis respostas relacionadas à presença de solvente remanescente da extração (acetonitrila) e de água de absorção e/ou de hidratação.

A presença do grupo hidroxila na estrutura do ácido 4-HFA é marcante no espectro (Figura 30), podendo ser identificada pela deformação axial da ligação O-H entre 3500 e 2500 cm^{-1} . O tipo de ligação de hidrogênio intermolecular difere entre os grupos fenol e ácido carboxílico, e isso permite diferenciar, no espectro de FTIR, as hidroxilas que caracterizam esses grupos funcionais¹¹⁸. Desta forma, o pico bem definido em 3259 cm^{-1} indica que a deformação axial da ligação O-H é de ácido carboxílico. As deformações angulares no plano e fora do plano dessas ligações também indicam hidroxila de ácido carboxílico. Essas deformações aparecem em 1415 e 905 cm^{-1} , respectivamente. Já a hidroxila do grupo fenol é muito bem evidenciada na banda de deformação axial assimétrica da ligação C=C-O, pois,

esta se apresenta muito intensa em 1224 cm^{-1} e, nesta posição, caracteriza grupos fenóis que possuem substituintes levemente indutores de elétrons, como o grupo acético.

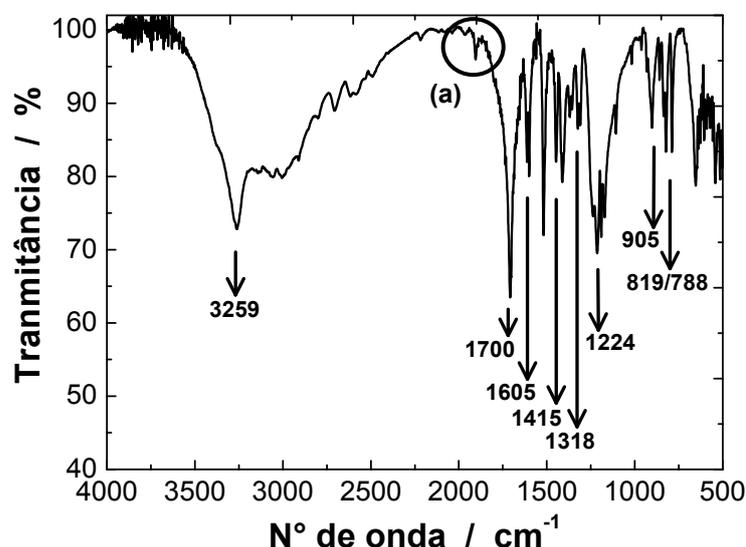


Figura 30: FTIR do ácido (4-HFA).

A deformação axial da ligação C=O aparece na região característica de carbonila de ácido carboxílico, em 1700 cm^{-1} . É importante ressaltar que as ligações de hidrogênio intermolecular e a presença de um grupo indutor de elétrons, no caso o fenol, abaixam a frequência de absorção da carbonila, assim, essa banda encontra-se em número de ondas levemente mais baixo que o esperado para ácidos alifáticos saturados, que seria em 1760 cm^{-1} ¹¹⁸. A deformação axial característica da ligação C-O em 1318 cm^{-1} , apesar de aparecer fraca e pouco intensa no espectro, também caracteriza o grupo carboxila.

A deformação axial das ligações C=C aparece em 1605 cm^{-1} . Essa deformação corresponde ao esqueleto do anel aromático e melhor evidencia sua presença na estrutura. A deformação axial das ligações C=C-H do anel aromático aparece em picos discretos entre 3100 e 3000 cm^{-1} . A deformação angular no plano dessas ligações aparece em 905 cm^{-1} , e as fora do plano aparecem discretamente com seu pico duplo característico em 788 e 819 cm^{-1} . A posição dessas deformações somadas ao perfil observado para as harmônicas (ou bandas de combinação), entre 1920 e 1880 cm^{-1} (Figura 31), indicam anel aromático *para*-dissubstituído. A Figura 32 apresenta o perfil esperado para as harmônicas de anéis aromáticos de acordo com seu número de substituintes. É importante ressaltar que

substituintes fortemente polares, como a hidroxila, deslocam as harmônicas para maiores números de onda e provocam distorções no perfil esperado para essas bandas. A Tabela 10 apresenta os valores esperados para as funções orgânicas presentes no ácido 4-HFA.

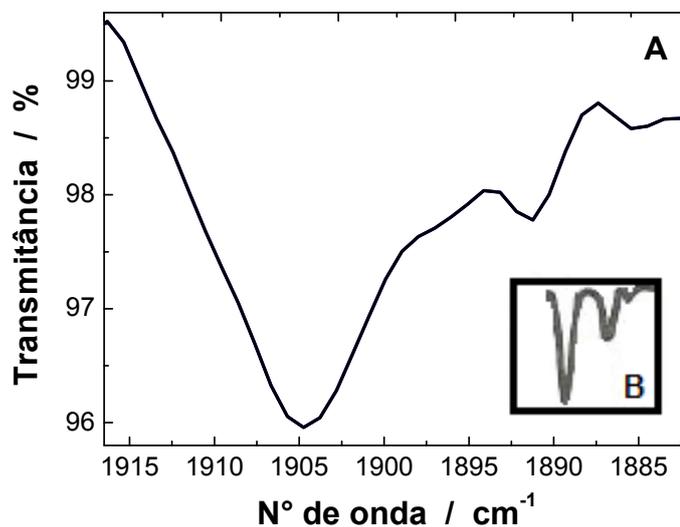


Figura 31: (A) ampliação da região das deformações harmônicas observada e identificada por (a) no espectro de FTIR do ácido 4-HFA , (B) perfil esperado para deformações harmônicas de anéis aromáticos para-dissubstituídos, conforme apresentado na Figura 15.

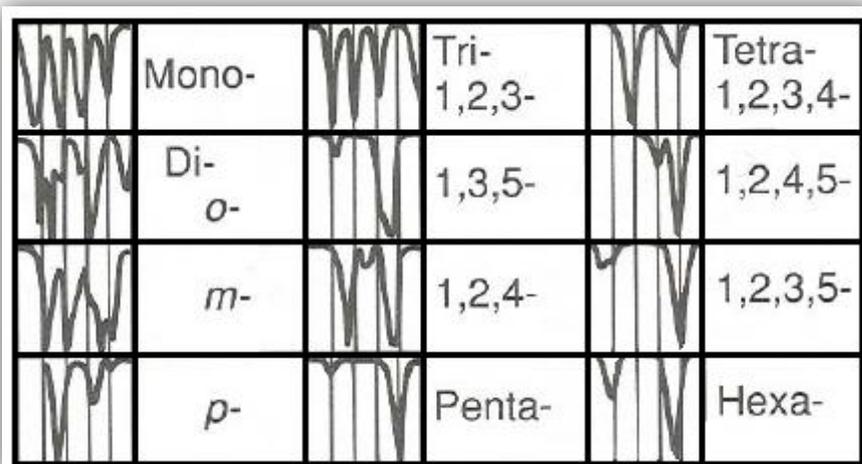


Figura 32: Perfil esperado para deformações harmônicas de anéis aromáticos, entre 2000 e 1660 cm^{-1} , de acordo com o número de substituintes.

Tabela 10: Número de onda esperado as funções orgânicas presentes no ácido 4-HFA¹²⁹.

| Função Orgânica | Vibração | λ (cm ⁻¹) |
|--------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| Ácido Carboxílico | <i>C=O, axial saturada</i> | 1730-1700 |
| | <i>C=O, axial aromática</i> | 1710-1680 |
| | <i>C-O, axial</i> | 1320-1210 |
| | <i>O-H axial</i> | 3500-2500 (<i>larga e intensa</i>) |
| | <i>O-H angular no plano</i> | 1440-1395 |
| | <i>O-H angular fora do plano</i> | 960-900 |
| Fenol | <i>O-H, axial</i> | 3345 (<i>larga e bem definida</i>) |
| | <i>O-H, angular no plano</i> | 1367 |
| | <i>C-C-O, axial assimétrica</i> | 1231 |

Já no espectro do ácido poli(4-HFA), apresentado na Figura 33, a presença da hidroxila é muito bem evidenciada pela banda correspondente a deformação axial da ligação O-H entre 2507 e 3661 cm⁻¹. Essa banda é larga, intensa e bem definida, com pico máximo de transmitância em 3406 cm⁻¹. Esse perfil indica a existência de fortes ligações de hidrogênio e inviabiliza a identificação da função orgânica por ela responsável, pois, estas podem ser fenol, ácido carboxílico ou ainda água hidrofílica e/ou de hidratação. A banda em 1700 cm⁻¹, que caracteriza o grupo carbonila de ácido carboxílico, aparece com intensidade muito fraca no espectro do polímero, porém, somada a banda de deformação angular fora do plano da ligação O-H de ácido carboxílico, que aparece em 930 cm⁻¹, indica que esse grupo está presente na estrutura do polímero. Uma banda forte e muito intensa aparece entre 1011 e 1296 cm⁻¹, e apresenta dois picos com máximo de transmitância em 1095 e 1148 cm⁻¹. Comparando as várias funções orgânicas que podem apresentar bandas de deformação nessa região (Tabela 11), pode-se afirmar que esses picos são muito mais característicos de deformações axiais simétricas e assimétricas, respectivamente, de éteres difenílicos (Ar-O-Ar) que qualquer outra função. Contudo, não é descartada a presença de alguns grupamentos fenóis e ésteres, pois, estes podem ser formados por meio de reações químicas entre os grupos fenol e ácido carboxílico dos monômeros, e aqueles podem ser preservados em possíveis mecanismos de eletropolimerização via radicalar. Os possíveis mecanismos de eletropolimerização propostos indicam que grupos cetona não estão presentes na estrutura do polímero.

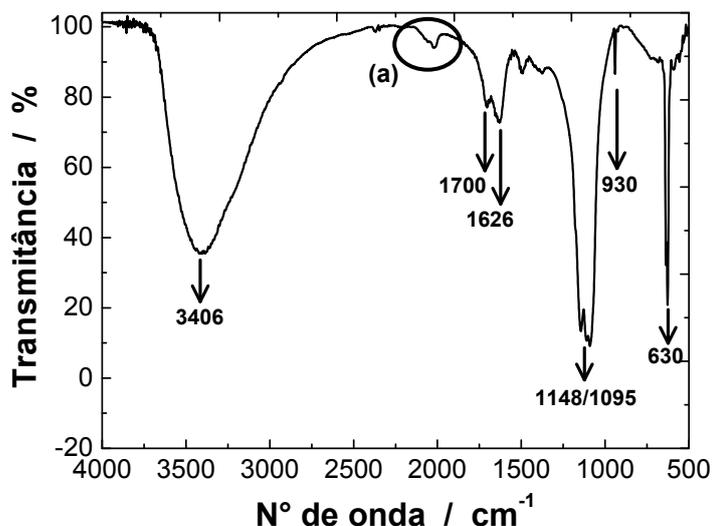


Figura 33: FTIR para o poli(4-HFA) obtido na extração.

Tabela 11: Deformações esperadas entre 1011 e 1296 cm^{-1} (* Aromático)¹¹⁸.

| Deformação | Grupo funcional | λ (cm^{-1}) |
|-------------------------------|-----------------|--------------------------------|
| Ar-C(=O)-C, angular no plano* | Cetona | 1181 |
| Ar-O, axial* | Fenol | 1220 |
| C(=O)-C, axial | Éster | 1223 |
| C=C-O, axial | Éster | 1200 |
| C-O-C, axial simétrica | Éter | 1075-1200 |
| C-O-C, axial assimétrica | Éter | 1275-1200 |

A deformação angular fora do plano das ligações C=C, correspondentes ao esqueleto do anel aromático, cuja identificação era impossível no espectro do monômero, tem presença marcante no espectro do polímero, aparecendo com forte intensidade em 630 cm^{-1} . Já as deformações axiais dessas ligações mostraram-se em uma banda levemente mais larga e intensa em 1626 cm^{-1} . Essas observações indicam um aumento na extensão de conjugação do anel aromático que pode estar associado com a formação de ligações anel-anel durante a eletropolimerização. O perfil apresentado pelas deformações harmônicas (Figura 34) apresentam mais semelhanças com harmônicas de anéis *tetra*-1,2,4,5-substituído que com qualquer outro perfil esperado para anéis substituídos (Figura 32), sugerindo a existência de novos substituintes nas regiões *orto* e *meta* após a eletropolimerização.

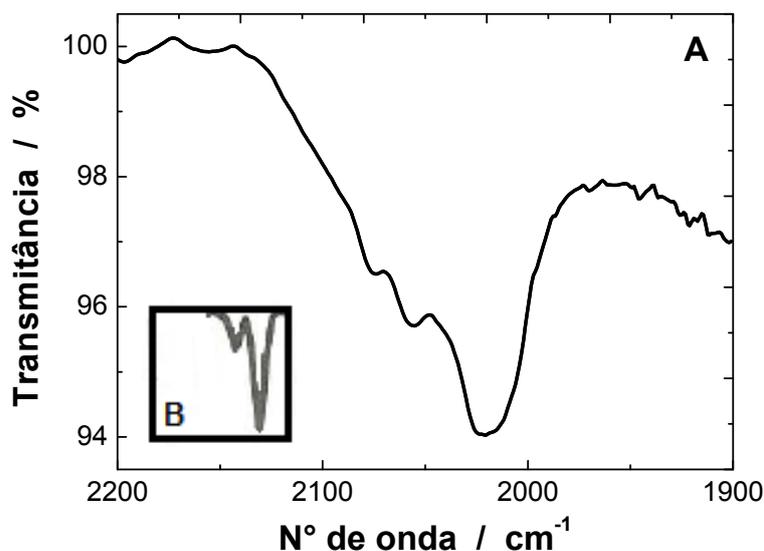


Figura 34: (A) ampliação da região das deformações harmônicas observada e identificada por (a) no espectro de FTIR do ácido 4-HFA, (B) perfil esperado para deformações harmônicas de anéis aromáticos para-dissubstituídos, conforme apresentado na Figura 15.

A Figura 35-A compara os espectros de FTIR do monômero e do polímero, mostrando as principais modificações estruturais ocorridas após a eletropolimerização. Já a Figura 35-B compara os espectros de FTIR do polímero antes e após o tratamento térmico. Após o tratamento térmico três mudanças no espectro do polímero foram notadas. A primeira mudança é observada na banda de deformação axial da hidroxila. O pico máximo de transmitância dessa banda em 3406 cm^{-1} prevalece, porém, há o aparecimento de dois ombros em 2500 e 3200 cm^{-1} , característicos de deformações axiais C-H e C=C-H, respectivamente, indicando que houve uma redução no número de ligações de hidrogênio intermolecular devido, provavelmente, a saída da água hidrofílica e/ou de hidratação. Em seguida, pode-se notar que a banda de deformação axial da ligação C=O está sobreposta com a banda de deformação axial das ligações C=C do esqueleto aromático em 1637 cm^{-1} . Entretanto, esta banda torna-se mais intensa após o tratamento térmico e indica uma maior extensão de conjugação das ligações C=C. Finalmente, nota-se que a banda de deformação angular fora do plano das ligações C=C do anel aromático, em 630 cm^{-1} , também apresenta um aumento na intensidade após o tratamento térmico.

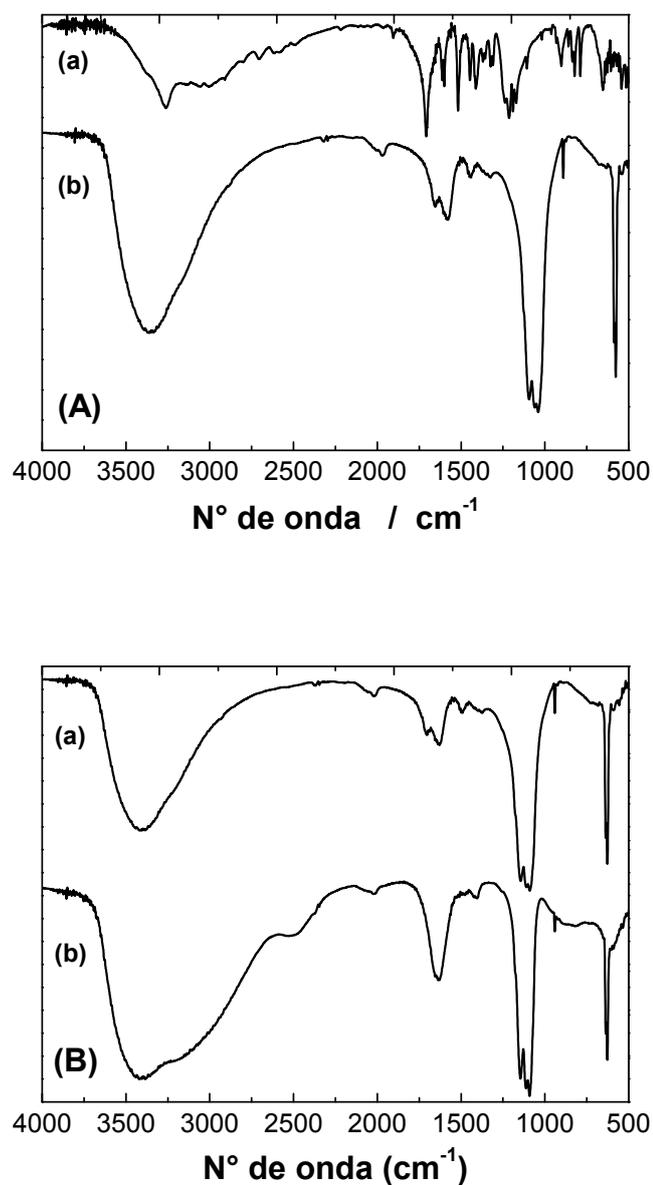


Figura 35: (A) FTIR do (a) monômero e do (b) polímero. (B) FTIR para o ácido poli(4-HFA) (a) antes e (b) após o tratamento térmico.

Contudo, as informações obtidas com os estudos de FTIR (Tabela 12) indicaram uma grande tendência à formação de grupamentos éteres e, também, de ligações anel-anel durante o processo de eletrossíntese do ácido poli(4-HFA), e ainda, que esses novos grupamentos estejam ligados preferencialmente nas posições *orto* e *meta* dos anéis aromáticos. Os estudos mostraram também que os grupos funcionais presentes no monômero são preservados após a eletropolimerização. As modificações observadas após o tratamento térmico do polímero

indicaram que possíveis polimerizações químicas entre monômeros remanescentes da eletropolimerização e/ou oligômeros-monômeros e/ou oligômeros-oligômeros, ou ainda, entre as próprias cadeias poliméricas (intercruzamento), podem ocorrer com o aumento da temperatura reforçando, assim, os resultados obtidos nos estudos termogravimétricos do material. Por fim, possíveis mecanismos de reação capazes de explicar os resultados obtidos nos estudos espectroscópicos do ácido poli(4-HFA) foram propostos.

Tabela 12: Principais alterações observadas entre o espectro de FTIR do monômero e do polímero antes e após o tratamento térmico.

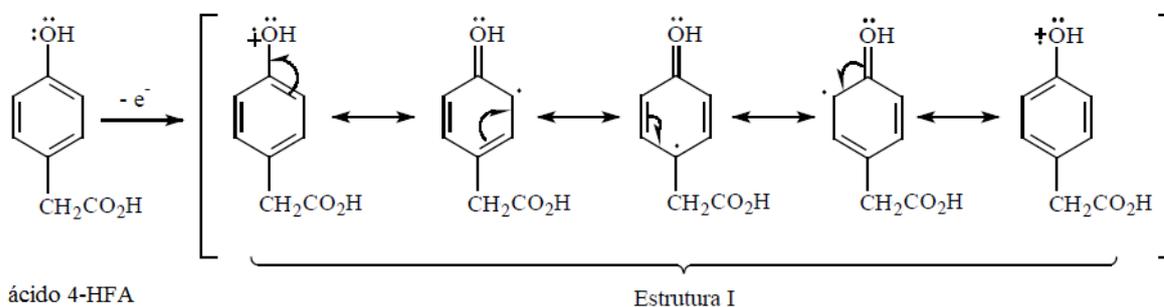
| Deformações | Monômero | | Polímero | | Após 100 °C | |
|-------------------------------------|--------------------------------|---|--------------------------------|---|--------------------------------|--|
| | Nº de onda (cm ⁻¹) | Descrição | Nº de onda (cm ⁻¹) | Descrição | Nº de onda (cm ⁻¹) | Descrição |
| <i>O-H, axial</i> | 2500-3500 | <i>L; F; pico em 3259 cm⁻¹</i> | 2500-3500 | <i>L; F; pico em 3406 cm⁻¹</i> | 2500-3500 | <i>L; F; pico em 3406 cm⁻¹; ombros em 2500 e 3200 cm⁻¹</i> |
| <i>C=O, axial</i> | 1700 | <i>Forte; Intensa</i> | 1700 | <i>fraca</i> | - | <i>Não aparece ou está sobreposta em 1637 cm⁻¹</i> |
| <i>C-O, axial</i> | 1318 | <i>Fraca ; pouco intensa</i> | Sobreposta entre 1000 e 1200 | <i>Forte</i> | Sobreposta entre 1000 e 1200 | <i>Muito Forte</i> |
| <i>C-O-C, axial assimétrica</i> | - | - | - | <i>Sobreposta entre 1000 e 1200</i> | - | <i>Sobreposta entre 1000 e 1200</i> |
| <i>C-O-C, axial simétrica</i> | - | - | - | <i>Sobreposta entre 1000 e 1200</i> | - | <i>Sobreposta entre 1000 e 1200</i> |
| <i>C=C-H, axial</i> | 3000-3100 | <i>Discreta</i> | - | <i>Sobreposta</i> | - | <i>Sobreposta</i> |
| <i>C=C-H, angular fora do plano</i> | 788 e 819 | <i>Muito fraca; pico duplo</i> | - | <i>Não aparece</i> | - | <i>Não aparece</i> |
| <i>C=C, axial</i> | 1605 | <i>média</i> | 1626 | <i>leve aumento na intensidade</i> | 1637 | <i>Forte</i> |
| <i>Harmônica s</i> | 1800-2000 | <i>para-dissubstituídos</i> | 1800-2000 | <i>tetra-1,2,4,5-substituído</i> | - | <i>Sem modificação</i> |

4.1.2.4 - Mecanismo proposto para eletropolimerização do ácido 4-HFA

A estrutura de um polímero derivado do ácido 4-hidroxibenzoico (4-HBA)¹³⁰. As técnicas espectroscópicas utilizadas nessa investigação estrutural foram as mesmas aplicadas ao estudo do ácido poli(4-HFA). As várias semelhanças entre os espectros desses dois materiais poliméricos não se dão somente pelo fato de seus respectivos monômeros serem homólogos, mas, também, devido às condições da eletrossíntese, bem como, de extração dos materiais, serem exatamente as mesmas. Neste sentido, os dois mecanismos de eletropolimerização do ácido 4-HFA, propostos neste trabalho, são idênticos aos mecanismos propostos para o 4-HBA que, por sua vez, são baseados no mecanismo proposto recentemente por Benyoucef e colaboradores¹³¹ para o polímero obtido por eletropolimerização, sobre eletrodo de ouro e grafite em meio aquoso, do ácido 2-aminobenzoico (2-AAB) utilizando-se ácido perclórico como eletrólito suporte e VC como técnica eletroquímica.

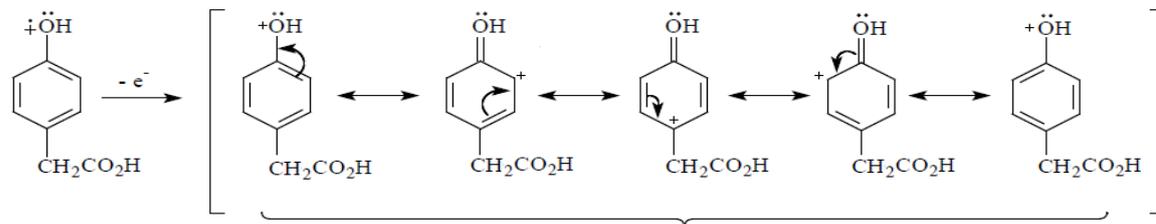
Para a primeira proposta mecanística (Figura 36) levou-se em consideração que o produto é formado preferencialmente por ataque nucleofílico e não radicalar conforme descrito por Benyoucef, e ainda, que reações EEC (Eletroquímica/Eletroquímica/Química) e/ou ECE (Eletroquímica/Química/Eletroquímica) possam ocorrer durante a eletrossíntese.

Etapa 1: Oxidação eletroquímica do ácido 4-HFA



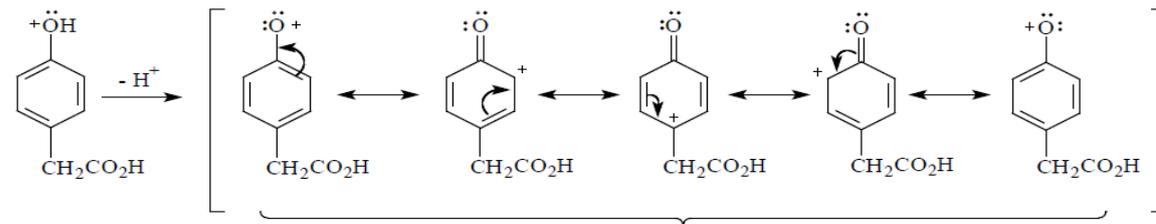
Etapa 2: Caminhos de reação EEC e ECE

Etapa 2.1: Mecanismo EEC



Estrutura I

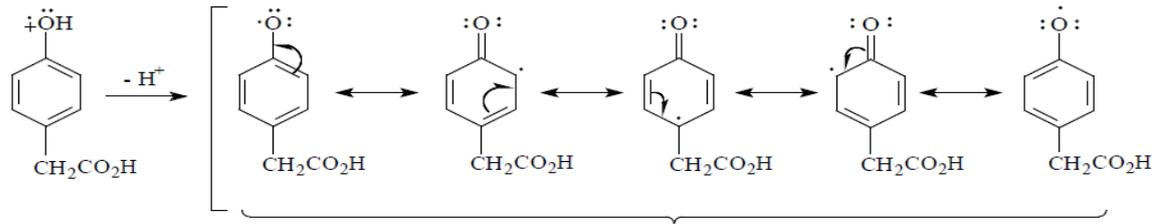
Estrutura II



Estrutura II

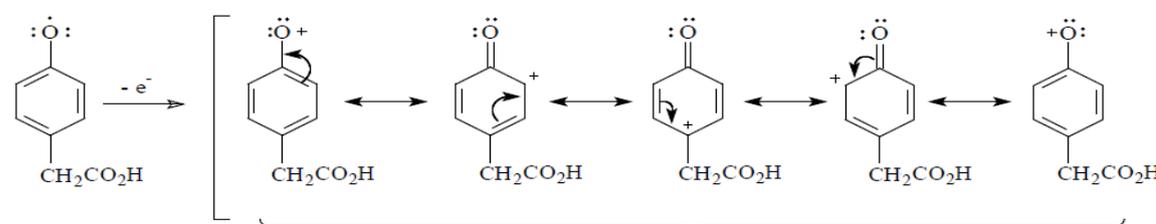
Estrutura III

Etapa 2.2: Reação ECE



Estrutura I

Estrutura IV

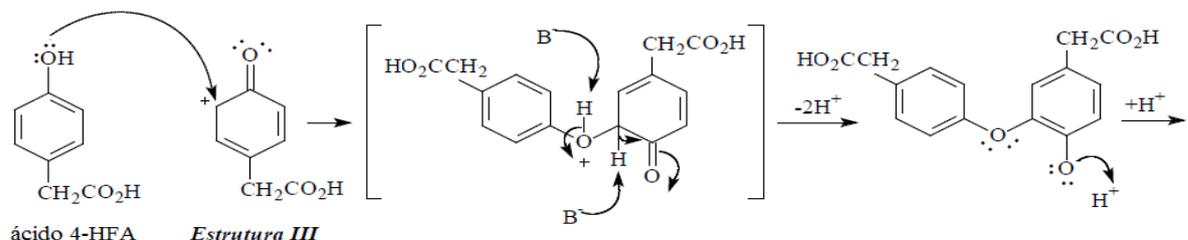


Estrutura IV

Estrutura III

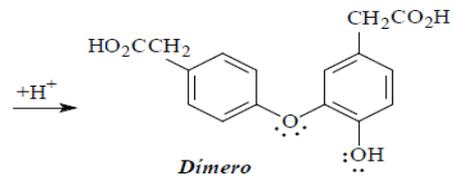
Etapa 3: Acoplamentos

Etapa 3.1: Formação de Dímeros



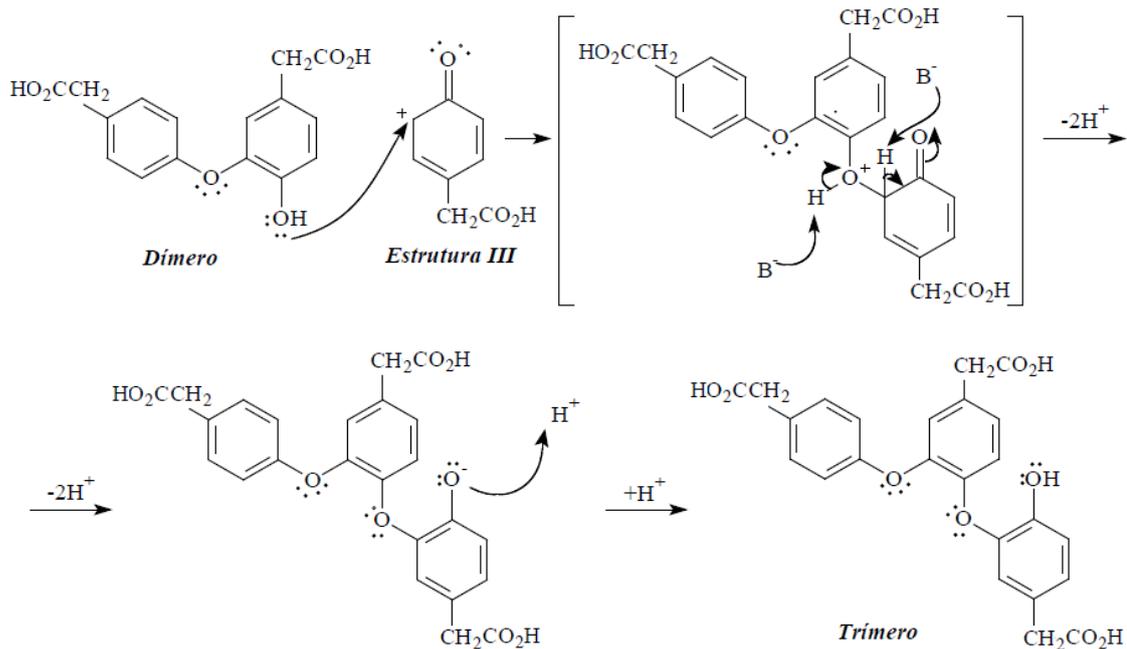
ácido 4-HFA

Estrutura III



Dímero

Etapa 3.2: Formação de Trímeros



Etapa 3.3: Formação de Tetrâmeros

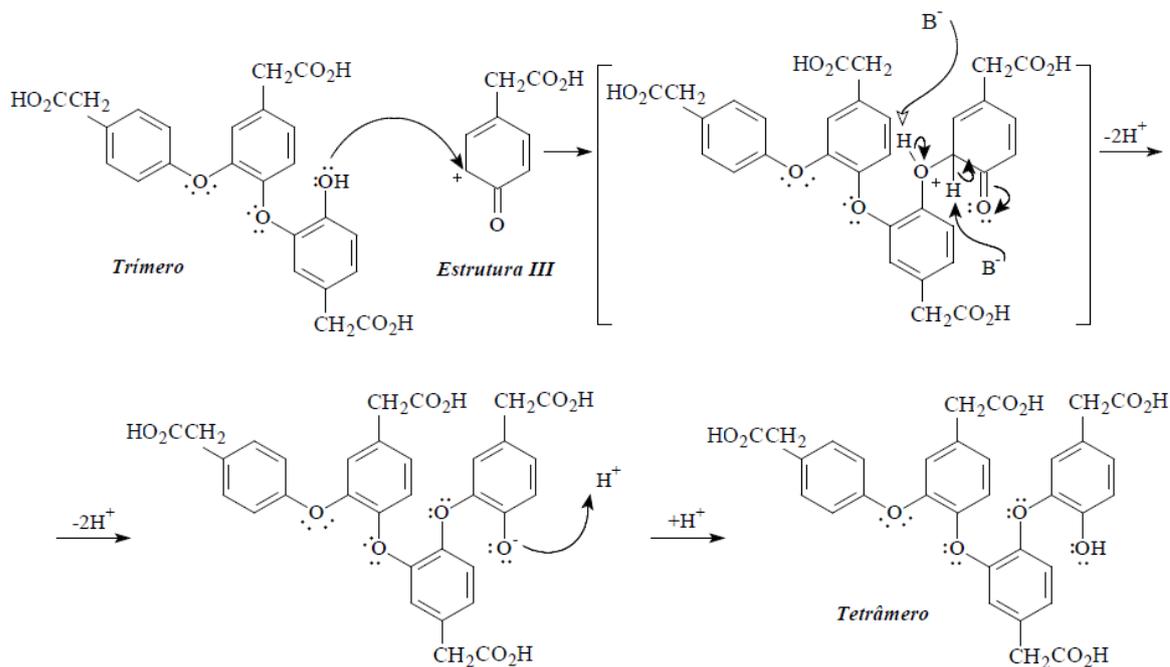


Figura 36: Mecanismo proposto para a eletropolimerização do ácido 4-HFA¹³⁰.

Na etapa I, ocorre a oxidação eletroquímica do monômero, com a perda de um elétron. Após esta oxidação é formado o cátion-radical que é estabilizado por suas respectivas

estruturas de ressonância¹³⁰. Esta estrutura é o precursor do processo de eletropolimerização do ácido 4-HFA.

Na etapa 2, a partir da formação do cátion-radical, o mecanismo pode seguir dois caminhos, EEC (Eletroquímico/Eletroquímico/Químico – Etapa 2.1) ou ECE (Eletroquímico/Químico/Eletroquímico – Etapa 2.2)¹³⁰. Para o EEC, ocorrem duas oxidações sucessivas, com perda de um elétron em cada etapa, e posterior retirada de um próton na etapa química, e, para a etapa ECE, há uma oxidação, perda de um próton e conseqüente oxidação. É importante ressaltar que ambos os mecanismos levam a formação da mesma estrutura. A estrutura III é, portanto, o produto mais estável da reação EEC ou ECE e deve participar no processo de eletropolimerização do ácido 4-HFA. Este intermediário, sendo um cátion, é mais susceptível ao ataque eletrofílico do ácido 4-HFA do que o cátion radical, conforme proposto por Benyoucef. Desta forma, a proposta mecanística mais provável se dá pela interação do cátion/monômero e não cátion-radical/monômero.

Na etapa III, o par de elétrons do oxigênio da hidroxila do ácido 4-HFA ataca o carbocátion, via ataque nucleofílico, formando a ligação C-O-C e produzindo um novo carbocátion intermediário. A perda de dois prótons deste carbocátion origina o produto de substituição (éter aromático). Devido ao meio fortemente ácido (HClO_4 0,50 mol.dm⁻³) é pouco provável a existência deste ânion no meio reacional¹³⁰. Deste modo, o ataque a um próton é extremamente favorável formando um dímero com carga neutra (Etapa 3.1). De maneira análoga, a hidroxila do dímero ataca outro carbocátion, seguindo o mesmo mecanismo, levando a formação do trímero (Etapa 3.2), e consecutivamente a reação se propaga na formação do tetrâmero (Etapa 3.3) até a formação das cadeias poliméricas maiores¹³⁰. Contudo, esse mecanismo mostra-se bastante plausível para explicar a formação dos éteres aromáticos observados nos espectros de FTIR do material.

O segundo mecanismo proposto leva em consideração a eletropolimerização via radicalar envolvendo a estrutura IV. Essa rota de polimerização é idêntica a rota proposta por Benyoucef e, para melhor compreendê-la, o radical será considerado conforme apresentado na Figura 37.

Os encadeamentos possíveis podem ser expressos como: cabeça-cauda; cabeça-cabeça e cauda-cauda¹³⁰. As estruturas resultantes são apresentadas na Figura 38. Observa-se que para o acoplamento cabeça-cauda, o produto gerado é o mesmo da substituição nucleofílica. Já o acoplamento cauda-cauda forma ligações anel-anel e contribuem para justificar o grande

aumento na intensidade das bandas de deformação angular fora do plano das ligações C=C observado nos espectros de FTIR após a eletropolimerização do ácido 4-HFA. Acoplamentos cabeça-cabeça podem ocorrer, e, neste caso, grupos funcionais peróxidos são formados. Contudo, essa proposta mecanística justifica a presença de diferentes grupos cromóforos na estrutura do polímero, conforme observados nos seus espectros de fluorescência.

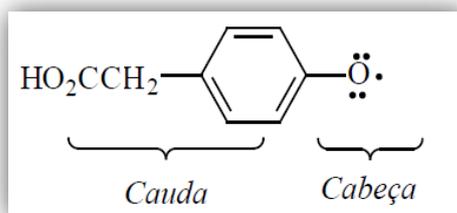


Figura 37: Estrutura radicalar envolvida no segundo mecanismo de eletropolimerização proposto para o ácido 4-HFA.

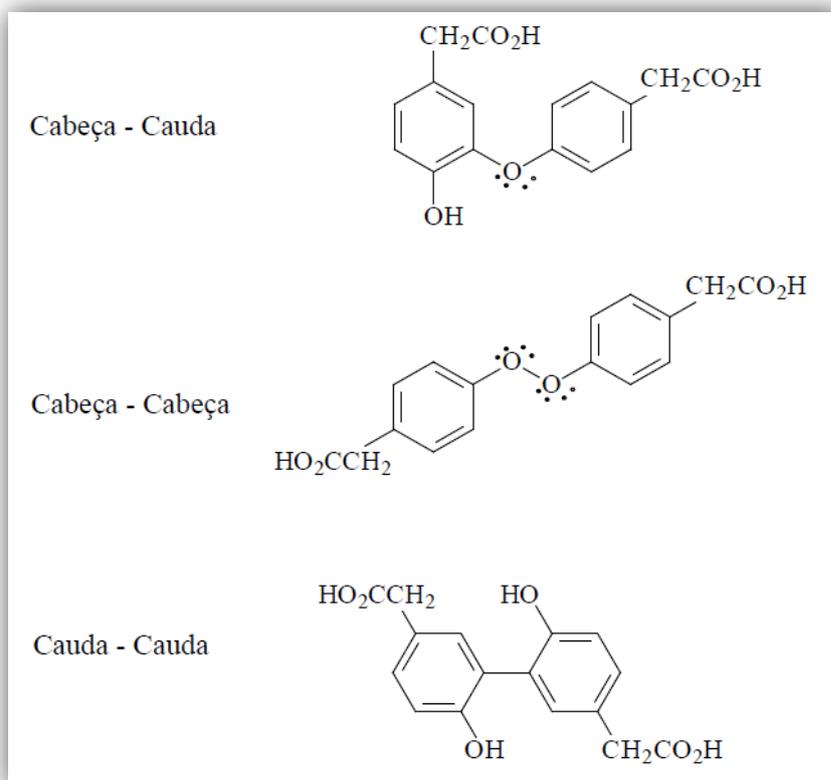


Figura 38: Possíveis acoplamentos na eletropolimerização do ácido 4-HFA via radicalar.

4.2 – ESTUDO DO IMUNOSSENSOR

4.2.1 - Coomassie Brilliant Blue G-250 como indicador da formação do complexo Antígeno-Anticorpo

4.2.1.1 – Comportamento eletroquímico do CBBG-250

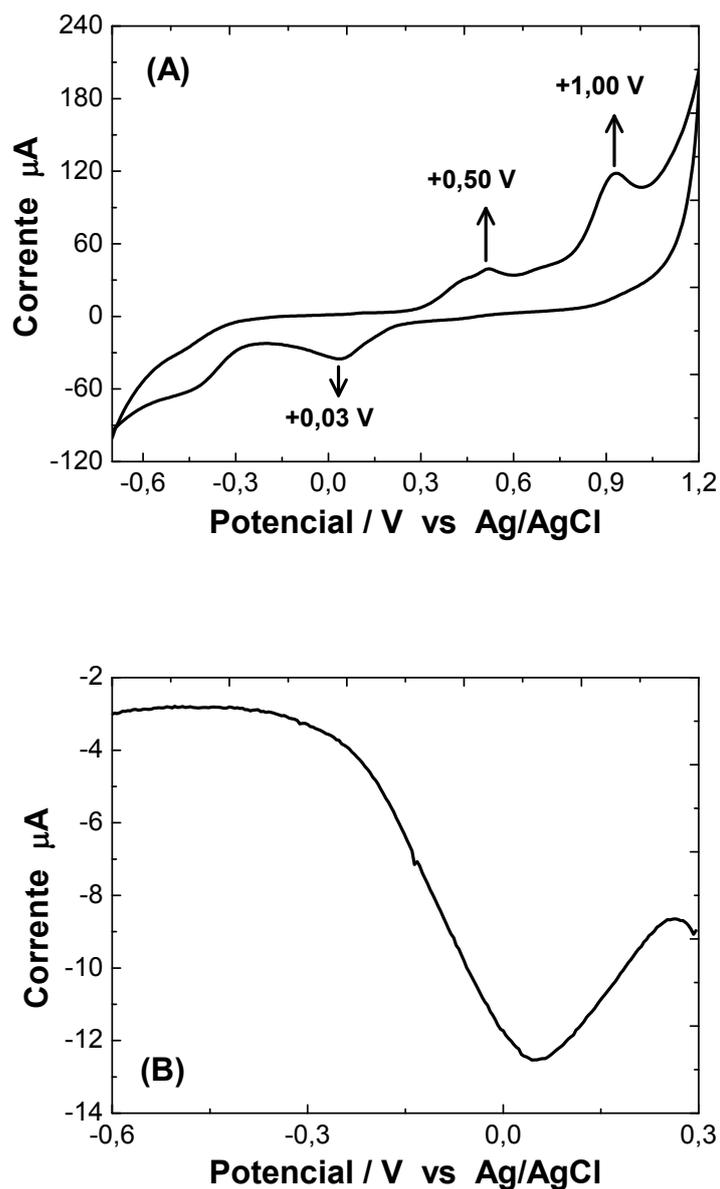


Figura 39: (A) VC para EG em solução tampão TBS contendo 5,00 mmol.dm⁻³ de CBBG-250. (B) VPD para EG/poli(4-HFA) em solução tampão TBS contendo 5,00 mmol.dm⁻³ de CBBG-250.

A resposta eletroquímica do indicador CBBG-250 perante uma varredura potencial em eletrodo de grafite foi investigada (Figura 39-A). Na faixa de potencial estudada o composto apresenta dois processos de oxidação em, aproximadamente, +0,50 e +1,00 V. É sabido que grupos metilas são indutores de elétrons em sistemas aromáticos conjugados, o que, neste caso, facilita a oxidação levando-a para potenciais menores, e isso justifica os valores de potenciais observados para os processos de oxidação do indicador.

O número de substâncias que podem responder eletroquimicamente é proporcional ao potencial elétrico aplicado, logo, um biossensor eletroquímico será mais seletivo quanto menor o potencial utilizado. Desta forma, optou-se pelo monitoramento do processo de redução do corante, observado entre -0,40 e +0,30 V (Figura 39-B), para garantir maior seletividade ao imunossensor proposto.

As investigações foram feitas por VPD com varredura potencial de +0,3 a -0,7 V, com velocidade de varredura igual a 0,06 V/s.

4.2.1.2 - Detecção com Coomassie Brilliant Blue G-250

Os resultados da detecção com o corante CBBG-250 indicaram duas modificações nos VPD obtidos (Figura 40-A). A primeira foi o aparecimento de um processo de redução com potencial de pico de -0,25 V. Esse processo pode estar relacionado com a formação de ligações do indicador com o antígeno imobilizado. A segunda foi uma redução na corrente e de pico em 3,84%, representando um ΔI_p de -5 μA . Essa redução indicam a ocorrência de modificações na superfície do EG/poli(4-HFA) e podem estar relacionadas com uma redução da superfície eletroativa do eletrodo e com o aumento da espessura da superfície. Estes resultados comprovam a modificação do EG/poli(4-HFA) com o antígeno rK39.

Os VPD obtidos após subtração das linhas de base (Figura 40-B) mostram que a resposta eletroquímica do indicador proposto não diferencia o IgG+ do controle negativo (IgG-). Desta forma, a utilização do corante CBBG-250 como indicador da presença do complexo antígeno-anticorpo específico para Leishmaniose mostrou-se inadequado para o imunossensor eletroquímico proposto.

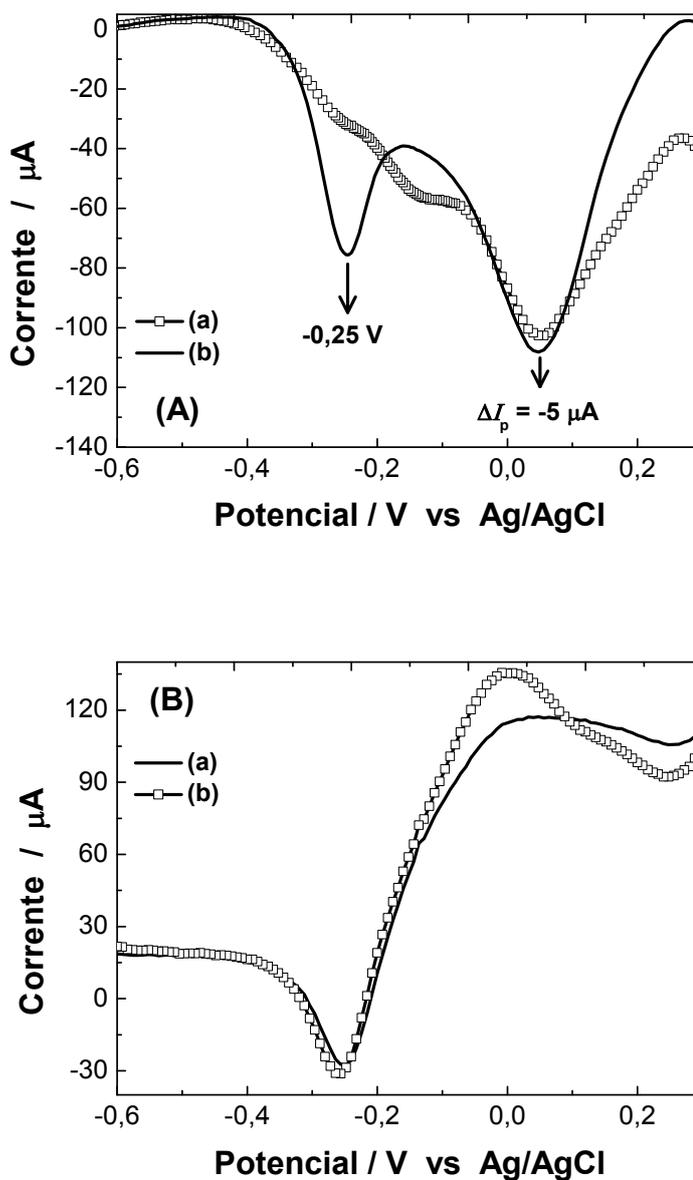


Figura 40: (A) voltamogramas de pulso diferencial obtidos para (a) EG/poli(4-HFA)/rK39/IgG+ e (b) EG/poli(4-HFA)/rK39. (B) voltamogramas de pulso diferencial obtidos após subtração das linhas de base para (a) EG/poli(4-HFA)/rK39/IgG+ e (b) EG/poli(4-HFA)/rK39/IgG-.

O fato de a resposta do CBBG-250 estar na mesma região de resposta do filme polimérico é, sem dúvida, uma dificuldade encontrada no sistema de detecção proposto, pois, é esperada uma redução na corrente e no potencial de pico, conforme observado e comentado

anteriormente, e, neste caso, a resposta do filme sobrepõe a resposta do imunossensor reduzindo significativamente sua sensibilidade.

A afinidade do CBBG-250 com os aminoácidos que compõe uma proteína está diretamente ligada ao pH do sistema. Em meio ácido esse corante apresenta maior afinidade por aminoácidos básicos, principalmente, lisina, histidina e arginina, e, em meio básico, por aminoácidos ácidos, tais como, o aspartato e o glutamato. Essa característica favorece, em muito, sua aplicabilidade em imunoenaios laboratoriais como o ELISA e o RIFI, pois, nesses sistemas as amostras passam por pré-tratamento que permitem a obtenção de maior sensibilidade e seletividade nas respostas obtidas. Contudo, a idéia proposta neste trabalho é o estudo de um imunossensor cujas amostras sejam submetidas a pouco, ou nenhum, pré-tratamento, por isso o pH fisiológico foi escolhido e que, neste caso, foi outra dificuldade encontrada na detecção com CBBG-250.

4.2.2 - Cloreto de Hexaminrutênio II como indicador da formação do complexo antígeno-anticorpo

4.2.2.1 - Detecção com Cloreto de Hexaminrutênio II

O estudo das propriedades cinéticas de transporte de troca iônica do poli(4-HFA) mostraram que este filme é aniônico por apresentar aumento nas correntes de pico em solução contendo o complexo catiônico cloreto de hexaaminrutênio II. Portanto, complexos catiônicos, como o citado, podem atuar como indicadores de modificações ocorridas na superfície de filmes aniônicos. No caso de imunossensores, a imobilização de um Ag e/ou Ac e/ou do complexo Ag-Ac gera uma nova superfície que pode apresentar maior ou menor afinidade com esses indicadores levando, portanto, a alteração da resposta eletroquímica.

Para verificarmos se a resposta eletroquímica do poli(4-HFA) em solução de cloreto de hexaaminrutênio II é alterada nas diferentes etapas de construção do imunossensor estudado, VC foram obtidos em diferentes eletrodos modificados com poli(4-HFA), após imobilização de rK39, na ausência e na presença do alvo complementar e não complementar. Os resultados indicaram respostas diferentes, conforme apresentado na Figura 41-A.

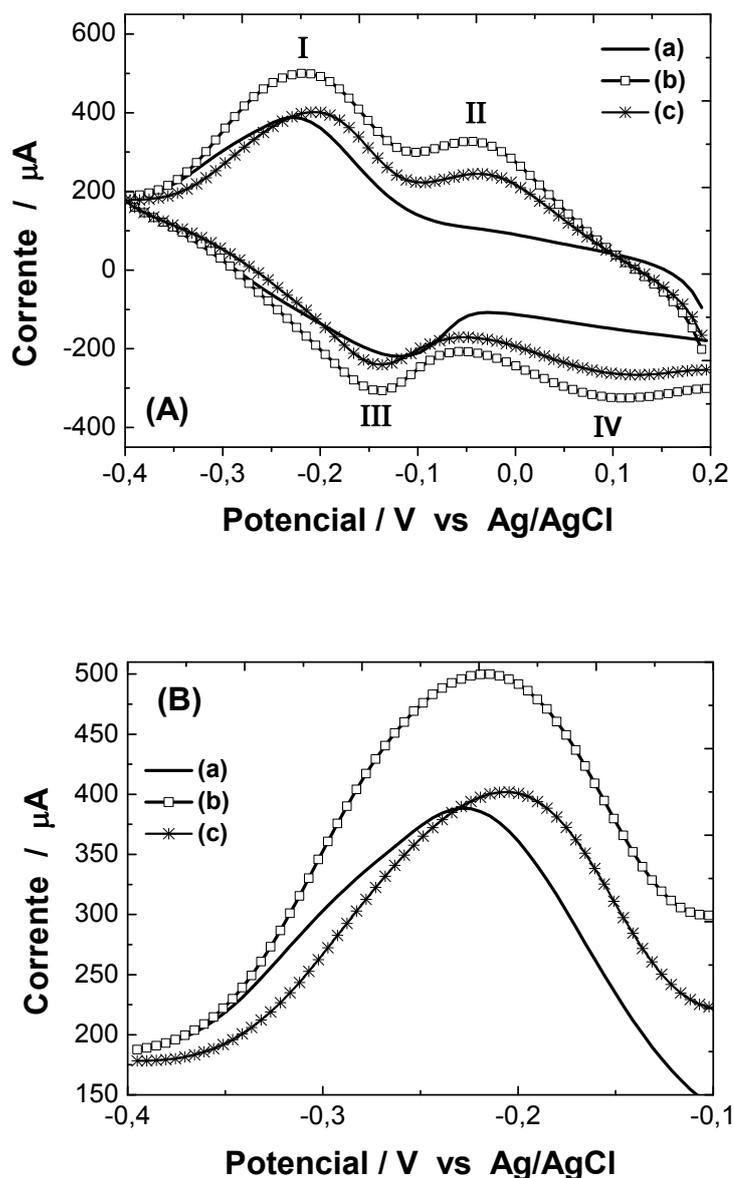


Figura 41: (A) VC em solução de cloreto de hexaminrutênio II ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$) 5 mmol.L^{-1} em TBS contendo $\text{KCl } 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ para (a) EG/Poli(4-HFA), (b) EG/Poli(4-HFA)/rK39/IgG⁻ e (c) EG/Poli(4-HFA)/rK39/IgG⁺; 50 mV/s . (B) Processo de oxidação observado entre $-4,0$ e $-1,0 \text{ V}$ nos VC apresentados em A.

Um aumento nas correntes de pico dos processos redox I e III pôde ser observado nos VC, bem como, que a resposta do eletrodo contendo o complexo rK39/IgG⁺ é maior que seu controle negativo, mostrando que o sistema apresenta potencial para indicar sua formação. Com a formação do complexo Ag-Ab na superfície do eletrodo contendo o poli(4-HFA), a

distância entre o EG/poli(4-HFA) e a solução aumenta e isso representa um aumento de resistência no circuito. Esse fato também pôde ser observado na Figura 41-A, onde percebemos um leve deslocamento no potencial de pico dos processos redox I e III entre as plataformas contendo o Ag, o complexo Ag-AC e seu controle negativo (Tabela 13). É importante ressaltar que a diferença é baixa entre a plataforma contendo apenas o antígeno e a que contem seu alvo complementar devido a afinidade eletrônica esperada entre o Ac e o indicador, conforme citado anteriormente. Contudo, optou-se pelo monitoramento do processo de oxidação I (Figura 41-B), para a condução dos estudos do imunossensor por este ocorrer em menor faixa de potencial.

Tabela 13: Principais diferenças observadas nos VC para detecção de IgG em solução de cloreto de hexaminrutênio II ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$) 5 mmol.L^{-1} em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ entre -0,4 e -0,1 V.

| <i>Detecção</i> | rK39 | IgG+ | IgG- |
|--|--------|--------|--------|
| <i>Corrente de pico (μA)</i> | 38,84 | 49,96 | 40,20 |
| <i>Potencial de pico (V)</i> | -0,229 | -0,214 | -0,204 |

O monitoramento do processo de oxidação do complexo (Figura 42), mostrou que a corrente de pico é 16,48% maior para o eletrodo contendo Ag-Ac em relação ao controle negativo, correspondendo a um aumento de 1,2425 C na carga envolvida no processo. A ligação do anticorpo ao antígeno ocorre, preferencialmente, pelas extremidades que contém grupamentos amina e, neste caso, os grupamentos carboxila ficam livres e em contato com a solução. Sabendo que no pH trabalhado essas carboxilas não estão totalmente desprotonadas, haverá, no entanto, uma maior afinidade eletrônica entre esses grupos e o complexo catiônico em questão. Contudo, na plataforma contendo Ag-Ac ocorre maior interação com o indicador, o que não é esperado para o controle negativo, e isso pode explicar o aumento na corrente de pico da oxidação observado.

Se a resposta de corrente aumenta com a presença do complexo Ag-Ac na superfície do eletrodo, então, esse aumento deve ser proporcional à quantidade desse complexo imobilizado. Desta forma, a resposta no VPD desse sistema foi monitorada para diferentes

concentrações de anticorpo imobilizado, e os resultados obtidos comprovaram essa tendência (Figura 42-B).

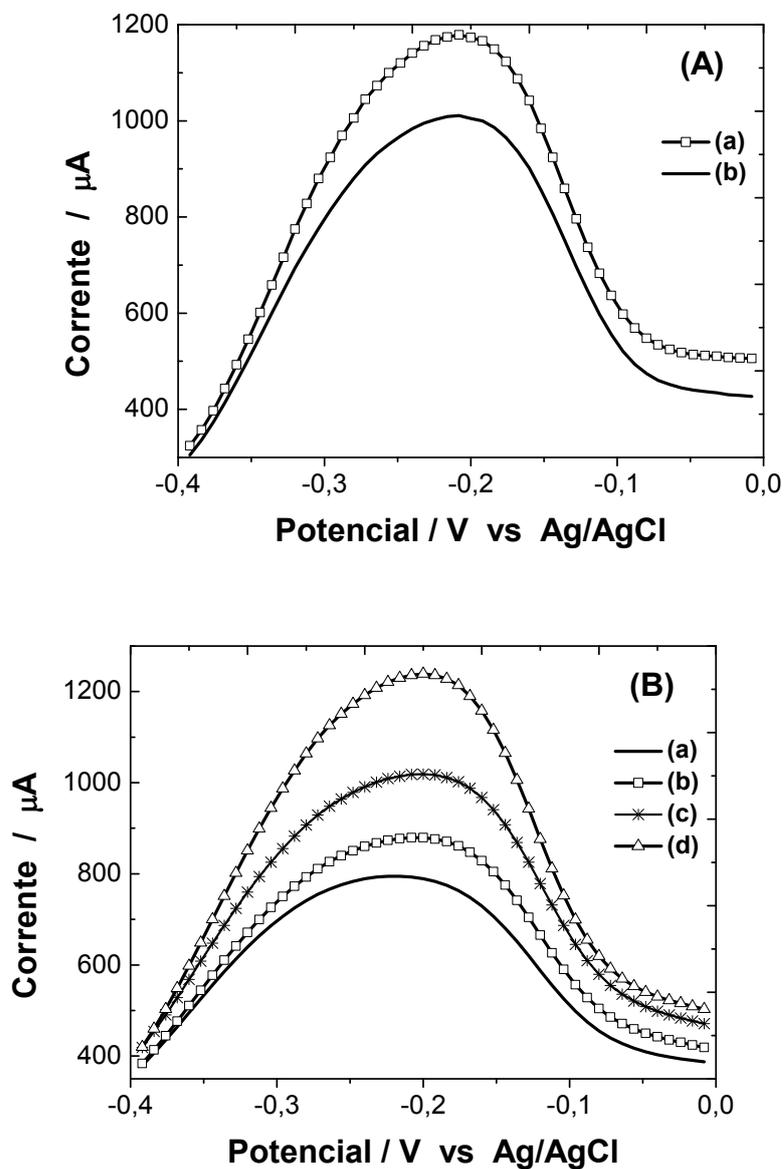


Figura 42: VPD obtidos em solução TBS contendo cloreto de hexaaminrutênio II ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$) 5 mmol.L^{-1} e KCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (A) para (a) IgG- (b) IgG+, sendo $0,50 \text{ ug}$ de rK39 e $5,01 \text{ ug}$ para IgG imobilizados, e (B) para as seguintes massas (em ug) e anticorpo imobilizadas: (a) $1,67$; (b) $2,50$; (c) $3,34$ e (d) $4,17$. A massa de antígeno imobilizada foi de $0,50 \text{ ug}$.

Foi possível constatar que o deslocamento no potencial de pico é maior para sistemas com maior concentração do complexo Ag-Ac, e isso era esperado devido à maior distância entre a superfície dos eletrodos contendo maior concentração desse complexo e a solução, conforme citado anteriormente. A Tabela 14 as principais diferenças observadas.

Tabela 14: Principais diferenças observadas nos VPD em solução de cloreto de hexaminrutênio II ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$) 5 mmol.L^{-1} em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ para detecção de diferentes concentrações de Ac.

| Massa de Ag e Ac (ug) | 1,67 | 2,50 | 3,34 | 4,17 |
|------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| <i>Carga (mC)</i> | 59,357 | 64,790 | 74,292 | 85,050 |
| <i>Potencial de Pico (V)</i> | -0,219 | -0,204 | -0,201 | -0,200 |

O sistema proposto para a detecção de IgG específico para leishmaniose imobilizado sobre EG modificado com poli(4-HFA)/rK39 apresenta sensibilidade e seletividade.

4.2.2.2 - Otimização do Imunossensor

4.2.2.2.1 - Concentração do $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{-2}$

A seletividade e a confiabilidade de biossensores eletroquímicos estão diretamente relacionadas com os valores de E_p e I_p apresentados. Isto porque este pode camuflar possíveis interferentes quando sua resposta é muito elevada, e aquele pode possibilitar que um maior número de substâncias responda eletroquimicamente quando seu valor é muito elevado. Neste sentido, um bom biossensor eletroquímico deve apresentar valores de E_p e I_p tão menores quanto possível.

O imunossensor proposto apresenta E_p satisfatório, porém, os valores de I_p apresentados não foram consistentes com os valores apresentados por biossensores eletroquímicos. A alta concentração da solução do indicador ($\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{-2} 5 \text{ mmol L}^{-1}$ e $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) justifica os elevados valores de I_p obtidos. Com objetivo de diminuir a I_p para valores tão menores quanto possível, monitorou-se a resposta do indicador, em EG/poli(4-

HFA), para diferentes concentrações. As concentrações investigadas foram obtidas a partir de sucessivas diluições da solução do indicador utilizada inicialmente.

Os resultados obtidos mostraram que a I_p decresce quase que linearmente com a diminuição da concentração, enquanto o E_p sofre insignificantes variações (Figura 43-A). Os valores de carga envolvidas no processo decrescem de forma semelhante às I_p 's (Figura 43-B). Quando a concentração do indicador foi reduzida a $42,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ a I_p observada foi de $237,6 \mu\text{A}$, os valores de E_p e de carga neste ponto foram de $-0,28 \text{ V}$ e $41,8 \mu\text{C}$, respectivamente. Para o menor valor de concentração estudado ($12,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) o indicador apresentou boa resposta, e os valores de I_p , E_p e de carga obtidos nessa concentração foram de $30,0 \mu\text{A}$, $-0,30 \text{ V}$ e $10,2 \mu\text{C}$, respectivamente. Os demais valores de I_p , E_p e de carga obtidos nesta investigação são apresentados na Tabela 1. O perfil dos voltamogramas também é um fator a ser considerado, pois, se o pico for pouco definido a sensibilidade para indicar uma possível redução de resposta diminui consideravelmente. As principais características observadas no estudo da concentração do indicador são apresentadas na Tabela 15.

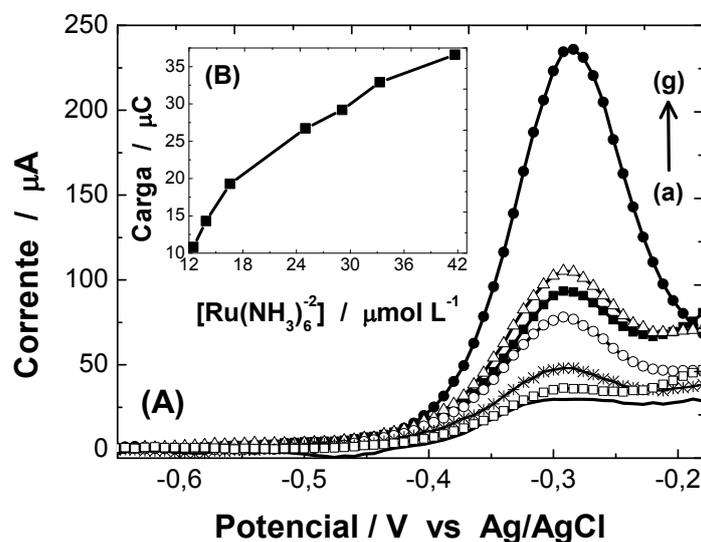


Figura 43: (A) VPD do EG/poli(4-HFA) em solução de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+}$ contendo KCl nas respectivas concentrações: (a) $42,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,85 \text{ mmol L}^{-1}$; (b) $34,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,70 \text{ mmol L}^{-1}$; (c) $29,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,58 \text{ mmol L}^{-1}$; (d) $25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$; (e) $16,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,33 \text{ mmol L}^{-1}$; (f) $14,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,28 \text{ mmol L}^{-1}$; (g) $12,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$. (B) Valores de carga obtidos em função da concentração do indicador.

Tabela 15: Principais características observadas no estudo da concentração do indicador.

| [Ru(NH ₃) ₆ ⁺²] (mol L ⁻¹) | 42,0 | 34,0 | 29,0 | 25,0 | 16,0 | 14,0 | 12,0 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>I</i>_p (μA) | 237,6 | 106,3 | 93,3 | 79,3 | 50,0 | 35,5 | 30,0 |
| <i>E</i>_p (V) | -0,28 | -0,28 | -0,28 | -0,29 | -0,29 | -0,30 | -0,30 |
| Carga (μC) | 41,8 | 33,5 | 29,2 | 25,1 | 16,6 | 13,9 | 10,5 |

Contudo, a escolha da concentração ótima foi baseada em dois principais aspectos: o valor de *I*_p e o perfil do voltamograma obtido. Neste sentido, a concentração de 12,0 μmol L⁻¹ de Ru(NH₃)₆⁺², contendo KCl 0,25 mmol L⁻¹, foi escolhida por apresentar valor de *I*_p adequado, e ainda, pelo perfil do voltamograma obtido apresentar boa potencialidade para indicar tanto um aumento quanto uma diminuição de resposta.

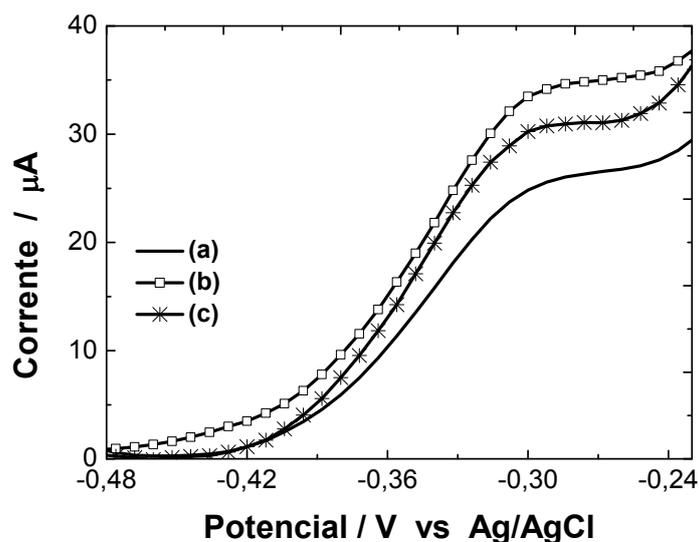


Figura 44: VPD obtidos em solução TBS contendo cloreto de hexaminrutênio II ([Ru(NH₃)₆]Cl₂) 12 μmol L⁻¹ e KCl 0,25 mmol L⁻¹, sendo (a) EG/poli(4-HFA)/rK39, (b) EG/poli(4-HFA)/rK39/IgG+, e (c) EG/poli(4-HFA)/rK39/IgG-.

Na concentração de 12,0 μmol L⁻¹ do indicador os VPD apresentaram o mesmo comportamento observado nos estudos anteriores, porém, com perfil bastante diferenciado (Figura 44). Monitorando as *I*_p em potencial fixo de -0,30 V observou-se que esta decresce de 30,0 para 24,7 μA após imobilização do antígeno rK39, e que, após imobilização de IgG+ e IgG-, aumenta de 24,7 μA para 34,0 e 30,0 μA, respectivamente. Estes resultados comprovam

que, na referida concentração, o sistema continua apresentando grande potencialidade para indicar a modificação da superfície do EG/poli(4-HFA) com o antígeno, e para detectar satisfatoriamente o anticorpo específico para LV, porém, a seletividade perante o controle negativo reduziu consideravelmente. Contudo, novas estratégias foram traçadas com objetivo de melhorar a seletividade do imunossensor sem que a concentração do indicador fosse alterada, e a primeira delas foi aumentar o tempo de contato deste antes da detecção.

4.2.2.2.2 - Tempo de contato com $Ru(NH_3)_6^{+2}$

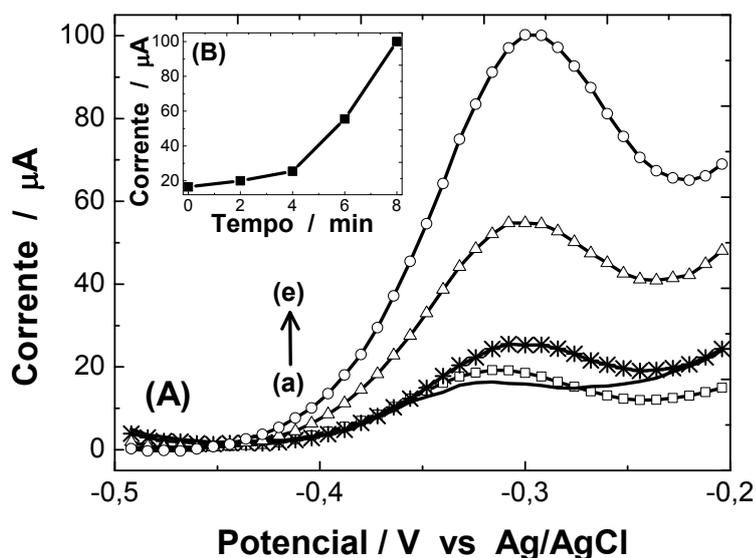


Figura 45: (A) VPD para EG/poli(4-HFA) obtidos em solução TBS contendo cloreto de hexaaminrutênio II ($[Ru(NH_3)_6]Cl_2$) $12 \mu mol L^{-1}$ e KCl $0,25 mmol L^{-1}$. As medidas foram realizadas após os seguintes tempos (em minutos) de contato entre o eletrodo e a solução: (a) 0; (b) 2; (c) 4; (d) 6; e (e) 8. (B) Valores de I_p obtidos em função do tempo de contato entre eletrodo e solução.

Durante a realização dos estudos com $Ru(NH_3)_6^{+2}$ foi possível observar que a resposta eletroquímica obtida é proporcional ao tempo de contato entre o EG/poli(4-HFA) com a solução desse cátion. Esse comportamento é explicado pelo caráter aniônico apresentado pelo filme, conforme discutido anteriormente. Desta forma, o monitoramento do tempo de contato

entre a solução do indicador e o EG/poli(4-HFA) foi investigado. Nesta investigação VPD foram obtidos para o EG/poli(4-HFA) após tempos de contato com a solução de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{+2}$ entre 0 e 8 minutos, com variação de 2 minutos para cada medida (Figura 45-A).

O VPD obtido imediatamente após contato entre o EG/poli(4-HFA) e a solução apresentou I_p de 16,5 μA , e, após 2, 4, 6 e 8 minutos de contato os valores de I_p obtidos foram 20,0, 25,5, 55,5 e 100,0 μA , respectivamente. O ΔI_p entre o primeiro e o último voltamograma investigado foi de 83,5 μA . Conforme esperado, a I_p aumenta quando a solução fica em contato com o eletrodo por tempo maior, porém, esse aumento não é linear (Figura 45-B). Essa não linearidade pode estar associada com a porosidade do filme polimérico, pois, quanto maior o tempo de contato com a solução maior será o número de íons $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{+2}$ que podem penetrar nos poros do filme, e ainda, maior será o grau de hidratação deste. A soma destes fatores justifica o rápido aumento de resposta da sonda observada entre os intervalos de 4 a 6 minutos e de 6 a 8 minutos.

Estes resultados mostram que um monitoramento rigoroso do tempo no qual a solução do indicador fica em contato com o eletrodo de trabalho, é extremamente importante para que o sistema de detecção proposto seja eficiente e confiável.



Conclusões E
PERSPECTIVAS

5 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A investigação do crescimento do poli(4-HFA) em função do número de varreduras potenciais, mostrou que 100 varreduras é uma quantidade ideal para obtenção de uma boa resposta eletroquímica do filme.

Interessantes propriedades de troca catiônica e aniônica foram demonstradas com o estudo da influência que os pares redox $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_2$ e $\text{K}_4(\text{FeCN})_6/\text{K}_3(\text{FeCN})_6$ exercem sob o polímero formado, sendo possível concluir que o poli(4-HFA) possui característica aniônica, quanto obtido nas condições estudadas.

O procedimento de extração do poli(4-HFA) foi eficiente para obtenção do material, que mostrou-se higroscópico e com aparência de um líquido escuro de alta viscosidade. Porém, com tratamentos térmicos e armazenamento adequado foi possível obter esse material praticamente no seu estado sólido que permitiu uma boa condução dos estudos térmicos e espectroscópicos.

Os resultados das análises térmicas mostraram que a estrutura do poli(4-HFA) é heterogênea e complexa. A perda de massa é gradual ao longo de uma larga faixa de temperatura, sendo a estabilização obtida a $443\text{ }^\circ\text{C}$ com um total de, aproximadamente, 99 % de perda de massa, ao contrário do monômero que sofre processo de decomposição com total perda de massa a, aproximadamente, $479\text{ }^\circ\text{C}$. Além disso, esta perda de massa gradual para o polímero sugere que rearranjos na estrutura dos oligômeros podem estar ocorrendo, levando a processos de polimerizações químicas adicionais quando submetidos a altas temperaturas.

Os resultados obtidos nos espectros de UV-vis indicaram que o polímero apresenta melhor deslocalização dos elétrons π que o monômero, comprovando que esse material possui maior extensão de conjugação, conforme foi notado nos espectros de FTIR e TG. As medidas de fluorescência indicaram que o poli(4-HFA) possui atividade fotoquímica.

Estudos de FTIR sobre a estrutura do polímero mostraram que o material formado apresenta grupamentos hidroxila fenólica e que a ausência da banda de deformação característica de carboxila sugere que este grupamento possa não estar presente na estrutura. As harmônicas características de compostos aromáticos indicam a presença de mais dois substituintes no anel, quando comparado ao monômero. A deformação angular fora do plano das ligações $\text{C}=\text{C}$, correspondentes ao esqueleto do anel aromático, é muito intensas no

polímero, indicando um aumento na extensão de conjugação da estrutura formada possivelmente pela presença de ligações Ar-Ar e/ou éter difenílico. As bandas de deformação observadas entre 1011 e 1296 cm^{-1} não permitem definir o(s) grupo(s) que as caracterizam, porém, sugerimos deformações axiais de ligação Ar-O e axiais simétricas e assimétricas de ligações C-O-C baseados nos possíveis mecanismos de reação discutidos para o monômero. O tratamento térmico investigado nesses estudos indicou que os grupos funcionais presentes no polímero não são alterados até a temperatura estudada, confirmando a aplicabilidade desse material como plataforma para desenvolvimento de dispositivos que necessitem de aquecimento, como os genossensores.

A utilização do corante Coomassie Brilliant Blue como indicador da presença do complexo antígeno-anticorpo específico para leishmaniose mostrou-se inadequado para o imunossensor eletroquímico proposto. Foi possível a imobilização de rK39 sobre EG/poli(4-HFA) bem como a detecção do alvo complementar utilizando cloreto de hexaminrutênio II como indicador da formação da interação rK39/IgG+. O imunossensor mostrou-se seletivo frente ao controle negativo (IgG-).

Os estudos de otimização da concentração do indicador mostraram que, em concentração de 12 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{+2}$, o imunossensor mantém sua sensibilidade para indicar a formação do complexo Ag-Ac, porém, com diminuição de seletividade frente ao alvo não-complementar. A investigação do tempo de contato do indicador com o eletrodo nas diferentes etapas de construção do imunossensor mostrou a importância de um monitoramento rigoroso desse tempo antes de cada medida para que o sistema de detecção proposto seja eficiente e confiável.

Como propostas futuras têm-se a utilização de análises de RMN e CG-MS para esclarecimento das dúvidas geradas nas discussões sobre a estrutura do material estudado, a determinação de massa molar, estudos teóricos de otimização e estudos fotoquímicos, dentre outros. Quanto ao imunossensor, estudos de otimização dos parâmetros do imunossensor proposto podem ser conduzidos para garantir melhor performance do mesmo nas medidas de reconhecimento biológico. Além disso, a determinação do limite de detecção, bem como, da estabilidade do imunossensor são essenciais para que os estudos de miniaturização possam ser iniciados visando uma futura comercialização deste dispositivo.



*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Akcelrud, Leni.** "*Fundamentos da ciência dos polímeros.*" Barueri, SP : Manole, 2007.
2. **Sperling, L. H.** "Introduction to Physical Polymer Science." *Introduction to Physical Polymer Science.* New Jersey, USA : Wiley Interscience, 2006.
3. **Ashok Kumara, Akshay Srivastavaa, Igor Yu Galaev, Bo Mattiassonb.** "*Smart polymers: Physical forms and bioengineering applicat.*" s.l. : Progress in Polymer Science, 2007, Vols. 32, 1205–1237.
4. **Shirakawa, H.and Ikeda, S.** "*Infrared Spectra of Poly(acetylene).*" 1970, Polymer Journal, 2:(2), pp. 231-244.
5. **Shirakawa, H.and Ikeda, S.** 1970, Polymer Journal, 2:(2), pp. 231-244.
6. **Shirakawa, H., Louis, E.J., MacDiarmid, A.G., Chiang, C.K.and Heeger, A.J.** "*Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, (CH)_x.*" 1977, Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1:(16), pp. 578 - 580.
7. **MacDiarmid, A.G.** "'Synthetic metals": a novel role for organic polymers." *Current Applied Physics*, 1:(4-5), 2001, 269-279.
8. **Faez, R., Rezende, M.C., Martin, I.M.and De Paoli, M.-A.** "*Polímeros condutores intrínsecos e seu potencial em blindagem de radiações eletromagnéticas.*" *Polímeros*, 10:(3), 2000, 130-137.
9. **Maia, D.J., De Paoli, M.-A., Alves, O.L., Zarbin, A.J.G.and Neves, S.d.** "*Síntese de polímeros condutores em matrizes sólidas hospedeiras.*" *Química Nova*, 23:(2), 2000, 204-215.
10. **Genies, E.M.and Lapkowski, M.** "*Spectroelectrochemical study of polyaniline versus potential in the equilibrium state.*" 1987, Journal of Electroanalytical Chemistry, 220:(1), pp. 67-82.
11. **Kanatzidis, M.G.** "*Polymeric Electrical Conductors.*" 1990, Chemical and Engineering News, 3:(1),, pp. 36-54.
12. **Skotheim, T.A.** "*Handbook of Conducting Polymers.*" s.l. : CRC, 1997.
13. **Adhikari, B.and Majumdar, S.** "*Polymers in sensor applications.*" 2004, Progress in Polymer Science, 29:(7), pp. 699-766.

14. **Tan, K.L., Tan, B.T.G., Khor, S.H., Neoh, K.G. and Kang, E.T.** "The effects of synthesis conditions on the characteristics and chemical structures of polyaniline: A comparative study". 1991, *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 52:(5), pp. 673-680.
15. **Wan, M.** "The influence of polymerization method and temperature on the absorption spectra and morphology of polyaniline". 1989, *Synthetic Metals*, 31:(1), pp. 51-59.
16. **Lange, U., Roznyatovskaya, N.V. and Mirsky, V.M.** "Conducting polymers in chemical sensors and arrays". *Analytica Chimica Acta*, 614:(1), 2008, 1-26.
17. **Gurunathan, K., Murugan, A.V., Marimuthu, R., Mulik, U.P. and Amalnerkar, D.P.** "Electrochemically synthesised conducting polymeric materials for applications towards technology in electronics, optoelectronics and energy storage devices". 1999, *Materials Chemistry and Physics*, 61:(3), pp. 173-191.
18. **Krompiec, M., Krompiec, S., Ignasiak, H., Lapkowski, M., Kus, P., Stanek, L., Penczek, R., Lis, S., Staninski, K., Sajewicz, M. and Gebarowska, K.** "Synthesis and electropolymerization of 3,5-dithienylpyridines, their complexes and N-methylpyridinium cations". 2008, *Synthetic Metals*, 158:(21-24), pp. 831-838.
19. **Ismail, K.M., Khalifa, Z.M., Azzem, M.A. and Badawy, W.A.** "Electrochemical preparation and characterization of poly(1-amino-9,10-anthraquinone) films". 2002, *Electrochimica Acta*, 47:(12), pp. 1867-1873.
20. **Chen, S.-M. and Fa, Y.-H.** "The electropolymerization and electrocatalytic properties of polymerized new fuchsin film modified electrodes". 2003, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 553:(1), pp. 63-75.
21. **Blanco-López, M.C., Lobo-Castañón, M.J., Miranda-Ordieres, A.J. and Tuñón-Blanco, P.** "Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers". 2004, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23:(1), pp. 36-48.
22. **D'Eramo, F., Zón, M.A., Fernández, H., Sereno, L. and Arévalo, A.H.** "Studies of a novel conducting polymer by cyclic and square wave voltammetries: Its synthesis and characterization"; *Electrochimica Acta* 53 (2008) 7182–7190. *Electrochimica Acta*, 53:(24), pp. 7182-7190.
23. **Malinauskas, A.** "Electrocatalysis at conducting polymers". s.l. : *Synthetic Metals*, 1999, Vols. 107:(2), 75-83.
24. **Inzelt, G., Pineri, M., Schultze, J.W. and Vorotyntsev, M.A.** "Electron and proton conducting polymers: recent developments and prospects".. s.l. : *Electrochimica Acta*, 1999, Vols. 45:(15-16), 2403-2421.

25. **McQuade, D.T., Pullen, A.E. and Swager, T.M.** *"Conjugated Polymer-Based Chemical Sensors"*. s.l. : Chemical Reviews, 2000, Vols. 100:(7), 2537-2574.
26. **Wang, J., Chen, J., Wang, C.Y., Zhou, D., Too, C.O. and Wallace, G.G.** *"Electrochemical synthesis of polypyrrole films using stainless steel mesh as substrate for battery application"*. s.l. : Synthetic Metals, 2005, Vols. 153:(1-3), 117-120.
27. **Kurian, M., Galvin, M.E., Trapa, P.E., Sadoway, D.R. and Mayes, A.M.** *"Single-ion conducting polymer-silicate nanocomposite electrolytes for lithium battery applications"*. s.l. : Electrochimica Acta, 2005, Vols. 50:(10), 2125-2134.
28. **Lisowska-Oleksiak, A., Kazubowska, K. and Kupniewska, A.** *"Ionic transport of Li⁺ in polymer films consisting of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) and poly(4-styrenesulphonate)"*. s.l. : Journal of Electroanalytical Chemistry, 2001, Vols. 501:(1-2), 54-61.
29. **Soudan, P., Ho, H.A., Breau, L. and Belanger, D.** *"Chemical synthesis and electrochemical properties of poly(cyano-substituted-diheteroareneethylene) as conducting polymers for electrochemical supercapacitors"*. s.l. : Journal of the Electrochemical Society, 2001, Vols. 148:(7), A775-A782.
30. **Ferraris, J.P., Eissa, M.M., Brotherston, I.D. and Loveday, D.C.** *"Performance Evaluation of Poly 3-(Phenylthiophene) Derivatives as Active Materials for Electrochemical Capacitor Applications"*. s.l. : Chem. Mater., 1998, Vols. 10:(11), 3528-3535.
31. **Li, W., Chen, J., Zhao, J., Zhang, J. and Zhu, J.** *"Application of ultrasonic irradiation in preparing conducting polymer as active materials for supercapacitor"*. s.l. : Materials Letters, 2005, Vols. 59:(7), 800-803.
32. **Li, G., Martinez, C. and Semancik, S.** *"Controlled Electrophoretic Patterning of Polyaniline from a Colloidal Suspension"*. s.l. : J. Am. Chem. Soc., 2005, Vols. 127:(13), 4903-4909.
33. **Somani, P.R. and Radhakrishnan, S.** *"Electrochromic materials and devices: present and future"*. s.l. : Materials Chemistry and Physics, 2003, Vols. 77:(1), 117-133.
34. **Cho, I.-K., Lee, W.-J., Rho, B.-S. and Jeong, M.-Y.** *"Polymer waveguide with integrated reflector mirrors for an inter-chip link system"*. s.l. : Optics Communications, 2008, Vols. 281:(19), 4906-4909.

35. **Sindhu, S., Narasimha Rao, K., Ahuja, S., Kumar, A. and Gopal, E.S.R.** "*Spectral and optical performance of electrochromic poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) deposited on transparent conducting oxide coated glass and polymer substrates*". s.l. : Materials Science and Engineering: B, 2006, Vols. 132:(1-2), 39-42.
36. **Akcelrud, L.** "*Electroluminescent polymers*". s.l. : Progress in Polymer Science, 2003, Vols. 28:(6), 875-962.
37. **Huang, H., He, Q., Lin, H., Bai, F. and Cao, Y.** "*Properties of an alternating copolymer and its applications in LEDs and photovoltaic cells*". s.l. : Thin Solid Films, 2005, Vols. 477:(1-2), 7-13.
38. **Sonmez, G.** "*Polymeric electrochromics*". s.l. : Chemical Communications, 2005, Vols. 1:(42), 5251 - 5259.
39. **Perepichka, I.F., Perepichka, D.F., Meng, H. and Wudl, F.** "*Light-Emitting Polythiophenes*". s.l. : Advanced Materials, 2005, Vols. 17:(19), 2281-2305.
40. **Nguyen Thi Le, H., Garcia, B., Deslouis, C. and Le Xuan, Q.** "*Corrosion protection and conducting polymers: polypyrrole films on iron*". s.l. : Electrochimica Acta, 2001, Vols. 46:(26-27), 4259-4272.
41. **Camalet, J.L., Lacroix, J.C., Aeiyaich, S., Chane-Ching, K. and Lacaze, P.C.** "*Electrosynthesis of adherent polyaniline films on iron and mild steel in aqueous oxalic acid medium*". s.l. : Synthetic Metals, 1998, Vols. 93:(2), 133-142.
42. **Hien, N.T.L., Garcia, B., Pailletret, A. and Deslouis, C.** "*Role of doping ions in the corrosion protection of iron by polypyrrole films*". s.l. : Electrochimica Acta, 2005, Vols. 50:(7-8), 1747-1755.
43. **Lange, U., Roznyatovskaya, N.V. and Mirsky, V.M.** "*Conducting polymers in chemical sensors and arrays*". s.l. : Analytica Chimica Acta, 2008, Vols. 614:(1), 1-26.
44. **Sirringhaus, H., Tessler, N. and Friend, R.H.** "*Integrated Optoelectronic Devices Based on Conjugated Polymers*". s.l. : Science, 1998, Vols. 280:(5370), 1741-1744.
45. **Ramanathan, K., Bangar, M.A., Yun, M., Chen, W., Myung, N.V. and Mulchandani, A.** "*Bioaffinity Sensing Using Biologically Functionalized Conducting-Polymer Nanowire*". s.l. : J. Am. Chem. Soc., 2005, Vols. 127:(2), 496-497.
46. **Bidez, P.R., Li, S., MacDiarmid, A.G., Venancio, E.C., Wei, Y. and Lelkes, P.I.** "*Polyaniline, an electroactive polymer, supports adhesion and proliferation of cardiac myoblasts*". s.l. : Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2006, Vols. 17:(1-2), 199-212.

47. **Kwon, N.H., Rahman, M.A., Won, M.S. and Shim, Y.B.** "Lipid-bonded Conducting Polymer Layers for a Model Biomembrane: Application to Superoxide Biosensors". s.l. : Analytical Chemistry, 2006, Vols. 78:(1), 52-60.
48. **Vieira, S.N., Ferreira, L.F., Franco, D.L., Afonso, A.S., Gonçalves, R.A., Brito-Madurro, A.G. and Madurro, J.M.** "Electrochemical Modification of Graphite Electrodes with Poly(4-aminophenol)". *Macromolecular Symposia*, 245-246:(1), 2006, 236-242.
49. **Franco, D.L., Afonso, A.S., Vieira, S.N., Ferreira, L.F., Gonçalves, R.A., Brito-Madurro, A.G. and Madurro, J.M.** "Electropolymerization of 3-aminophenol on carbon graphite surface: Electric and morphologic properties". *Materials Chemistry and Physics*, 107:(2-3), 2008, 404-409.
50. **Silva, F., Vieira, S., Goulart, L., Boodts, J., Brito-Madurro, A. and Madurro, J.M.** "Electrochemical Investigation of Oligonucleotide-DNA Hybridization on Poly(4-Methoxyphenethylamine)". *International Journal of Molecular Sciences*, 9:(7), 2008, 1173-1187.
51. **Silva, T.A.R., Ferreira, L.F., Boodts, J.F.C., Eiras, S.P., Madurro, J.M. and Brito-Madurro, A.G.** "Poly(4-hydroxyphenylacetic acid): A new material for immobilization of biomolecules". *Polymer Engineering & Science*, 48:(10), 2008, 1963-1970. *Polymer Engineering and Science*, pp. 1963-1970.
52. **Franco, D.L., Afonso, A.S., Ferreira, L.F., Gonçalves, R.A., Boodts, J.F.C., Brito-Madurro, A.G. and Madurro, J.M.** "Electrodes modified with polyaminophenols: Immobilization of purines and pyrimidines". *Polymer Engineering & Science*, 48:(10), 2008, 2043-2050.
53. **Silva, T.A.R., Ferreira, L.F., Souza, L.M., Goulart, L.R., Madurro, J.M. and Brito-Madurro, A.G.** "New approach to immobilization and specific-sequence detection of nucleic acids based on poly(4-hydroxyphenylacetic acid)". *Materials Science and Engineering: C*, 29:(2), 2009, 539-545.
54. **Brito-Madurro, A., Ferreira, L., Vieira, S., Ariza, R., Filho, L. and Madurro, J.** "Immobilization of purine bases on a poly-4-aminophenol matrix". *Journal of Materials Science*, 42:(9), 2007, 3238-3243.
55. **Ferreira, L.F., Boodts, J.F.C., Brito-Madurro, A.G. and Madurro, J.M.** "Gold electrodes modified with poly(4-aminophenol): incorporation of nitrogenated bases and an oligonucleotide". *Polymer International*, 57:(4), 2008, 644-650.

56. **Daniel R. Theâvenot, Klara Toth, Richard A. Durst and George S. Welson.** *"International Union of Pure and Applied Chemistry - Electrochemical Biosensors, Recommended Definitions and Classification"* (Technical Report). s.l. : Pure Appl. Chem., Vol. 71, No. 12, pp. 2333-2348, 1999.
57. **D'Orazio, P.** *"Biosensors in clinical chemistry"*. 2003, Clinica Chimica Acta, 334:(1-2), pp. 41-69.
58. sciencedirect.com. *Science Directi.* [Online] [Citado em: 02 de 02 de 2011.] http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=1628327707&_sort=r&_st=13&view=c&_acct=C000037900&_version=1&_urlVersion=0&_userid=687360&md5=3701ef2303410f154aeb1c435af59b4f&searchtype=a.
59. **Clark Jr LC, Lyons C.** *"Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery"*. 1962, Ann N Y Acad Sci,102, pp. 29– 45.
60. **Yamanaka, Hideko.** *"Biossensores Eletroquímicos"*. [A. do livro] Salvador Alegret, María Isabel Pividori, Antonio AP. Pupim Ferreira Hideko Yamanaka. *Biossensores Eletroquímicos*. Araraquara - IQ-UNESP : Univesitat Autonomia de Barcelona, UAB, 2009, p. 17.
61. **Gooding, J.J.** *"Biosensor technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends"*. 2006, Analytica Chimica Acta, 559:(2), pp. 137-151.
62. **Mello, L.D.and Kubota, L.T.** *"Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries"*. 2002, Food Chemistry, 77:(2), pp. 237-256.
63. **Afonso, A.S.** *"Desenvolvimento de sensor bioeletroquímico para detecção de Hanseníase"*. *Dissertação de Mestrado, 2008, Universidade Federal de Uberlândia.*
64. **Patacas, R.C.** *"Desenvolvimento, caracterização e otimização de um biossensor amperométrico para a determinação de nitrato baseado em microinterfaces gelificadas"*. *Dissertação de Mestrado, 2007, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.*
65. **Ramanathan, K., Bangar, M.A., Yun, M., Chen, W., Myung, N.V.and Mulchandani, A.** *"Bioaffinity Sensing Using Biologically Functionalized Conducting-Polymer Nanowire"*. *Journal of the American Chemical Society, 127:(2), 2004, 496-497.*
66. **Ramanathan, K., Pandey, S.S., Kumar, R., Gulati, A., Murthy, A.S.N.and Malhotra, B.D.** *"Covalent immobilization of glucose oxidase to poly(o-amino benzoic*

- acid) for application to glucose biosensor". *Journal of Applied Polymer Science*, 78:(3), 2000, 662-667.
67. **Mikkelsen, S.R. and Corton, E.** "Bioanalytical Chemistry". John Wiley and Sons, 2004, New Jersey.
68. **Sharma, S.K., Sehgal, N. and Kumar, A.** "Biomolecules for development of biosensors and their applications". *Current Applied Physics*, 3:(2-3), 2003, 307-316.
69. **Turner, A., Karube, I. and Wilson, G.** "Biosensors: Fundamentals and Applications". Oxford University Press, 1987, Oxford, cap.6.
70. **Gerard, M., Chaubey, A. and Malhotra, B.D.** "Application of conducting polymers to biosensors". *Biosensors and Bioelectronics*, 17:(5), 2002, 345-359.
71. **Ying-Sing, F., Shi-Hui, S. and De-Rong, Z.** "Piezoelectric crystal for sensing bacteria by immobilizing antibodies on divinylsulphone activated poly-m-aminophenol film". *Talanta*, 51:(1), 2000, 151-158.
72. **Malhotra, B.D., Chaubey, A. and Singh, S.P.** "Prospects of conducting polymers in biosensors". *Analytica Chimica Acta*, 578:(1), 2006, 59-74.
73. **Chaubey, A., Gerard, M., Singhal, R., Singh, V.S. and Malhotra, B.D.** "Immobilization of lactate dehydrogenase on electrochemically prepared polypyrrole-polyvinylsulphonate composite films for application to lactate biosensors". *Electrochimica Acta*, 46:(5), 2001, 723-729.
74. "Thermo Fisher Scientific Inc. - Chemistry of Crosslinking". 2009, Disponível em: <http://www.piercenet.com/Products/Browse.cfm?fldID=CE4D6C5C-5946-4814-9904-C5946E01232683> Acesso em: 05/08/2009.
75. **Davis, F. and Higson, S.P.J.** "Structured thin films as functional components within biosensors". *Biosensors and Bioelectronics*, 21:(1), 2005, 1-20..
76. **Mousty, C.** "Sensors and biosensors based on clay-modified electrodes--new trends". *Applied Clay Science*, 27:(3-4), 2004, 159-177.
77. **Davis, J., Huw Vaughan, D. and Cardosi, M.F.** "Elements of biosensor construction". *Enzyme and Microbial Technology*, 17:(12), 1995, 1030-1035.
78. **Lei, Y., Chen, W. and Mulchandani, A.** "Microbial biosensors". *Analytica Chimica Acta*, 568:(1-2), 2006, 200-210.
79. **Liu, S., Ye, L., He, P. and Fang, Y.** "Voltammetric determination of sequence-specific DNA by electroactive intercalator on graphite electrode". *Analytica Chimica Acta*, 335:(3), 1996, 239-243.

80. **Swaile, B.A.H. and Chambers, J.Q.** "Electrochemical release of ethidium into and fluorescence detection of DNA-ethidium complexes in the diffusion layer at a carbon paste electrode". *Analytical Biochemistry*, 196:(2), 1991, 415-420.
81. **Zhu, N.N., Zhang, A.P., Wang, Q.J., He, P.G. and Fang, Y.Z.** "Electrochemical detection of DNA hybridization using methylene blue and electro-deposited zirconia thin films on gold electrodes". *Analytica Chimica Acta*, 510:(2), 2004, 163-168.
82. **Zhu, N., Chang, Z., He, P. and Fang, Y.** "Electrochemically fabricated polyaniline nanowire-modified electrode for voltammetric detection of DNA hybridization". *Electrochimica Acta*, 51:(18), 2006, 3758-3762.
83. **Teles, F.R.R. and Fonseca, L.P.** "Trends in DNA biosensors". *Talanta*, 77:(2), 2008, 606-623.
84. **Cosnier, S.** "Biosensors based on electropolymerized films: new trends". 2003, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377:(1), pp. 507-520.
85. **Goulart, L.R., Vieira, C.U., Freschi, A.P.P., Capparelli, F.E., Fujimura, P.T., Almeida, J.F., Ferreira, L.F., Goulart, I.M.B., Brito-Madurro, A.G. and Madurro, J.M.** "Biomarkers for serum diagnosis of infectious diseases and their potential application in novel sensor platforms". *Critical Review in Immunology*, (In Press), 2009.
86. **Afonso, A.S., Goulart, I.M.B., Goulart, L.R., Machado, A.E.H., Madurro, J.M. and A.G., B.-M.** "Bioelectrode for sequence-specific gene detection of *Mycobacterium leprae*". *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, (Submetido).
87. **Franco, D.L.** "Eletropolimerização de aminofenóis para desenvolvimento de biossensores eletroquímicos aplicados à detecção de gene específico para câncer de próstata". Dissertação de Mestrado, 2007.
88. **Riccardi, C.S., Costa, P.I. and Yamanaka, H.** "Imunossensor amperométrico". 2002, *Química Nova*, 25:(2), pp. 316-320.
89. **Skládal, P.** "Advances in electrochemical immunosensors". 1997, *Electroanalysis*, 9:(10), pp. 737-745.
90. **Morgan, C., Newman, D. and Price, C.** "Immunosensors: technology and opportunities in laboratory medicine". 1996, *Clinical Chemistry*, 42:(2), pp. 193-209.
91. Ministério da Saúde. [Online] [Citado em: 02 de Fevereiro de 2011.] http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31934.
92. Ministério da Saúde. [Online] [Citado em: 26 de 09 de 2010.] http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_conf_lv_16_9_10.pdf.

93. **Desjeux, P.** "The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide". 2001, Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 95:(3), pp. 239-243.
94. *World Health Organization. The world health report 2001, Vol. Geneva. 2001.*
95. **Gontijo, C.M.F. and Melo, M.N.** "Leishmaniose Visceral no Brasil: Quadro atual, desafios e perspectivas". 2004, Revista Brasileira de Epidemiologia, 7:(3), pp. 338-349.
96. **Dye, C. and Williams, B.G.** "Malnutrition, Age and the Risk of Parasitic Disease: Visceral Leishmaniasis Revisited". *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 254:(1339), 1993, 33-39.
97. **Loureiro, C.C.P., Dadalti, P., Gutierrez, M.C.G. and Ramos-e-Silva, M.** "Leishmaniose: Métodos diagnósticos". *Folha Médica*, 117:(2), 1998, 131-134.
98. **Dourado, Z.F., Silva, H.D., Silveira-Lacerda, E.P. and García-Zapata, M.T.A.** "Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rk39)". 2007, *Revista de Patologia Tropical*, 36:(3), pp. 205-214.
99. **Sundar, S. and Rai, M.** "Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis". 2002, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9:(5), pp. 951-958.
100. **Mohammed, E.A.E.R., Wright, E.P., Rahman, A.M.A., Kolk, A., Laarman, J.J. and Pondman, K.W.** "Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA-immunofluorescence and indirect haemagglutination". 1986, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80:(2), pp. 271-274.
101. **Burns Jr JM, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW.,** "Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis". *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(2):775-9.
102. **Chappuis F, Rijal S, Soto A, Menten J, Boelaert, M.** "A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis". *Brit Med J.* 2006; 333(7571):723.
103. **Singh S, Kumari V, Singh N.** "Predicting kala-Azar disease manifestations in asymptomatic patients with latent *Leishmania donovani* infection by detection of antibody against recombinant k39 antigen". *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9(3):568-72..

104. **Schallig HD, Canto-Cavalheiro M, Silva E.S.** "Evaluation of the direct agglutination test and the rk39 dipstick for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis". Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(7):1015–18.
105. **Salotra P, Sreenivas G, Beena KR, Mukherjee A, Rasmeh V.** "Parasite detection in patients with post Kala-azar dermal leishmaniasis in India: a comparison between molecular and immunological methods". J Clin Pathol. 2003;56(11):840–3.
106. **Maalej IA, Chenik M, Louzir H, Ben Salah A, Bahloul C, Amri F, Dellagi K.** "Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis". Am J Trop Med Hyg. 2003;68(3):312–20.
107. **Sreenivas G, Ansari NA, Singh R, Subba Raju BV, Bhatheja R, Negi NS, Salotra T.** "Diagnosis of visceral leishmaniasis: comparative potential of amastigote antigen, recombinant antigen and PCR". R J Biomed Sci. 2002;59(4):218–22.
108. **Sarker CB, Momen A, Jamal MF, Siddiqui NI, Siddiqui FM, Chowdhury KS, Rahman S, Talukder S.I.** "Immunochromatographic (rK39) strip test in diagnosis of visceral leishmaniasis in Bangladesh". Mymensingh Med J. 2003;12(2):93–7.
109. **Carvalho SF, Lemos EM, Corey R, Dietze R.** "Performance of recombinant antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis". Am J Trop Med Hyg. 2003;68(3):321–4.
110. **Boelaert M, Rijal S, Regmi S, Singh R, Kardi B, Jacquet D, Chappuis F, Campino L, Desjeux P, Le Ray D, Koirala S, Van der Stuyft P.** "A comparative study of effectiveness of diagnostic tests for Visceral leishmaniasis". Am J Trop Med Hyg. 2004;70(1):72–7.
111. **Sundar S, Maurya R, Singh RK, Bharti K, Chakravarty J, Parekh A, Rai M, Kumar K, Murray H.W.** "Rapid, noninvasive diagnosis of visceral leishmaniasis in India: comparison of two immunochromatographic strip tests for detection of anti-K39 antibody". J Clin Microbiol. 2006;44(1):251–3.
112. **BRETT, A.M.O. e BRETT, C.M.A.** "Electroquímica: princípios, métodos e aplicações". cap.9 e 10. Coimbra : Oxford university press, 1993.
113. **Bard, A.J. and Faulkner, L.R.** "Electrochemical methods: Fundamentals and applications". Canada : John Willey & Sons,, 1980.
114. **Mackenzie, R.C.** "Nomenclature in thermal analysis, part IV". s.l. : Thermochemica Acta, 28:(1),1-6, 1979.

115. **Cavalheiro, E.T.G., Breviglieri, S.T., Marino, G. and Chierice, G.O.** *"A Influência de Fatores Experimentais nos Resultados de Análises Termogravimétricas"*. s.l. : Química Nova, 1995, Vols. 18:(3), 305-308.
116. **Rocha, F.R.P. and Teixeira, L.S.G.** *"Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS"*. s.l. : Química Nova, 27:(5), 807-812, 2004.
117. **Silverstein, R. M.** *"Spectrometric Identification of Organic Compounds"*. s.l. : LTC, 4° Ed., 2000.
118. **Silverstein, R. M.** *"Spectrometric Identification of Organic Compounds"*. s.l. : LTC, 7° Ed, 2007.
119. **Wysoczanski, R. and Tani, K.** *"Spectroscopic FTIR imaging of water species in silicic volcanic glasses and melt inclusions: An example from the Izu-Bonin arc"*. s.l. : Journal of Volcanology and Geothermal Research, 2006, Vols. 156:(3-4), 302-314.
120. **Mariane Pinto Fernandes Távora, Maria Angélica Vieira da Costa Pereira, Valmir Laurentino Silva e Gilmar Ferreira Vita.** *"Estudo de validação comparativo entre as técnicas Elisa e RIFI para diagnosticar Leishmania sp em cães errantes apreendidos no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro"*. 2007, Comunicação/Communication - Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 40(4), pp. 482-483.
121. **Sur, U.K., Subramanian, R. and Lakshminarayanan, V.** *"Cyclic voltammetric and electrochemical impedance studies on the structure, adsorption kinetics, and barrier properties of some organic dithiol self-assembled monolayers on gold"*. s.l. : Journal of Colloid and Interface Science, 266:(1), 2003, 175-182.
122. **Janek, R.P., Fawcett, W.R. and Ulman, A.** *"Impedance Spectroscopy of Self-Assembled Monolayers on Au(111): Sodium Ferrocyanide Charge Transfer at Modified Electrodes"*. s.l. : Langmuir, 14:(11), 1998, 3011-3018.
123. **Protsailo, L.V. and Fawcett, W.R.** *"Electrochemical Impedance Spectroscopy at Alkanethiol-Coated Gold in Propylene Carbonate"*. s.l. : Langmuir, 18:(23), 2002, 8933-8941.
124. **Steichen, M., Doneux, T. and Buess-Herman, C.** *"On the adsorption of hexammineruthenium (III) at anionic self-assembled monolayers"*. s.l. : Electrochimica Acta, 53:(21), 2008, 6202-6208.
125. **Beni, V., Valsesia, A., Colpo, P., Bretagnol, F., Rossi, F. and Arrigan, D.W.M.** *"Electrochemical properties of polymeric nanopatterned electrodes"*. s.l. : Electrochemistry Communications, 9:(7), 2007, 1833-1839.

126. **Pinto, E.M., Gouveia-Caridade, C., Soares, D.M.and Brett, C.M.A.** "*Electrochemical and surface characterisation of carbon-film-coated piezoelectric quartz crystals*". s.l. : Applied Surface Science, 255:(18), 2009, 8084-8090.
127. **Zhi, Z.-l., Drazan, V., Wolfbeis, O.S.and Mirsky, V.M.** "*Electrocatalytic activity of DNA on electrodes as an indication of hybridisation*". s.l. : Bioelectrochemistry, 68:(1), 2006, 1-6.
128. **Company, Aldrich Chemical.** "*Aldrich: Desenvolvendo Ciência - Catálogo*", p. 1379. s.l. : Brasil - USA\$, 2005-2006.
129. **Smith, Brian.** "*Infrared Spectral Interpretation: a systematic approach*". Boca Raton : CRC, 1999.
130. **Ferreira, Lucas Franco.** "*Desenvolvimento de plataforma funcionalizada com poli(4-HBA) para aplicação em sensores biológicos*". Tese (doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia. 2009, p. 63.
131. **Benyoucef, A., Huerta, F., Ferrahi, M.I.and Morallon, E.** "*Voltammetric and in situ FT-IRS study of the electropolymerization of o -aminobenzoic acid at gold and graphite carbon electrodes Influence of pH on the electrochemical behaviour of polymer films*". s.l. : Journal of Electroanalytical Chemistry, 624:(1-2), 2008, 245-250.
132. **Nakaema, M.K.K.and Sanches, R.** "*Fluorometria no domínio da frequência*". 22:(3), 412-416, s.l. : Química Nova, 1999.
133. **Nathalie K. Guimarda, Natalia Gomez, Christine E. Schmidt,** "*Conducting polymers in biomedical engineering*". s.l. : Progress in Polimer Science, 2007, Vols. 32, 876–921.
134. **Huang, H., He, Q., Lin, H., Bai, F.and Cao, Y.** "*Properties of an alternating copolymer and its applications in LEDs and photovoltaic cells*". s.l. : Thin Solid Films, 2005, Vols. 477:(1-2), 7-13.
135. **Schultze, J.W.and Karabulut, H.** "*Application potential of conducting polymers*". s.l. : Electrochimica Acta, 2005, Vols. 50:(7-8), 1739-1745.
136. **Ivanov, S., Tsakova, V.and Mirsky, V.M.** "*Conductometric transducing in electrocatalytical sensors: Detection of ascorbic acid*". s.l. : Electrochemistry Communications, 2006, Vols. 8:(4), 643-646.