

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA**

Gisele Elias Nunes Pauli

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR
IMUNOCROMATOGRÁFICO E O USO DE FEOFITINA-B EM
SENSORES ELETROQUÍMICOS**

Tese submetida ao Programa de Pós
Graduação em Física da Universidade
Federal de Santa Catarina para
obtenção do Grau de Doutora em
Física.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Helmuth
Bechtold

Florianópolis

2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pauli, Gisele Elias Nunes
Desenvolvimento de um Biossensor Imunocromatográfico e
o Uso de Feofitina-b em Sensores Eletroquímicos / Gisele
Elias Nunes Pauli ; orientador, Ivan Helmuth Bechtold -
Florianópolis, SC, 2014.
166 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.
Programa de Pós-Graduação em Física.

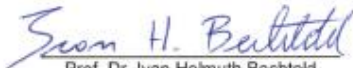
Inclui referências

1. Física. 2. Feofitina-b. 3. Sensores. 4.
Imunocromatográfico. 5. Biossensor. I. Helmuth Bechtold,
Ivan . II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Física. III. Título.

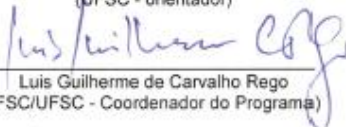
Desenvolvimento de um Biossensor Imunocromatográfico e o Uso de Feofitina-b em Sensores Eletroquímicos

Gisele Elias Nunes Pauli

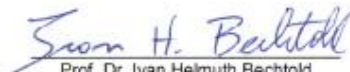
Esta Tese foi julgada adequada para a obtenção do título de **DOUTOR EM FÍSICA**, na área de concentração **Física da Matéria Condensada** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Física.



Prof. Dr. Ivan Helmuth Bechtold
(UFSC - orientador)



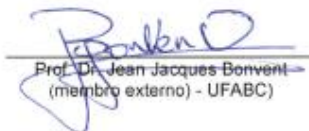
Luis Guilherme de Carvalho Rego
(FSC/UFSC - Coordenador do Programa)



Prof. Dr. Ivan Helmuth Bechtold
(UFSC - presidente)



Profª. Drª. Marta Elisa-Rosgo Dolto
(membro titular) - FSC/UFSC



Prof. Dr. Jean-Jacques Bonvent
(membro externo) - UFABC



Prof. Dr. Lucio Sartori Farenzena
(membro titular) - FSC/UFSC



Profª. Drª. Carla Eiras
(membro externo) - UFPI



Profª. Drª. Maria Luisa Sartorelli
(membro titular) - FSC/UFSC

Dedico esta tese de doutorado aos meus Pais Manoel e Pedra, aos meus irmãos Cristiane, Cristina e Marcos, e ao meu marido Fabian.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e Nossa Senhora Aparecida pelo conforto e amparo em todos os momentos.

À minha família: meus pais Manoel e Pedra, minhas irmãs Cristiane e Cristina, meu irmão Marcos, meus cunhados Tovar, Jak e Julian, às cunhadas Re e Sabrina, à minha tia Arlete e especialmente ao meu marido Fabian, agradeço por todo amor, carinho, apoio, por estarem sempre me incentivando e ajudando, e por serem a minha inspiração em mais uma etapa de minha vida. Amo vocês!!

Aos meus sogros Dona Ana e Seu Enio, à vó Maria e ao vô Celso e a toda a família e amigos de Itapiranga.

Ao Prof. Dr. Ivan H. Bechtold, um grande pesquisador, chefe e amigo, com quem estou tendo a oportunidade de trabalhar desde o mestrado, aprendendo e me espelhando em seu jeito simples, humilde e em sua enorme disposição em fazer pesquisa. Agradeço pela oportunidade, pela orientação, pelo entusiasmo, pelos ensinamentos, conselhos, pela confiança estabelecida, paciência e acima de tudo pela amizade.

Aos amigos do LOOSA: Alan, Alessandra, Carlos, Deborah, Fabrício, Franco, Inácio, Juliana, Larissa, Lizandra, Marta, Mateus, Paulo e Renato. E aos amigos que já não estão mais no grupo: André, Bruno, Daniel, George, Mariana e Michele.

A todo grupo do BIOTEC - Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia – UFPI - Parnaíba, em especial aos professores: Carla Eiras e José Roberto Leite, e ao Felipe pela colaboração e pelos ensinamentos. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. William G. Matias do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC e a Silvia.

À Profa. Maria de Fátima V. Souza e a seus alunos: Otemberg Souza Chaves, Severino G. Brito Filho que sintetizaram a Feofitina-b, na Universidade Federal da Paraíba.

À Profa. Dra. Maria Luísa Sartorelli, ao Lucas, ao Robson e a Luana e demais colegas do Lab-SiN, UFSC.

Aos amigos da química do grupo de professor Hugo Gallardo, especialmente a Marli, grande pessoa e amiga para todos os momentos.

Ao grupo do professor André Pasa, especialmente a Silvia, por sua amizade e carinho.

Um agradecimento muito especial ao professor Arben Merkoçi por me permitir passar oito meses frutíferos em seu grupo de pesquisa em

Biossensores no Instituto Catalão de Nanotecnologia (ICN2), em Bellaterra, Barcelona, Espanha. Um agradecimento muito especial vai para Alfredo, que me orientou durante o meu estágio no ICN2, e que realmente é um grande guia científico. Agradeço também ao Cláudio com quem tive a oportunidade de trabalhar em parceria e aprender muito. Minha experiência em Barcelona também não poderia ser possível sem a ajuda e amizade de pessoas maravilhosas: LuLu (grande pesquisadora e amiga para vida inteira), Carmen (grande amiga e uma pessoa muito batalhadora, e apesar de não termos trabalhado diretamente juntas, passei a admirar muito sua dedicação e a forma mãezona com que orientava), Helena, Sandrine, Marissol, Flavio, Alex 1, Miguel, Maria, Thiago, Daniel, Alex 2, Guilherme, Briza, Alfredo 2, Mariana, Luis, Adaris, Anna, Jihane, Amal, Lenka, Andrejz, Serdar e Eden. E é claro à Anna (sem ela nada funcionaria neste grupo). E aos amigos Ian, Bergoi e Encarna. Muchas Gracias!

Aos amigos: Carol, Guga, Dani, Leo, Galega, Mana, Ika, Luiza, Elni, Cila, Mário e família, Adriana, Robson, Maicon, Tiago, Luciano, seu Fernando, Rodrigo e Dri e profa. Mayra Alexandrino.

À minha família em geral, especialmente ao tio Eurides que sempre insentivou a dedicação aos estudos.

Aos órgãos de fomento Rede Nanobiomed, CAPES e CNPq, que foram de fundamental importância para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação de Física da UFSC com um agradecimento especial ao Antônio, pelo empenho, dedicação, disposição, pelo trabalho sério que faz toda a diferença, e também pela amizade.

Aos membros da banca: Profa. Dra. Carla Eiras, Profa. Dra. Marta Elisa Rosso Dotto, Profa. Dra. Maria Luisa Sartorelli, Prof. Dr. Jean-Jacques Bonvent e Prof. Dr. Lúcio Sartori Farenzena, que se dispuseram a contribuir e avaliar o trabalho.

Agradeço sinceramente a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese de doutorado.

"Se consegui ver mais longe é porque me apoiei nos ombros de gigantes."

(Isaac Newton)

RESUMO

Nos últimos anos a comunidade científica tem se dedicado à elaboração de sensores capazes de identificar e quantificar espécies químicas e biológicas. Grandes avanços foram alcançados no desenvolvimento de novos métodos de preparação, imobilização de receptores em plataformas específicas e novas formas de detecção. Este trabalho trata do estudo e caracterização de sensores e biossensores para aplicações práticas, e se divide em duas partes: na primeira, investigou-se a utilização da Feofitina-b, composto isolado da planta *Turnera subulata*, como sensor eletroquímico não enzimático, sendo testado na detecção do peróxido de hidrogênio. Foram preparados filmes automontados com diferentes arquiteturas e com utilização de materiais auxiliares como hidrocloreto de polialilamina (PAH) e a goma do cajueiro. Os resultados obtidos indicam que este sistema apresenta a atividade desejada. Na segunda, elaborou-se um novo dispositivo, o “*Lab-in a syringe*” (LIS), baseado em um simples imunoenensaio de fluxo vertical (VFIA) para a detecção de proteínas, utilizando nanopartículas de ouro como marcadores do sinal resposta. Esse dispositivo é fácil e rápido de ser utilizado, uma vez que a leitura pode ser obtida em menos de 15 minutos. Os resultados obtidos são promissores, tendo sido aplicado com sucesso para a detecção do antígeno específico da próstata (PSA) diretamente na urina humana. Esse dispositivo pode ser útil como método rápido e simples para a detecção de outros analitos importantes para monitoramento ambiental, biossegurança e controle de alimentos.

Palavras chaves: Sensores e Biossensores, Feofitina-b, técnica de automontagem, peróxido de hidrogênio, imunoenensaio de fluxo vertical (VFIA), PSA, nanopartículas de ouro.

ABSTRACT

In the last years the scientific community has devoted attention to developing sensors with the ability for identification and quantification of chemical and biological species. Important results have been obtained in developing new preparation methods, receptors immobilization in specific platforms and new detection mechanisms. This thesis deals with the study and characterization of sensors and biosensors aiming at practical applications, and is divided into two parts: in the first, the use of Pheophytin-b, a compound isolated from the plant *Turnera subulata*, was characterized and investigated as a non-enzymatic electrochemical sensor, being tested for detection of hydrogen peroxide. Self-assembled thin films were prepared with several architectures using auxiliary materials like Poly(allylamine) hydrochloride (PAH) and cashew gum. The obtained results indicated that the system presents the desired activity. In the second part, a new device was elaborated, the "Lab-in a syringe" (LIS), based in a simple vertical flow immunoassay (VFIA) for protein detection, using gold nanoparticles as the signal response markers. This device is easy and fast to use, yielding results in less than 15 minutes. The sensor has been successfully applied to detect the prostate specific antigen (PSA) directly from the human urine, with promising results. This device can be useful as a quick and simple method for detection of important analytes to environmental monitoring, biosecurity and food control.

Keywords: Sensors and biosensors, pheophytin-b, self-assembly technique, hydrogen peroxide, vertical flow immunoassay (VFIA), PSA, gold nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Configuração esquemática de um sensor (bio)químico [8]. . 28
- Figura 2:** Processo de automontagem ou LbL: Inicialmente o substrato carregado negativamente é mergulhado num béquer contendo a solução policatiônica por um determinado período de tempo. Em seguida, o sistema passa por um processo de lavagem para a remoção das moléculas depositadas em excesso e/ou ligadas fracamente ao substrato. Posteriormente o sistema é submetido a um fluxo de nitrogênio (N₂) para secagem desta monocamada positiva. O sistema substrato/polication é mergulhado na solução poliânionica, e após a repetição das etapas de lavagem e secagem em N₂, tem-se uma bicamada finalizada [58]. 40
- Figura 3:** Célula eletroquímica com três eletrodos. 43
- Figura 4:** Voltametria cíclica (a) variação do potencial com o tempo. (b) resposta da corrente em função do potencial aplicado para um sistema redox reversível [1]. 44
- Figura 5:** Estruturas do macrociclo da porfirina [68]. 46
- Figura 6:** Estrutura química da clorofila-a e clorofila-b [71]. 47
- Figura 7:** Esquema das reações de obtenção das feofitinas a e b a partir das clorofilas a e b (adaptado de [70, 71]). 48
- Figura 8:** Comparação do espectro de absorção da Feof-b em éter dietílico, acetona, metanol e benzeno, à temperatura ambiente. Os espectros foram dimensionados aos máximos de absorção da banda de Soret (entre 430 e 440 nm) e banda Q (entre 650 e 660 nm) [73]. 49

Figura 9: Absorção óptica para a monocamada de feofitina-a (linha sólida) e para feofitina-a em solução de benzeno (linha tracejada). Figura extraída da Referência [75].....	50
Figura 10: (A) Voltamogramas cíclicos para o biossensor enzimático ITO/APTMS/Au coloidal/HRP: (a) na ausência e (b) na presença de H ₂ O ₂ . (B) Resposta do biossensor enzimático para as injeções sucessivas de H ₂ O ₂ e a respectiva curva de calibração do biossensor [94].....	53
Figura 11: (A) Goma bruta coletada na cidade de Ilha Grande – PI e (B) Goma Purificada.	56
Figura 12: Estrutura química da PAH.....	57
Figura 13: Fórmula estrutural da Feof-b [47, 100].	58
Figura 14: Esquema de formação de filmes contendo quadricamadas [64].....	59
Figura 15: Espectro de absorção da solução de (A) Feof-b e (B) PAH e goma do cajueiro.....	64
Figura 16: (A) Espectro de absorção na região do visível para o filme automontado das monocamadas de Feof-b e (B) a relação entre a absorbância da banda em 406 nm em função do número de bicamadas, onde a linha tracejada indica um ajuste exponencial.	66
Figura 17: (A) Espectro de absorção para o filme automontado de PAH/Feof-b. (B) Relação entre a absorbância máxima (em 411 nm) em função do número de bicamadas.	67
Figura 18: (A) Espectro de absorção na região do visível para o filme automontado do sistema Goma/Feof-b. (B) Relação entre a absorbância máxima (em 416 nm) em função do número de bicamadas.....	68

- Figura 19:** (A) Espectro de absorção para o filme automontado para o sistema de quadricamadas de PAH/Goma/PAH/Feof-b. (B) Relação entre a absorbância máxima (409 nm) em função do número de quadricamadas..... 70
- Figura 20:** Imagens de AFM para filmes de Feof-b com 15 monocamadas (A) e 20 monocamadas (B)..... 71
- Figura 21:** Imagens AFM para um filme de PAH/Feof-b apenas com (a) 15 bicamadas e (b) 20 bicamadas..... 72
- Figura 22:** Imagens AFM para os filmes (A) Goma/Feof-b com 15 bicamadas; e (B) PAH/Goma/PAH/Feof-b com 20 quadricamadas..... 72
- Figura 23:** (A) Imagem AFM de um filme com 20 bicamadas de PAH/Feof-b e (B) seção transversal mostra exatamente a espessura do filme. 73
- Figura 24:** Voltamogramas cíclicos: (A) para o ITO puro e para ITO modificado com três monocamadas de PAH ou goma do cajueiro, (B) para o ITO puro e modificado com três monocamadas de Feof-b. Todas as medidas foram realizadas em HCl 0,1 mol/L, a 50 mV/s. 76
- Figura 25:** Voltamogramas cíclicos para ITO modificado com o sistema com bicamadas: (A) PAH/Feof-b ou Feof-b/PAH e (B) Goma/Feof-b ou Feof-b/Goma. Todas as medidas foram realizadas em HCl 0,1 mol/L a 50 mV/s. 77
- Figura 26:** Voltamogramas cíclicos para o ITO modificado com os filmes: Feof-b, PAH/Feof-b, Feof-b/PAH, Goma/Feof-b, Feof-b/Goma, e PAH/Goma/PAH/Feof-b. Todas as medidas foram realizadas em HCl 0,1 mol/L, a 50 mV/s..... 78

Figura 27: (A) Voltamogramas cíclicos para ITO puro e filmes monocamadas de PAH, Feof-b, e goma, além de filmes bicamadas de Feof-b/Goma, Goma/Feof-b, PAH/Feof-b e Feof-b/PAH. As medidas foram realizadas em HCl 0,1 mol/L, contendo 100 mmol/L de H₂O₂, a 50 mV/s; (B) Curvas normalizadas. 80

Figura 28: Voltamogramas cíclicos para o ITO puro e para o eletrodo de ITO modificado com o filme multicamadas de Goma/feof-b na ausência e na presença de 100 mmol/L de H₂O₂ em HCl (0,1 mol/L) a uma velocidade de varredura de 50 mV/s. 83

Figura 29: (A) Respostas Cronoamperométrica observada para o eletrodo ITO/Goma/feof em 0,1 mol/L de HCl, após injeções sucessivas de H₂O₂ (1,1 mmol/L). Potencial aplicado: 0.0V; e (B) Curva de calibração. 84

Figura 30: Representação esquemática da molécula de anticorpo..... 92

Figura 31: Esquema ilustrativo do método de LFIA [20]. 94

Figura 32: Diagrama esquemático de um imunoenensaio de fluxo lateral no formato competitivo indireto: (A) na ausência do analito (toxina livre na amostra); e (B) analito presente na amostra [21]. 97

Figura 33: Interpretação dos resultados do ensaio de fluxo lateral no formato competitivo [124]. 98

Figura 34: Representação esquemática do imunoenensaio de fluxo lateral no formato competitivo, em que o antígeno é marcado e o anticorpo é revestido sobre a membrana [21]. 99

Figura 35: Ilustração esquemática da configuração de tira de teste de fluxo lateral no formato sanduíche: (A) a amostra contendo analito é aplicada ao *sample pad*; (B) o analito se liga aos anticorpos no *conjugation pad* e o migram ao longo da membrana de NC por ação

capilar; (C) o complexo AuNPs/anticorpo-analito formado é capturado pelo anticorpo imobilizado na linha de teste e o excesso de conjugado AuNPs/anticorpo pelo anticorpo na linha de controle. O excesso de conjugados AuNPs/anticorpo continuam a migrar até o *absorbent pad*; (D) Interpretação do resultado do teste: Resultado Positivo – Na presença de analito na amostra o desenvolvimento da cor vermelha aparece em ambas as linhas de teste e controle. Resultado Negativo – Na ausência de analito na amostra, somente ocorre desenvolvimento de cor vermelha na linha de controle (CL), mostrando que o teste funcionou adequadamente [125, e adaptado de 127]..... 100

Figura 36: Mudança na coloração de uma suspensão de nanopartículas devido ao processo de agregação [138]..... 104

Figura 37: Espectros de absorção de suspensões de nanopartículas de ouro antes (linha pontilhada) e após (linha contínua) o processo de agregação [138]..... 105

Figura 38: Imagem esquemática da adsorção de proteínas sobre colóides de ouro [28]..... 105

Figura 39: Teste de agregação das nanopartículas de ouro: Na presença de uma concentração suficiente de proteína no conjugado (A) e na ausência de proteína (B)..... 106

Figura 40: (A) Resultado do teste imunocromatográfico sanduíche para *S. typhi*. Onde C: ponto de controle; T: ponto de teste; N: resultado negativo (0,0 cfu/mL of *S. typhi*); P: resultado positivo ($1,14 \times 10^8$ cfu/mL de *S. typhi*). (B) Concentrações de *S. typhi* adicionadas na tira de teste [143]..... 109

Figura 41: Detecção de a troponina I, com concentrações variáveis de LFA (A) convencional e (B) a LFA baseado no conjugado duplo de AuNP. No caso de (A), o tamanho de AuNP foi de 10 nm. No caso de

(B), as dimensões da primeira e segunda AuNP foram de 10 e 40 nm, respectivamente [144]...... 110

Figura 42: Princípio de funcionamento do *lab-in-a syringe* (LIS) baseado no imunoenensaio de fluxo vertical (VFIA). (Esquerda) Cartuchos de conjugado e de detecção conectados em série a uma seringa padrão para aquisição de amostra e, posteriormente, succioná-lo através dos *pads*. (Direita) Esquema das reações imunológicas que ocorrem no *conjugate pad* e no *detection pad* quando a amostra é aspirada com a seringa..... 112

Figura 43: Dispersão coloidal de AuNPs..... 115

Figura 44: Impressão de cera sobre a membrana de nitrocelulose: (A) um círculo sem cera e (B) dois círculos sem cera. 118

Figura 45: Foto da configuração utilizada para o VFIA. Os Cartuchos do conjugado e de detecção foram conectados em série a uma seringa padrão e usados para coletar a amostra e, subsequentemente, o fluxo foi aspirado através dos *pads*..... 119

Figura 46: Caracterização das AuNPs: (A) O espectro de UV-Vis; (B) Micrografia TEM; e (C) Histograma da distribuição de diâmetro das partículas e a distribuição Gaussiana ajustada aos dados..... 123

Figura 47: Resultados do GAT para a otimização da conjugação AuNPs/anti-HIgG. (A) Diagrama da diferença da absorbância entre 520 e 580 nm, para diferentes pHs e diferentes concentrações de anticorpos; (B) Espectros de absorção em pH 9,0 para as diversas concentrações de anticorpos utilizadas em (A); e (C) Fotografia das soluções de conjugado AuNPs/anticorpo para as diversas concentrações de anticorpos estudadas, após a adição de NaCl, em pH 9,0 e um poço com apenas AuNPs para controle. 126

Figura 48: Resultados do GAT para AuNPs/anti-PSA. Diagrama da diferença da absorvância entre 520 e 580 nm, para diferentes pHs e diferentes concentrações de anticorpos. 126

Figura 49: Caracterização dos conjugados AuNPs/anticorpos mostrando a diferença de absorvância (Abs520-Abs580) em função da concentração de anticorpos: anti-HIgG (A) ou de anti-PSA (B) a partir do teste de agregação de ouro (GAT); e as fotografias correspondentes as maiores concentrações de anticorpo anti-PSA que evitaram a agregação das AuNPs(C). 128

Figura 50: Teste de fluxo lateral para detecção de HIgG apresentando as curvas de calibração (medida quantitativa) e a fotografia do ensaio qualitativo (da esquerda para a direita: 0 , 10, 50, 100, 200 e 500 ng/mL) utilizando: (A) Leitor de fluxo lateral; e (B) o *software* ImageJ. 130

Figura 51: Efeito do volume da amostra em função do sinal analítico. (A, superior) Fotografias das zonas de detecção obtidas após os testes realizados com diferentes volumes de amostra (da esquerda para a direita: 2 mL a 6 mL) a uma concentração de HIgG de 50 ng/mL. (A, meio) Esquemas dos processos que ocorrem na linha de detecção. (A, inferior) Fotos da seringa correspondente de cada ensaio. (B) sinal analítico (expresso como % da intensidade da cor; quantificados utilizando *software* ImageJ) a partir das zonas de teste em função do volume da amostra. 133

Figura 52: (A) Efeito da concentração de HIgG para a intensidade do sinal analítico (expressa como % da intensidade da cor, quantificada utilizando o *software* ImageJ) para o ensaio com o volume de amostra de 5 mL. (B) Fotos dos pontos de teste na zona de detecção (da esquerda para a direita: 0, 5, 10, 50, 200 e 500 ng/mL de HIgG)..... 134

Figura 53: (A) Imagem da foto do imunoensaio de fluxo vertical em diferentes concentrações de HIgG (da esquerda para a direita: 0 , 10,

50, 100, 200 e 500 ng/mL) e (B) curva de calibração obtida a partir da análise quantitativa..... 136

Figura 54: (A) Foto imagem do biossensor em diferentes concentrações HIgG (da esquerda para a direita: 0 , 10, 100, 200 e 500 ng/mL) bloqueada com BSA e (B) curva de calibração (análise quantitativa). 137

Figura 55: (A) Fotos da região de detecção (da esquerda para a direita: 0, 10, 50, 100, 200 e 500 ng/mL de PSA); e (B) Curva de calibração para os padrões de PSA em tampão PBS (0,1 M). Os quadrados vermelhos na curva correspondem aos sinais obtidos para três amostras de urina humana que foram adicionadas com PSA para obter a concentração de 150 ng/mL; Detalhe: Foto da região de detecção obtidos para o ensaio de urina, com ou sem PSA; 139

Figura 56: (A) Fotografia do imunoensaio de fluxo vertical em diferentes concentrações de PSA (da esquerda para a direita: 0, 1, 10, 50 e 100 ng/mL) e (B) a curva de calibração da detecção quantitativa.... 140

Figura 57: (A) Fotografia do imunoensaio de fluxo vertical em diferentes concentrações de PSA (da esquerda para a direita: 0, 10, 50, 100 e 150 ng/mL); e (B) curva de calibração a partir da análise quantitativa..... 141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição das soluções utilizadas na preparação dos filmes LbL.....	55
Tabela 2: Valores da rugosidade média e espessura dos filmes estudados.....	73
Tabela 3: Valores de E_{pa} e I_{pa} para os eletrodos de trabalho Feof-b, Feof-b/PAH, PAH/Feof-b, Feof-b/Goma e PAH/Goma/PAH/Feof-b em eletrólito ácido 0,1 mol/L.....	79
Tabela 4: Valores de potencial de pico catódico (E_{pc}) e densidade de corrente de pico catódico (J_{pc}) para os eletrodos de trabalho: ITO puro, ITO/PAH, ITO/Goma, ITO/Feof-b ITO/Feof-b/PAH, ITO/PAH/Feof-b, ITO/Feof-b/Goma e ITO/Goma/Feof-b em eletrólito ácido 0,1 mol/L na presença de uma concentração fixa de peróxido de hidrogênio (100 mmol/L).....	81

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- SA – automontagem, (do inglês *self-assembly*)
- LbL – automontagem camada a camada, (do inglês *Layer-by-Layer*).
Técnica de produção de filme ultrafino.
- LB – *Langmuir-Blodgett*.
- LFIA - imunoensaio de fluxo lateral, (do inglês *Lateral flow immunoassays*)
- HCG - gonadotrofina coriônica humana, (do inglês *human chorionic gonadotropin*)
- PSA - antígeno específico da próstata, (do inglês *prostate specific antigen*)
- HIgG - Imunoglobulina G humana
- AuNPs - Nanopartículas de ouro, (do inglês *gold nanoparticles*)
- H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
- Feof-b - Feofitina-b
- UV-Vis - ultra-violeta visível.
- AFM - Microscopia de Força Atômica, (do inglês *Atomic Force Microscopy*)
- VFIA - imunoensaio de fluxo vertical, (do inglês *vertical flow immunoassay*)
- LIS – laboratório em seringa, (em inglês “*Lab-in a syringe*”)
- VC – voltametria cíclica
- TEM - Microscopia Eletrônica de Transmissão, (do inglês *Transmission Electronic microscopy*)
- ITO – óxido de índio dopado com estanho, (do inglês *Indium Tin Oxide*)
- um material transparente condutor.
- PAH - hidrocloreto de polialilamina (Poly(allylamine) hydrochloride).
Policátion utilizado na produção de filme automontado.
- SCE - eletrodo saturado de calomelano, (do inglês *saturated calomel electrode*)
- Epa - potencial de pico anódico
- Epc - potencial de pico catódico
- Ipa - corrente de pico anódico
- Ipc - corrente de pico catódico
- F* - constante de Faraday (96485 C/mol),
- A* - a área do eletrodo em cm²
- C* - a concentração das espécies oxidadas em mol/cm³
- D* - o coeficiente de difusão das espécies oxidadas
- CH₃ - grupo metil
- CHO - grupo aldeído

Mg⁺² – íon magnésio
KOH - hidróxido de potássio
PA - pureza analítica
J_{cp} - densidade de corrente de pico catódico
RMS - rugosidade média da superfície
(L) - cadeias leves
(H) - cadeias pesadas
(C) - domínios constantes
(V) - domínios variáveis
A_c - anticorpo
A_g - antígeno
NC – nitrocelulose
DNA - ácido desoxirribonucléico
BSA -albumina do soro bovino, (do inglês *bovine serum albumine*)
GAT - teste de agregação
LSPR - ressonância de plasmon localizada de superfície, (do inglês *localized surface plasmon resonance*)
Au – ouro
Ag - prata
HAuCl₄.3H₂O - Hidrogênio tetracloroaurato (III) trihidratado
Na₃C₆H₅O₇ - citrato trissódico
NaCl - cloreto de sódio
PBS - tampão fosfato salino, (do inglês *phosphate buffer saline*)
BB - tampão borato (do inglês *borate buffer*)
SDS - Dodecil sulfato de sódio, (do inglês *sodium dodecyl sulfate*)
RSD - *relative standard deviation*
NIH - *National Institute of Health*
LT – linha de teste, (do inglês *test line*)
LC – linha de controle, (do inglês *control line*)
LOD – Limite de detecção (do inglês *limit of detection*)

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVO	27
1.1 Introdução	28
1.2 Objetivos	32
CAPÍTULO 2: FILMES AUTOMONTADOS CONTENDO FEOF- B: ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO	35
2.1 Fundamentos Teóricos.....	38
2.1.1 Imobilização de moléculas em sensores	38
2.1.1.1 Filmes Automontados (SA) ou camada a camada (LbL)	38
2.1.2 Técnicas de Caracterização de Filmes finos para Sensores	42
2.1.2.1 Voltametria Cíclica (VC)	42
2.1.2.2 Cronoamperometria	44
2.2. Materiais	46
2.2.1 Feofitinas.....	46
2.2.2 Gomas Naturais.....	50
2.2.3 Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)	51
2.2.3.1 H ₂ O ₂ e aplicação em sensores e biossensores	52
2.3 Parte Experimental.....	55
2.3.1 Materiais	55
2.3.2 Fabricação dos filmes automontados	58
2.3.3 Caracterização dos filmes automontados	59
2.3.3.1 Espectroscopia na região do Ultra-Violeta Visível (UV – Vis)	59
2.3.3.2 Microscopias de Força Atômica (AFM)	60
2.3.3.3 Medida Eletroquímica.....	60
2.3.3.3.1 Voltametria Cíclica (VC)	60
2.3.3.3.2 Cronoamperometria	61
2.4 Resultados e Discussões	63
2.4.1 Monitoramento do crescimento dos filmes	63
2.4.2 Medidas AFM	71
2.4.3 Caracterização Eletroquímica	75
2.4.3.1 VC em meio ácido.....	75
2.4.3.2 Teste de detecção de peróxido de hidrogênio por VC	79
2.4.3.3 Cronoamperometria	83

CAPÍTULO 3: LAB-IN-A-SYRINGE UTILIZANDO NANOPÁRTICULAS DE OURO PARA DETECÇÃO DE PROTEÍNAS	87
3.1 Fundamentos Teóricos.....	90
3.1.1 PSA	90
3.1.2 Anticorpo – Antígeno.....	91
3.1.3 Imunoensaio de fluxo lateral (LFIA).....	92
3.1.3.1 Princípio básico.....	94
3.1.3.2 Formatos dos LFIA.....	95
3.1.4 Nanopartículas de Ouro (AuNPs) ou ouro coloidal.....	101
3.1.4.1 Síntese de AuNPs.....	102
3.1.4.1.1 Síntese por citrato.....	102
3.1.4.2 Conjugados de ouro coloidal.....	103
3.1.4.3 AuNPs no ensaio de fluxo lateral.....	107
3.1.5 LIS - VFIA	111
3.2 Parte experimental	113
3.2.1 Materiais e instrumentos	113
3.2.2 Preparação dos Tampões.....	114
3.2.3 Preparação de nanopartículas de ouro (AuNPs).....	114
3.2.3.1 Micrografia das AuNPs.....	115
3.2.4 AuNPs modificadas com anticorpos	116
3.2.5 Preparação das tiras LFIA	117
3.2.6 Procedimento do LFIA.....	117
3.2.7 Preparação do <i>conjugate pad</i> e <i>detection pad</i> do VFIA.....	118
3.2.8 Configuração para o fluxo de imunoensaio vertical (VFIA) com seringa.....	118
3.2.9 ImageJ	120
3. 3 Resultados e discussão	121
3.3.1 Caracterização das nanopartículas de ouro.....	122
3.3.2 Caracterização dos conjugados AuNPs-anticorpo.....	123
3.3.3 Ensaio de Fluxo Lateral.....	128
3.3.4 Princípio do LIS	131
3.3.4.1 Efeito do volume de amostra no sinal analítico: analito pré-concentrado	131

3.3.4.2 Demonstração de prova do conceito de detecção HIgG do LIS	135
3.3.4.3 Detecção HIgG com uma solução de bloqueio	136
3.3.4.4 A detecção de PSA: adicionado e recuperado em amostras de urina humana.....	138
3.3.4.5 A detecção de PSA: <i>Conjugate pad</i> com caseína	139
3.3.4.6 A detecção de PSA sem impressão de cera na membrana de detecção	140
CAPÍTULO 4: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	143
4.1: Conclusões	144
4.2 Perspectivas Futuras	146
CAPÍTULO 5: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	147
ANEXO 1	165

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVO

1.1 Introdução

O desenvolvimento de sensores vem sendo uma das áreas mais ativas da pesquisa analítica, destacando-se como uma importante ferramenta para detecção de uma ampla variedade de analitos [1]. Os sensores podem ser definidos, de maneira geral, como dispositivos constituídos de um sistema de reconhecimento, normalmente denominado de receptor, com a propriedade de reconhecer e interagir com o analito de interesse. Essa interação resulta na alteração de propriedades físico-químicas, que são medidas e detectadas pelo transdutor, o qual converte a informação em um sinal mensurável [2-6]. Quando o sistema de reconhecimento é um elemento biológico, tais como anticorpos, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, organelas e células, onde o processo bioquímico é a fonte do sinal analítico, os sensores são definidos como biossensores [2, 4, 5,7]. A definição é ilustrada na Figura 1.

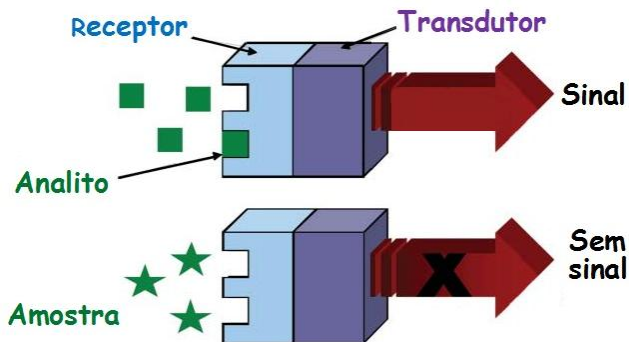


Figura 1: Configuração esquemática de um sensor (bio)químico [8].

Nos últimos anos, a união entre as diferentes áreas do conhecimento: biologia, eletroquímica, bioquímica, engenharia, nanomateriais e física, tornou possível o desenvolvimento de novos dispositivos sensores altamente específicos, sensíveis, de resposta rápida, e confiáveis [2, 9]. A utilização dessa tecnologia interdisciplinar oferece oportunidades de monitoramento no campo ambiental, da ciência biomédica, saúde, pecuária, agricultura, veterinária, nas indústrias de alimentos e medicamentos, e ainda, outras aplicações que

vêm surgindo a cada dia e que tem apresentado alternativas promissoras no cenário científico e industrial [1, 2, 9-12].

Dentre as aplicações na área da saúde a mais conhecida é o biossensor para o monitoramento do nível de glicose no sangue, principalmente por pacientes diabéticos. Outra aplicação é o teste de gravidez de farmácia, baseado na tira de teste imunocromatográfico que mede a quantidade do hormônio gonadotrofina coriônica humana (do inglês *human chorionic gonadotropin* - HCG) na urina. A utilização de biossensores na detecção precoce de câncer, como por exemplo, do antígeno específico da próstata (do inglês *prostate specific antigen* - PSA), que corresponde a uma proteína relacionada à detecção do câncer de próstata, tem permitido o tratamento nos estágios iniciais da doença e com isso, podendo salvar muitas vidas. Destaque também para a detecção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo o seu monitoramento de grande importância para a medicina.

Para garantir uma boa funcionalidade, os sensores, em geral, devem apresentar algumas características: 1) alta sensibilidade, para a análise de pequenas quantidades de analitos; 2) baixo custo, para permitir sua fabricação em massa; 3) alta seletividade, para que o dispositivo interaja exclusivamente com o composto de interesse, o que pode ser alcançado com a utilização de elementos de reconhecimento específicos; 4) tempo de análise curto, para uma ação rápida; 5) fácil manuseio, para não necessitar de pessoal treinado e qualificado; 6) Capacidade de realizar análises em tempo real, o que é interessante para monitoramento sempre que necessário [13].

A combinação de algumas das características mencionadas acima, proporciona aos dispositivos sensores uma posição vantajosa em relação aos procedimentos e técnicas analíticas que necessitam de uma instrumentação complexa e pessoal especializado [7, 13]. Neste âmbito, alguns instrumentos analíticos utilizados no monitoramento do meio ambiente, alimentos, ou laboratórios de análises clínicas, estão baseados na utilização de sensores ou biossensores [12, 14].

A maioria das formas de transdução pode ser categorizada em métodos de detecção eletroquímica, termométrica, piezoelétrica, óptica, etc [3, 4].

Os sensores eletroquímicos, em que um eletrodo é utilizado como elemento de transdução, representam uma subclasse importante e de interesse entre os sensores atualmente disponíveis [1].

Adicionalmente, o método destaca-se devido ao seu baixo custo, alta sensibilidade, baixos limites de detecção, ampla faixa linear de resposta e reprodutibilidade [14, 15].

Neste contexto, a produção de filmes finos utilizando a técnica de automontagem (do inglês *self-assembly* - SA) ou camada por camada (do inglês *Layer by Layer* - LbL) [16] para modificar eletrodos, permitiu a fabricação de uma série de novos sistemas/dispositivos, apresentando vantagens como baixo custo, fácil manuseio e as interações sinérgicas entre os diferentes componentes do filme, ademais, em sistemas onde o controle no nível molecular se faz necessário, esta técnica tornou-se uma ferramenta importante [17]. Dentre a diversidade de materiais que podem ser empregados na técnica de automontagem, aqueles com propriedades eletroativas estão sendo utilizados por pesquisadores em sensores e biossensores eletroquímicos [17, 18].

Os biossensores ópticos baseados no imunoenensaio de fluxo lateral (do inglês *Lateral flow immunoassays* - LFIA), também chamado de ensaio imunocromatográfico, são uma ferramenta atrativa [19 -21] e um exemplo de método que vem sendo utilizado na detecção de proteínas, tais como: HCG [19, 22], PSA [23], e Imunoglobulina G humana (HIgG) [9], e outros tipos de analitos, por exemplo, toxinas [10, 24]. A aplicação mais conhecida é o teste de gravidez, que foi baseado na detecção de HCG na urina, e pode ser considerado um dos primeiros LFIA [20, 25]. O LFIA tem recentemente gerado interesse científico e industrial, por permitir diagnósticos *in situ*, muito rápidos e de fácil manuseio, em que a análise qualitativa pode ser obtida pela observação dos resultados a olho nu [19, 21, 23, 26]. Entretanto, o LFIA apresenta algumas limitações importantes, dentre elas, baixa sensibilidade, e apenas pequenas quantidades de amostra podem ser processadas em cada análise (tipicamente 200 µL). Assim, muitos esforços estão sendo envidados recentemente para aumentar a sensibilidade do LFIA convencional.

As nanopartículas são amplamente utilizadas como marcadores em biossensores para a detecção de proteínas, sendo as nanopartículas de ouro (AuNPs) as mais amplamente empregadas no LFIA [9, 20, 23, 26, 27]. As AuNPs apresentam algumas propriedades que as tornam excelentes marcadores, pois não são tóxicos, a cor é intensa, são de preparo relativamente fácil e barato, e mantêm suas propriedades ópticas por longos períodos [20, 28, 29]. Portanto, AuNPs são marcadores adequados para monitorar as reações anticorpo-antígeno no LFIA.

Do que foi exposto anteriormente, o desenvolvimento e utilização de sensores constituem um importante avanço em diversas áreas do conhecimento, abrindo alternativas para que novas aplicações, técnicas e materiais possam ser testados. Neste contexto, esta tese descreve duas diferentes plataformas sensoras para aplicações práticas. Uma plataforma é baseada na utilização de um eletrodo modificado com um material, conhecido por Feofitina-b (Feof-b), que exibiu como teste de aplicação, características promissoras para a detecção eletroquímica de H_2O_2 . A técnica de automontagem foi utilizada na fabricação de sistemas nanoestruturados contendo um polissacarídeo (a goma do cajueiro); um polímero, hidrócloro de polialilamina (PAH) e a Feof-b. Em alguns destes sistemas, por meio de técnicas de caracterização apropriadas (UV-Vis e AFM), verificou-se a formação de interações moleculares entre os materiais. Foram estudadas, também, as propriedades eletroquímicas através do comportamento redox da Feof-b imobilizada no filme, para os diferentes sistemas analisados. Com base nos resultados obtidos, estes sistemas foram aplicados como eletrodos modificados na detecção de H_2O_2 .

A segunda plataforma consiste de um imunoensaio de fluxo vertical (VFIA) em que as AuNPs são utilizadas como marcadores do ensaio. A abordagem para VFIA foi baseada no confinamento dos reagentes essenciais para o ensaio dentro de cartuchos de plástico conectados em série com uma seringa. O princípio de funcionamento do VFIA baseia-se no ensaio sanduíche, em que, na presença de um antígeno, o complexo é formado entre o anticorpo de detecção conjugado com as AuNPs e o anticorpo de captura imobilizado na zona de teste sobre a membrana de nitrocelulose. Após a reação antígeno-anticorpo, a cor aparece na membrana de detecção. O VFIA foi testado, utilizando como proteínas modelos: HIgG e PSA humano. Esta última é uma proteína importantíssima, cuja detecção é muito relevante para um diagnóstico precoce do câncer de próstata. Os resultados obtidos foram avaliados de forma qualitativa (a olho nu, pela presença ou ausência de analito na amostra) e quantitativa (utilizando o *software* ImageJ).

Nesta tese, os assuntos abordados estão dispostos da seguinte forma:

Capítulo 1: Introdução geral e objetivos.

Capítulo 2: São apresentados detalhadamente o estudo e a caracterização do material biológico conhecido por Feof-b, que exibiu características eletroativas que permitiram a sua utilização na detecção de H_2O_2 , proporcionando a elaboração de um sensor eletroquímico não enzimático, simples e de baixo custo.

Capítulo 3: Está focado na utilização de AuNPs como marcadores de sinais em dispositivos de fluxo lateral; e principalmente, em uma nova abordagem por nós proposta de um novo dispositivo, o LIS, com base em um simples imunoenensaio de fluxo de vertical (VFIA). Vale salientar, as enormes possibilidades no desenvolvimento de novos biossensores, através da combinação de materiais descartáveis de baixo custo, tais como papéis, cartuchos e seringas, com as propriedades exclusivas das AuNPs.

Capítulo 4: são apresentadas as conclusões e perspectivas futuras;

1.2 Objetivos

Um dos principais objetivos deste trabalho foi preparar, caracterizar e utilizar eletrodos modificados com filmes automontados contendo Feof-b, polímero PAH, e goma natural. O estudo foi conduzido com diferentes técnicas experimentais, como espectroscopia UV-Vis, medidas AFM e voltametria cíclica. Além disso, a realização de um estudo utilizando a Feof-b como camada ativa na catálise de H_2O_2 , permitiu investigar a sua aplicação em dispositivos sensores.

Outro objetivo geral desta tese de doutorado é o desenvolvimento de um dispositivo VFIA, de baixo custo e de fácil manuseio, com base na utilização de AuNPs como marcadores para aplicação em diagnósticos. O desenvolvimento de tal imunossensor é de grande interesse, especialmente para países onde a falta de recursos faz com que o diagnóstico não esteja disponível para toda a população. Por outro lado, esse dispositivo também poderia ser utilizado para diagnóstico em laboratórios de pesquisa ou até mesmo *in situ*.

Os objetivos específicos desta tese podem ser resumidos da seguinte forma:

- Estudar as diferentes arquiteturas dos filmes automontados com a utilização da Feof-b;
- Estudar as características morfológicas, como espessura e rugosidade das diferentes arquiteturas investigadas;

- Investigar e caracterizar as propriedades eletroquímicas da Feof-b;
- Investigar a sensibilidade da Feof-b para detecção de H_2O_2 .
- Otimizar o uso de AuNPs como marcadores em biossensores ópticos;
- Desenvolver uma nova técnica de detecção de proteínas, que possa ser aplicada na detecção de analitos importantes, como o PSA;
- Melhorar a sensibilidade de imunoenaios de fluxo lateral (LFIA), possibilitando o uso de um volume maior de amostra;
- Utilizar materiais de baixo custo e técnicas experimentais simples, mas com resultados extremamente importantes e inovadores.

**CAPÍTULO 2: FILMES AUTOMONTADOS CONTENDO FEOF-
B: ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO**

Na busca por novos materiais que possam ser modificados ao nível molecular, a técnica de automontagem ou LbL, proposta por Decher nos anos 90 [16, 30-32], tornou-se uma escolha interessante [33]. A abordagem de Decher faz uso de interação eletrostática, por adsorção alternada de polieletrólitos aniônicos e catiônicos em suportes sólidos. Esta técnica é interessante por apresentar características, como: baixo custo; simplicidade do aparato experimental utilizado para fabricação dos filmes; e os processos de adsorção são independentes do tamanho e da topologia do substrato, permitindo que a técnica seja utilizada para o recobrimento de uma variedade de superfícies [33, 34].

Os mecanismos fundamentais envolvidos na técnica de automontagem, na maioria dos casos, são governados por interações eletrostáticas entre espécies com cargas opostas, mas interações específicas e secundárias, designadas ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals também demonstraram ser importantes, surgindo assim novas alternativas de arquiteturas moleculares [16, 17, 34-39].

Uma possibilidade para a fabricação de filmes envolve a utilização de gomas [40]. A goma do cajueiro é um exsudado obtido do tronco do cajueiro (*Anacardium occidentale L.*), muito abundante na região nordeste do Brasil [40, 41] e tem mostrado ação terapêutica, enfatizada por suas atividades antimicrobiana [42], anti-tumoral [43], atuação no processo de cicatrização, ademais vem sendo usada no desenvolvimento de filmes aplicados em plataformas sensoras [40, 41].

Outro material empregado na formação dos filmes automontados neste estudo é a Feof-b, que consiste de um composto biológico derivado da clorofila, com propriedades biomédicas que têm sido investigadas para a utilização em terapia fotodinâmica (TFD) [44-46]. A Feof-b utilizada neste trabalho foi isolada e purificada pelo grupo de pesquisa da professora Maria de Fátima V. Sousa, na Universidade Federal da Paraíba, a partir da espécie *Turnera subulata* pertencente à família *Turneraceae* (amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais do mundo) [47].

Neste capítulo, é apresentado detalhadamente o estudo realizado com a Feof-b. Os eletrodos modificados com Feof-b foram fabricados através da técnica de automontagem, em que a Feof-b foi imobilizada com sucesso em conjunto com a goma do cajueiro ou com PAH. O crescimento das multicamadas foi monitorado por espectroscopia UV-Vis, durante cada etapa de deposição. Os espectros para as soluções também foram avaliados, com o objetivo de comparar o comportamento do material em solução e imobilizado como filme sobre o substrato

sólido. A morfologia dos filmes automontados foi analisada com medidas AFM. Os filmes foram estudados ainda por voltametria cíclica e cronoamperometria, onde as propriedades eletroquímicas e o comportamento eletroativo da Feof-b imobilizada na forma de filme foram avaliadas. Este sistema foi testado para o desenvolvimento de um sensor eletroquímico não enzimático para detecção de H_2O_2 .

O capítulo está dividido, basicamente, em quatro partes distintas. A primeira aborda um estudo, a respeito dos fundamentos teóricos, os quais servirão como auxílio, para a obtenção de um melhor entendimento dos processos observados no material que está sendo investigado. Em seguida são apresentadas as principais características dos materiais em pauta (Feof-b, goma do cajueiro e H_2O_2). Na sequência é descrita a parte experimental, onde as condições em que as medidas foram realizadas e caracterizadas são mencionadas. Na última seção deste capítulo são apresentados os resultados com as respectivas discussões para cada caracterização, estudo e aplicação, desenvolvidos com a Feof-b.

2.1 Fundamentos Teóricos

2.1.1 Imobilização de moléculas em sensores

Nos últimos anos, os sensores e biossensores vêm sendo considerados como uma ferramenta de fundamental importância, devido à crescente necessidade de testes analíticos rápidos, simples, de fácil manipulação e de baixo custo para a determinação de diversos componentes químicos e biológicos [7, 12].

Lvov e colaboradores [48] demonstraram que é possível obter filmes a partir da técnica de automontagem com multicamadas de proteínas adsorvidas, mantendo os seus sítios biologicamente ativos. Nos últimos anos, uma ampla variedade de materiais biológicos e sintéticos vem sendo imobilizados em forma de filmes finos e aplicados como sensores para a detecção dos mais diversos analitos, por exemplo, glicose [49, 50], dopamina e ácido ascórbico [51-53].

Neste âmbito de aplicações, as técnicas de fabricação de filmes vêm sendo utilizadas para o desenvolvimento destes dispositivos, dentre elas, a técnica de automontagem desponta como uma alternativa promissora neste aspecto.

2.1.1.1 Filmes Automontados (SA) ou camada a camada (LbL)

Os conceitos envolvidos a seguir foram baseados nas referências [33, 34, 54].

A necessidade de obter estruturas organizadas com elevado controle de parâmetros, como arquitetura molecular e espessura, impulsionou o desenvolvimento de técnicas de fabricação de filmes finos [33, 34, 54]. Dentre as técnicas empregadas, os métodos de Langmuir-Blodgett (LB) [55, 56] e de automontagem [16], destacam-se como os mais promissores [33]. A técnica LB requer equipamento especial e sofisticado, além da exigência de ambiente de trabalho extremamente limpo e isolado, ademais essa técnica tem sérias limitações em relação à topologia e ao tamanho do substrato [16, 33].

Durante muito tempo, a técnica de LB foi a única a proporcionar estruturas multicamadas com controle de propriedades em escala molecular. O método de automontagem, baseado na adsorção espontânea dos materiais de interesse sobre a superfície de um substrato, apareceu como uma alternativa à técnica de LB, oferecendo

procedimentos experimentais menos sofisticados para a construção de filmes compostos por multicamadas organizadas [34].

Neste contexto, na década de 80, Sagiv e colaboradores [57] desenvolveram filmes multicamadas baseados em interações químicas a partir da imersão de um substrato sólido quimicamente modificado em uma solução contendo moléculas bifuncionais, por exemplo, organossilanos. O filme formava-se através de ligações covalentes entre o substrato e uma das extremidades da molécula. A outra extremidade que não era ligada comportava-se como sítio de ancoragem para a camada seguinte. A esta nova metodologia o termo automontagem ou *self-assembly* (SA) foi empregado, pois o método tinha como princípio a ausência de influência externa ou humana, já que os fatores termodinâmicos conduziam o sistema para a configuração mais adequada [33].

Na década de 90, Decher e colaboradores [16, 32] propuseram um novo método para obtenção de filmes por automontagem. A abordagem de Decher baseia-se na atração eletrostática (interações físicas) entre espécies com cargas de sinais opostos, ao invés de adsorção química. Assim, foi possível adsorver alternadamente num substrato sólido camadas compostas por polietrólitos catiônicos e aniônicos [33, 34, 54].

Nesta técnica descrita por Decher [16], um substrato sólido previamente limpo, carregado negativamente, por exemplo, é imerso numa solução catiônica durante um determinado período de tempo (geralmente de alguns minutos), de modo que uma camada do polycation adsorva na superfície do substrato. O substrato é então lavado com uma solução que apresente, aproximadamente, o mesmo pH das soluções poliméricas, a fim de remover as moléculas não adsorvidas ou fracamente ligadas, e, normalmente, seca-se com fluxo de N₂. Em seguida, o substrato é imerso na solução aniônica de maneira que o poliânion seja adsorvido ao conjunto substrato/polycation, obtendo-se assim uma bicamada. Após a adsorção da segunda camada o substrato é novamente lavado e seco. Estruturas multicamadas podem ser construídas através da repetição das etapas anteriormente descritas. Filmes com centenas de camadas depositadas já foram relatados [34]. A Figura 2 ilustra o processo de construção do filme.

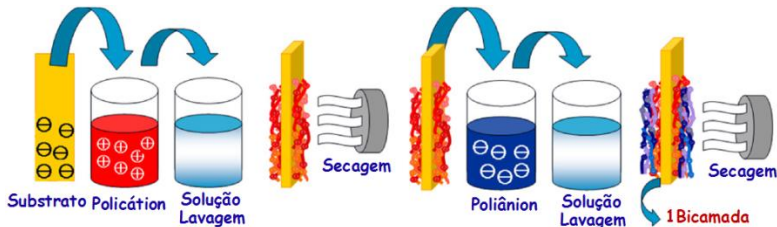


Figura 2: Processo de automontagem ou LbL: Inicialmente o substrato carregado negativamente é mergulhado num béquer contendo a solução policatônica por um determinado período de tempo. Em seguida, o sistema passa por um processo de lavagem para a remoção das moléculas depositadas em excesso e/ou ligadas fracamente ao substrato. Posteriormente o sistema é submetido a um fluxo de nitrogênio (N_2) para secagem desta monocamada positiva. O sistema substrato/policatión é mergulhado na solução poliânionica, e após a repetição das etapas de lavagem e secagem em N_2 , tem-se uma bicamada finalizada [58].

A versatilidade da técnica permite que os filmes automontados sejam formados a partir de uma vasta gama de materiais, dentre eles, materiais biológicos [48], corantes [54, 59, 60] e materiais cerâmicos [61].

Os conceitos envolvidos na técnica de automontagem apontaram que outros tipos de interações, além da atração eletrostática entre cargas de sinais opostos, podem governar a construção dos filmes [16, 35-39, 59, 62]. Existem ainda relatos na literatura de filmes produzidos pela técnica de automontagem em que ambas as soluções possuem a mesma carga, neste caso, a adsorção das moléculas pode ocorrer por interações secundárias do tipo estéricas, ligações de hidrogênio, entre outras [63].

Dependendo do mecanismo de adsorção entre as camadas nos filmes automontados, podemos classificá-los em quatro tipos: filmes automontados produzidos a partir de polieletrólitos altamente carregados; empregando-se polieletrólitos parcialmente carregados; adsorvidos via interações secundárias; e adsorvidos através de interações específicas. Na sequência iremos discuti-los com mais detalhes [62].

- Filmes automontados produzidos a partir de polieletrólitos altamente carregados: O mecanismo de adsorção neste tipo de filme ocorre através de interações iônicas (eletrostáticas) e pode ser considerado autoregulado [33, 64]. O mecanismo é autolimitado, pois a

adsorção termina quando ocorre o equilíbrio entre as cargas, causado pelas interações eletrostáticas entre as cargas da camada previamente depositada e das cargas presentes na solução da camada a ser depositada [54].

Os filmes formados a partir de polieletrólitos altamente carregados conduzem a formação de multicamadas finas (~ 1 nm) e altamente estáveis. A construção das multicamadas é possível devido a forte compensação de cargas, caracterizada pela inversão do sinal da carga líquida inicial, em que uma camada de polieletrólito é depositada sobre a outra de sinal contrário. Outra característica sobre o processo de formação dos filmes automontados é a possibilidade de ocorrer interpenetração das camadas adjacentes adsorvidas [33, 54].

- Filmes automontados produzidos empregando-se polieletrólitos parcialmente carregados: O mecanismo de adsorção neste tipo de filme também são governados por interações iônicas (eletrostáticas), assim como nos filmes produzidos empregando-se polieletrólitos altamente carregados. A diferença está na quantidade de cargas presente nos polieletrólitos, que pode ser alterada quando ajusta-se o pH da soluções. Por exemplo, Zucolotto e colaboradores [59] demonstraram que a espessura média de cada bicamada para um filme, a base de PAH variou de 1 a 24 nm ao alterar o pH das soluções numa faixa de 4 a 10 [54].

- Filmes automontados adsorvidos via interações secundárias: De forma diferente dos dois mecanismos citados anteriormente, no processo de adsorção via interações secundárias, os filmes podem ser formados por ligações de hidrogênio ou forças de Van der Waals, que podem atuar de forma isolada ou ainda em conjunto com as interações eletrostáticas [54]. Estes filmes caracterizam-se pelo processo de adsorção não autoregulado ou não autolimitado, em que as camadas do filme crescem indefinidamente conforme a concentração do polímero [33]. Estudos de filmes automontados à base de polianilina foram importantes para a investigação deste tipo de sistema [33, 54].

- Filmes automontados adsorvidos através de interações específicas: O mecanismo de adsorção das camadas é completamente diferente daqueles apresentados anteriormente. Um exemplo deste tipo de sistema

foi publicado por Anzai e colaboradores [36], a partir da adsorção de multicamadas alternadas de avidina e poliamina funcionalizada com biotina. Eles relataram que interações fortes e específicas entre a biotina e a avidina possibilitam a adsorção alternada e o crescimento das multicamadas, mesmo quando ambos os materiais estiverem positivamente carregados, pois as interações específicas entre a avidina e a poliamina contendo biotina superam as repulsões eletrostáticas [54].

Estudos como estes evidenciam a enorme versatilidade da técnica de automontagem, uma vez que outras interações, além das eletrostáticas, podem contribuir para a formação das camadas dos filmes ultrafinos, possibilitando desta forma, a obtenção de novas arquiteturas moleculares, o que permite que uma grande variedade de materiais possa ser depositada por automontagem.

2.1.2 Técnicas de Caracterização de Filmes finos para Sensores

Nesta seção vamos apresentar os princípios básicos e as informações mais relevantes para as técnicas de voltametria cíclica e cronoamperometria, que constituem as técnicas eletroquímicas utilizadas neste trabalho.

2.1.2.1 Voltametria Cíclica (VC)

A voltametria cíclica (VC) é uma das técnicas mais comumente utilizada para obter informações qualitativas e quantitativas sobre os processos eletroquímicos. É frequentemente a primeira experiência realizada em estudos eletroanalíticos, por ser caracterizada como uma excelente técnica exploratória. A eficiência desta técnica resulta de sua capacidade de rapidamente fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações de transferência de elétrons e processos adsorptivos. Além disso, a VC oferece uma rápida localização dos potenciais redox de espécies eletroativas e uma avaliação do processo redox [1].

A técnica de VC consiste basicamente na aplicação de um potencial, que varia linearmente com o tempo, a um eletrodo de trabalho, promovendo reações de oxidação e redução das espécies eletroativas [1]. Para as medidas voltamétricas, normalmente, utiliza-se uma cela eletroquímica composta por um sistema de três eletrodos: um eletrodo de trabalho, um de referência e um contra-eletrodo. A reação de

interesse ocorre no eletrodo de trabalho, que pode ser composto de diferentes materiais condutores, como ouro, prata, carbono, platina, cobre, etc. O eletrodo de referência caracteriza-se por ser um eletrodo de potencial fixo, mantido constante durante as medidas. Ele é empregado no monitoramento do potencial de interface do eletrodo de trabalho/eletrólito. Em geral os eletrodos de referências mais utilizados são o eletrodo saturado de calomelano (SCE) ou o Ag/AgCl. O eletrodo de referência possui alta impedância, de forma que a corrente passa entre o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo, evitando que ocorram distúrbios no eletrodo de referência [65]. A Figura 3 mostra uma representação esquemática de uma célula eletroquímica utilizada em medidas eletroquímicas como VC.

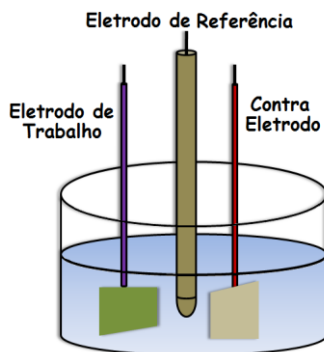


Figura 3: Célula eletroquímica com três eletrodos.

Na prática, a VC consiste na varredura do potencial a velocidade constante partindo de um potencial inicial E_{inicial} (varredura direta) até atingir um potencial E_{final} desejado, quando então, o sentido de varredura é invertido, retornando ao potencial E_{inicial} . Inicia-se o processo aplicando-se um potencial que seja incapaz de promover a reação de oxidação no eletrodo. No entanto, à medida que sistema é varrido em potenciais mais positivos, a oxidação pode ocorrer gerando um pico de corrente proporcional à concentração do analito. Inicia-se a varredura em sentido contrário quando o potencial atingir valores em que não ocorre mais reação de oxidação [64].

A VC corresponde a uma das técnicas eletroquímicas mais utilizadas no estudo de processos de transferência de carga que ocorrem através de uma interface eletrodo-solução. Durante a varredura do

potencial o potenciostato mede a corrente resultante fornecendo um gráfico da corrente x potencial ($I \times V$). Este gráfico é o voltamograma cíclico. Dependendo da informação procurada simples ou múltiplos ciclos podem ser utilizados [1, 65].

A forma como os eixos são apresentados deve ser compreendida para evitar equívocos na sua interpretação. Nesta tese utilizaremos os eixos orientados com seus valores crescentes para a direita e para cima, e adotaremos a convenção de sinal positivo para corrente anódica (oxidação) e sinal negativo para a corrente catódica (redução).

Na Figura 4 (a) temos uma representação da variação do potencial com o tempo para uma medida de VC e na Figura 4 (b) um gráfico da resposta da corrente em função do potencial aplicado, podendo-se observar a oxidação e redução das espécies eletroativas. Os principais parâmetros que podem ser obtidos a partir de um voltamograma cíclico são: potencial de pico anódico (E_{pa}), potencial de pico catódico (E_{pc}), corrente de pico anódico (I_{pa}) e a corrente de pico catódico (I_{pc}). Para sistemas reversíveis a razão $|I_{pa}|/|I_{pc}|$ é aproximadamente 1 (1 no caso ideal) [1].

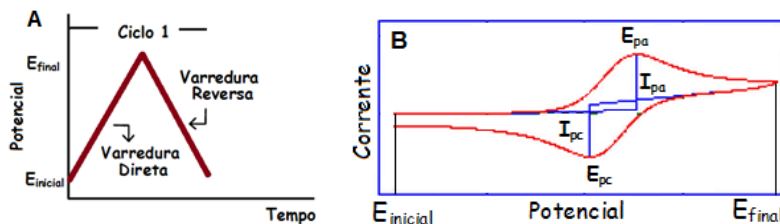


Figura 4: Voltametria cíclica (a) variação do potencial com o tempo. (b) resposta da corrente em função do potencial aplicado para um sistema redox reversível [1].

2.1.2.2 Cronoamperometria

A cronoamperometria é uma técnica muito utilizada em aplicações envolvendo sensores eletroquímicos, por exemplo, é uma das técnicas mais amplamente empregada para quantificação de H_2O_2 . A técnica é geralmente empregada para complementar a voltametria cíclica no estudo e caracterização dos sistemas eletroquímicos.

A cronoamperometria é uma técnica eletroquímica que consiste no monitoramento da corrente que flui através do eletrodo de trabalho, como função do tempo, em um potencial constante. Este fluxo de

corrente esta relacionado com o comportamento redox das espécies presentes no eletrólito por meio da equação de Cottrel (Equação 1) [1].

$$I(t) = \frac{n F A C D^{1/2}}{\pi^{1/2} t^{1/2}} = K t^{-1/2} \quad \text{Equação 1}$$

$I(t)$ é a corrente monitorada em um tempo t (em s), n é o número de elétrons para oxidar ou reduzir uma molécula de analito, F é a constante de Faraday (96485 C/mol), A é a área do eletrodo em cm^2 , C é a concentração das espécies oxidadas em mol/cm^3 e D é o coeficiente de difusão das espécies oxidadas em cm^2/s .

2.2. Materiais

2.2.1 Feofitinas

A revisão e os conceitos envolvidos a seguir foram baseados nas referências [66-75].

As porfirinas representam uma classe de moléculas que estão presentes em alguns sistemas biológicos, dentre eles, nas hemoglobinas, sendo responsáveis pelo transporte de oxigênio na corrente sanguínea e nos citocromos, pela transferência de elétrons na cadeia respiratória. As porfirinas e seus derivados são formados por quatro anéis pirrólicos conectados entre si por pontes metínicas, formando um grande macrociclo (Figura 5) [66].

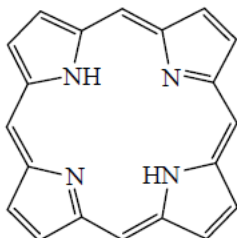


Figura 5: Estruturas do macrociclo da porfirina [68].

As porfirinas são compostos corados, que apresentam um sistema eletrônico altamente conjugado com 22 elétrons π . Possuem um espectro de absorção constituído por uma intensa banda localizada em aproximadamente 400 nm, designada banda de Soret, e também por um conjunto de quatro bandas de menor intensidade na região de 500 a 650 nm, denominadas bandas Q [67, 68]. As cinco bandas têm origem na transição $\pi - \pi^*$ [67].

A banda de Soret foi descoberta por Soret, para a hemoglobina, e alguns anos depois, Gamgee observou esta banda em porfirinas. Ela está presente nos tetrapirróis, incluindo as porfirinas, metaloporfirinas e hemoproteínas, clorinas e metaloclorinas [69].

A clorofila é um derivado da porfirina, que pertence à classe das clorinas. Do ponto de vista estrutural, as clorofilas, apresentam ciclos tetrapirrólicos contendo como átomo central o íon magnésio (Mg^{2+}) [66, 70]. Outra característica estrutural é a presença de um quinto anel, que contém um grupo carbonílico de cetona, anexo ao macrociclo porfirínico. A presença deste grupo é suficiente para caracterizar o composto como sendo uma clorofila [66].

As clorofilas são os pigmentos verdes (naturais) mais abundantes e amplamente distribuídos nas plantas e que desempenham um papel crucial no processo de fotossíntese em todos os vegetais autotróficos, isto é, aqueles capazes de sintetizar o próprio alimento [45, 70, 71]. Presentes em muitos tipos plantas, algas e algumas bactérias, as clorofilas são consideradas excelentes fotossensibilizadores, antioxidantes e agentes terapêuticos [72].

As clorofilas encontram-se amplamente distribuídas na natureza, embora o número de clorofilas diferentes não seja muito grande, aproximadamente dez tipos têm sido isolados de partes verdes de plantas, sendo a clorofila-a o componente verde mais abundante, seguido pela clorofila-b, as clorofilas-c, e a clorofila-d [66, 73].

As clorofilas a e b (Figura 6) estão presentes na natureza numa proporção de 3:1, respectivamente, e diferem no radical ligado ao carbono C-3. A clorofila-a possui como radical um grupo metil (-CH₃) e a clorofila-b contém um grupo aldeído (-CHO) [71]. Além disso, as clorofilas a e b possuem uma cadeia fitílica anexa ao macrociclo porfirínico. A presença desta cadeia longa e apolar confere um elevado caráter hidrofóbico à molécula, bem como uma insolubilidade em meio aquoso [66, 70].

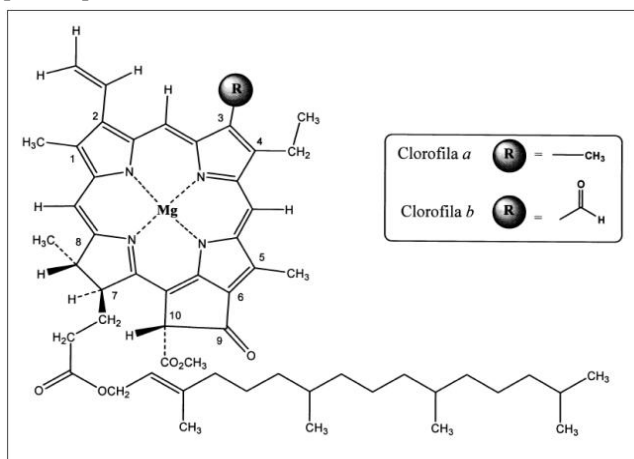


Figura 6: Estrutura química da clorofila-a e clorofila-b [71].

O íon metálico (Mg²⁺) pode ser removido da clorofila-a, em um processo conhecido como feofitinação, originando a feofitina-a. Este

derivado pode ser obtido através de uma reação de hidrólise ácida, onde o íon Mg^{2+} é substituído por dois átomos de hidrogênio [66, 70]. Da mesma forma é possível obter a Feof-b a partir da reação de feofitinação da clorofila-b [74]. A Figura 7 ilustra a reação de feofitinação.

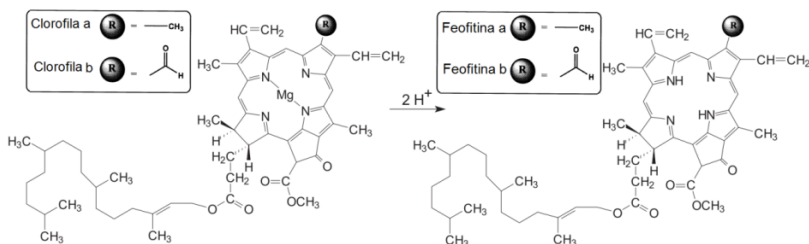


Figura 7: Esquema das reações de obtenção das feofitinas a e b a partir das clorofilas a e b (adaptado de [70, 71]).

Assim como para as clorofilas, observa-se que a Feof-b difere da feofitina-a por possuir um grupo aldeído em vez do grupo metil (Figura 7).

As bandas relativamente pronunciadas na região amarela e vermelha, assim como a banda intensa na região azul-violeta, são originadas nas clorofilas e nas feofitinas, a partir da estrutura básica e do sistema de ligações duplas conjugadas da porfirina [74].

Os dois trabalhos abaixo, citados na literatura, apresentam características ópticas referentes a Feof-b e foram utilizados como modelo de comparação para os resultados encontrados neste trabalho de doutorado.

Kobayashi e colaboradores [73] demonstraram os espectros de absorção de Feof-b em quatro tipos de solventes, medidos à temperatura ambiente, os quais estão apresentados na Figura 8. Para cada solvente estão especificados os respectivos valores por eles encontrados para os máximos de absorção das bandas de Soret (entre 430 e 440 nm) e banda Q (entre 650 e 660 nm).

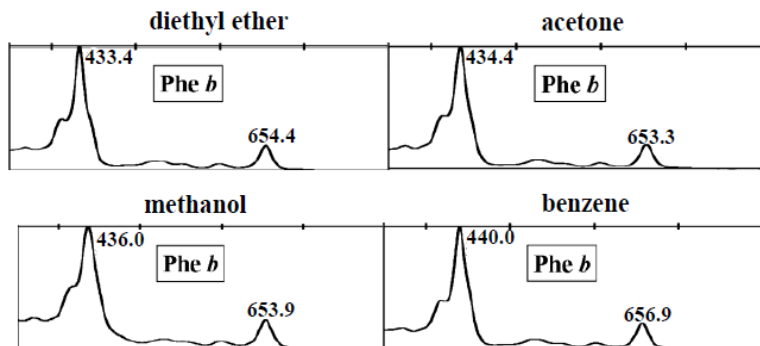


Figura 8: Comparação do espectro de absorção da Feof-b em éter dietílico, acetona, metanol e benzeno, à temperatura ambiente. Os espectros foram dimensionados aos máximos de absorção da banda de Soret (entre 430 e 440 nm) e banda Q (entre 650 e 660 nm) [73].

O trabalho de Maia e colaboradores [74] consistiu no desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica que permitisse determinar os carotenóides do azeite. Mas, sendo a Feof-b um dos pigmentos responsáveis pela cor do azeite, a determinação de alguns parâmetros como a espectroscopia UV-Vis da Feof-b tornou-se importante em seu trabalho, uma vez que, a cor é o principal fator que contribui para aceitação de um produto por parte do consumidor. Os espectros de absorção por eles obtidos conduziram a duas bandas principais: a primeira correspondente a banda de Soret, em 435 nm; e a outra, apesar de não ter sido obtida em seu trabalho devido ao fato do detector por eles utilizado não detectar comprimentos de onda além de 650 nm, eles mencionaram que a mesma situar-se-ia a 654 nm.

Até onde sabemos não foram relatadas na literatura as características ópticas referentes a filmes finos com Feof-b. A Figura 9 refere-se ao trabalho de Bellamy e colaboradores [75] e mostra a absorção óptica em solução e em forma de filme monocamada para a feofitina-a. A monocamada de feofitina-a apresentada no trabalho de Bellamy e colaboradores assemelha-se ao trabalho descrito por Langmuir and Schaefer [76, apud de Bellamy e colaboradores].

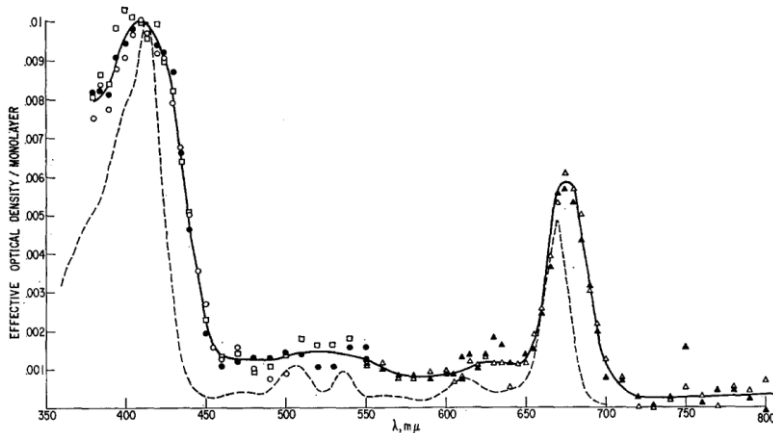


Figura 9: Absorção óptica para a monocamada de feofitina-a (linha sólida) e para feofitina-a em solução de benzeno (linha tracejada). Figura extraída da Referência [75].

A análise da Figura 9 mostra que a monocamada de feofitina-a apresenta uma absorção similar a solução, mas com um leve alargamento das bandas Q e Soret. E ainda observa-se um ombro em aproximadamente 400 nm para o caso da feofitina-a em solução, que não é observado na monocamada, podendo o mesmo estar sendo mascarado pelo alargamento do pico na monocamada [75].

2.2.2 Gomas Naturais

A flora brasileira é a fonte de diversos produtos utilizados pela sociedade, dentre eles, medicamentos, óleos naturais e essenciais, alimentos, fibras, cosméticos, biocombustíveis, produtos químicos, entre outros. Os polissacarídeos representam uma das inúmeras classes de compostos químicos que podem ser extraídos das nossas espécies vegetais [77].

Polissacarídeos são polímeros naturais que possuem um único ou mais tipos de monossacarídeos. Eles podem ser provenientes de exsudados de plantas (por exemplo, goma arábica e goma do cajueiro), algas (como, agar), sementes (como, goma de guar), de animais (como, quitosana), e outros [77]. Biodegradabilidade, geralmente atóxicos e abundância na natureza são algumas de suas características [78]. Polissacarídeos possuem aplicações em diversas áreas, por exemplo, médicas, biotecnológicas, cosméticos, farmacêuticas e na indústria

alimentícia, sendo a grande maioria utilizada como estabilizante [77, 78]. A formação de filmes finos que emprega polissacarídeos está sendo utilizada para aplicações em sensores e biossensores [41, 79, 80].

Gomas naturais consistem de polissacarídeos de elevado peso molecular e com cadeias longas, formados a partir de unidades de açúcares, monossacarídeos, unidos por ligações glicosídicas [41, 81]. As gomas a partir de exsudados, liberados de forma espontânea ou induzida, são obtidas a partir do tronco de árvores, como um mecanismo de defesa da planta [41, 78]. Em alguns casos a formação de goma pode ocorrer devido a certas condições climáticas desfavoráveis, ou ainda estimulada por solos pobres [78].

A planta *Anacardium occidentale* L., conhecida popularmente como cajueiro, pertence à família *Anacardiaceae*. Ela pertence à mesma família da goma arábica e apresenta semelhanças na sua composição e nas suas propriedades físico-químicas, podendo substituí-la na indústria farmacêutica, em cosméticos, como cola líquida para papel e na indústria de alimentos, como estabilizante de sucos, cervejas e sorvetes [41, 82, 83]. A goma do cajueiro é um polissacarídeo complexo, que é encontrada em muitos países tropicais e subtropicais, como o Brasil, Índia, Tanzânia, Moçambique e Quênia [41, 43, 83-85]. A goma do cajueiro após hidrólise resulta em vários constituintes, tais como: galactose (como maior componente), arabinose, glicose, ramnose, manose e ácido glucurônico, sendo que a porcentagem dos monossacarídeos varia de acordo com a região geográfica [41, 43, 82, 84, 85]. Além disso, quando em solução aquosa, os ácidos glucurônicos terminais na estrutura da goma são responsáveis pela natureza aniônica do polissacarídeo [41].

2.2.3 Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

O H_2O_2 é um líquido incolor e com odor característico. A sua utilização decorre de ser um líquido totalmente miscível com água, permitindo facilidade de dosagem e controle. Se devidamente armazenado, se mantém estável em temperatura ambiente. Em muitos organismos é um metabólito que quando decomposto resulta em oxigênio molecular e água [86].

O H_2O_2 é empregado em processos de branqueamento nas indústrias de papel, têxteis e de celulose. Além disso, industrialmente ele também é utilizado em purificação de água, e em particular na

Europa, para a produção de perborato e percarbonato empregados em detergentes [86, 87]. Faz parte de muitas reações biológicas atuando como produto de várias oxidases, podendo ser utilizado como parâmetro para quantificação destes bio-processos [86]. A determinação rápida e confiável de H_2O_2 é de grande interesse e importância em análises químicas, biológicas, médicas, industriais, ambientais e muitos outros campos [88-90]. Muitas técnicas têm sido desenvolvidas para detectar o H_2O_2 , dentre elas, a fluorimetria [88] e a quimiluminescência [91], mas essas técnicas têm inconvenientes, porque os processos são demorados e caros. Devido à sua simplicidade, métodos eletroquímicos [92] têm sido empregados com muita frequência na determinação de H_2O_2 nos últimos anos, exibindo uma rápida detecção e uma ampla faixa linear entre a corrente e a concentração de H_2O_2 , além de ser considerada uma técnica de baixo custo [92-94].

2.2.3.1 H_2O_2 e aplicação em sensores e biossensores

Muitos processos para a detecção de H_2O_2 vêm sendo publicados na literatura e utilizados com sucesso para aplicações específicas, pois é bem conhecido que sua determinação rigorosa e rápida é de importância prática, principalmente no monitoramento ambiental e ensaios bioanalíticos [95].

Um grande número de biossensores baseados em enzimas foi desenvolvido para detecção de H_2O_2 [92, 94]. Li Wang e colaboradores [94] apresentaram um novo método para desenvolver um biossensor enzimático para H_2O_2 . Eles conseguiram imobilizar com sucesso Au coloidal e peroxidase (horseradish peroxidase - HRP) sobre o eletrodo de ITO, e atribuíram a redução de H_2O_2 , principalmente, à transferência eletrônica das moléculas do HRP para o eletrodo (Figura 10). A resposta cronoamperométrica da corrente em função do tempo após sucessivos acréscimos de H_2O_2 , bem como, a curva de calibração da corrente em função da concentração de H_2O_2 para o biossensor enzimático por eles desenvolvido é mostrada na Figura 10 (B). O biossensor enzimático exibiu uma rápida resposta amperométrica de 5 segundos, um limite de detecção estimado em 8 $\mu\text{mol/L}$ e uma ampla faixa linear para H_2O_2 de 20,0 $\mu\text{mol/L}$ a 8,0 mmol/L . Além disso, o biossensor exibiu elevada sensibilidade e reprodutibilidade.

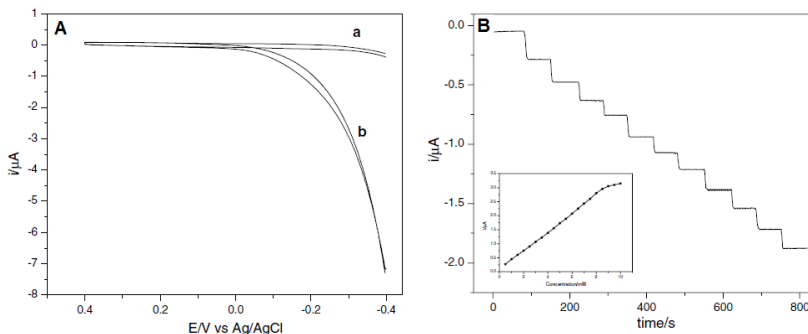


Figura 10: (A) Voltamogramas cíclicos para o biossensor enzimático ITO/APTMS/Au coloidal/HRP: (a) na ausência e (b) na presença de H_2O_2 . (B) Resposta do biossensor enzimático para as injeções sucessivas de H_2O_2 e a respectiva curva de calibração do biossensor [94].

Jia e colaboradores [92] apresentaram um método para a fabricação de um biossensor enzimático baseado na combinação de tecnologias de sol-gel e automontagem. As nanopartículas de ouro e HRP foram imobilizadas com sucesso sobre o eletrodo e como resultado observou-se que a HRP imobilizada exibiu comportamento eletroquímico para a redução do H_2O_2 . O biossensor amperométrico resultante exibiu rápida resposta, 2,5 segundo, na presença de H_2O_2 . O limite de detecção do biossensor foi estimado em $2,0 \mu\text{mol/L}$ e o intervalo linear de $5,0 \mu\text{mol/L}$ a $10,0 \text{ mmol/L}$. Além disso, o biossensor enzimático por eles utilizado exibiu elevada sensibilidade e uma boa reprodutibilidade.

A utilização de enzimas no desenvolvimento de sensores para detecção de H_2O_2 pode trazer várias desvantagens devido ao seu custo elevado e a necessidade de requisitos especiais em condições ambientes. Neste contexto alguns autores desenvolveram sensores não enzimáticos para determinação de H_2O_2 [96]. Lihua Zhang e colaboradores [96] fabricaram um novo dispositivo sensor baseado em nanopartículas de Fe_3O_4 (NPs Fe_3O_4) para detectar H_2O_2 . Os autores verificaram que as NPs Fe_3O_4 apresentaram atividade enzimática intrínseca similar à encontrada na peroxidase natural, podendo ser um excelente substituto para essa enzima na elaboração de um sensor não enzimático para H_2O_2 . O sensor por eles fabricado foi baseado na técnica de automontagem, onde NPs de Fe_3O_4 foram depositadas em conjunto com poli(cloreto de

dialildimetilamonio) (PDDA) através da interação eletrostática entre os materiais. O filme multicamada foi caracterizado por VC e exibiu atividade eletrocatalítica eficiente na detecção de H_2O_2 . O desempenho do sensor amperométrico exibiu um rápido tempo de resposta de 3,5 segundos e um intervalo de linearidade de 4,18 $\mu\text{mol/L}$ a 80,0 mmol/L .

2.3 Parte Experimental

2.3.1 Materiais

Os filmes automontados foram produzidos sobre três diferentes substratos: vidro, quartzo e vidro recoberto com uma fina camada de óxido de estanho dopado com índio (ITO), de acordo com a necessidade de cada técnica de caracterização a ser utilizada.

Antes da deposição dos filmes, as lâminas foram lavadas uma a uma com detergente e água, e levadas ao ultrassom durante 30 minutos em uma solução de acetona. Posteriormente, estas lâminas foram lavadas por mais 30 minutos em álcool e finalmente mais 30 minutos em água destilada. Em uma próxima etapa, uma solução contendo 2,0 g de hidróxido de potássio (KOH) diluído em 100 mL de uma mistura de solventes, constituída por 95% álcool de pureza analítica (PA) e 5% água (ultrapura) foi preparada, adicionando-se a esta solução as lâminas, que foram mantidas em ultrassom por um período de 10 minutos, para os casos do vidro e quartzo e 5 minutos para o caso do ITO. Na sequência as lâminas foram lavadas e deixadas em água (ultrapura) até o momento da deposição dos filmes.

As soluções dos materiais e as condições de fabricação utilizadas para a preparação dos filmes estão descritas na Tabela 1:

Tabela 1: Descrição das soluções utilizadas na preparação dos filmes LbL.

Solução	Concentração	pH	Tempo de deposição	Procedência
Feof-b	0,7 mg/mL		5 minutos	Isolada e purificada na UFPB
(PAH)	1,0 mg/mL	7,5 - 8	5 minutos	Aldrich Co
goma do cajueiro	1,0 mg/mL	7,3	5 minutos	Coletada, isolada e purificada no Biotec/UFPI

Tanto a PAH quanto a goma do cajueiro são compostos solúveis em água, desta forma foram preparadas soluções aquosas dos mesmos. Já a Feof-b foi solubilizada em clorofórmio na concentração de 2 mg/mL de solução estoque. A solução final utilizada na formação dos filmes automontados foi obtida pela diluição da solução estoque em 90% álcool e 10% água resultando em uma concentração final de Feof-b de 0,7 mg/mL.

A goma do cajueiro consiste de uma resina inodora e de coloração amarelo-âmbar, que após passar por um processo de purificação dá origem a um pó branco rico em polissacarídeos [97, 98] (Figura 11). Dessa forma, o isolamento da goma é definido como a separação do polissacarídeo das impurezas presentes no material bruto.

As amostras de goma do cajueiro foram coletadas no mês de janeiro de 2011 na floresta nativa de caju situada no município de Ilha Grande, Piauí, e purificada na forma de sal de sódio, utilizando o método descrito por Costa e colaboradores [99]. Nódulos da casca foram selecionados, triturados e dissolvidos em água ultrapura, obtendo uma solução de 5% (peso/volume), que foi sucessivamente filtrada. A partir da adição de NaOH aquoso (0,05 mol/L), o pH da solução foi ajustado para aproximadamente 7,0. Em seguida, a solução foi filtrada em funil de placa sinterizada e o polissacarídeo (goma do cajueiro em pó) foi precipitado com etanol (proporção 40:10 álcool:goma). Após três etapas de purificação, uma massa de 0,25 g da goma foi dissolvida em 50 mL de água e permaneceu sob agitação por 24 h, sendo a solução filtrada no final deste período. Posteriormente à solução foram adicionados 125 μ L de álcool etílico para ajudar na evaporação do solvente, neste caso, a água. Esta solução foi utilizada na deposição dos filmes automontados.

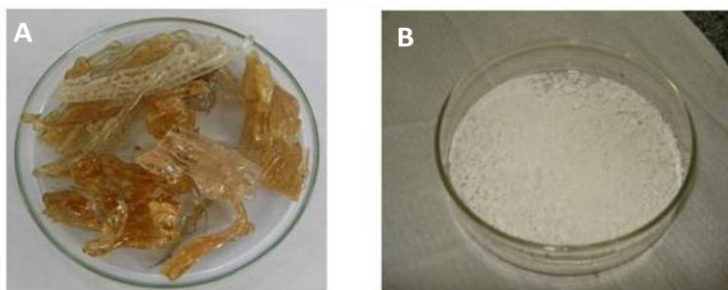


Figura 11: (A), Goma bruta coletada na cidade de Ilha Grande – PI e (B) Goma Purificada.

A PAH apresenta uma cadeia polimérica de elevado peso molecular, com ramificações laterais que exibem cargas positivas oriundas do grupamento NH_3^+ (Figura 12), sendo utilizada, portanto, como material catiônico para unir as camadas de materiais aniônicos, como as gomas naturais. Da mesma forma utilizaremos a PAH para produzir filmes automontados com a Feof-b.

Outro aspecto da PAH é que ela não absorve na região do UV-Vis estudada (entre 350 e 750 nm), onde é possível ver os picos de absorção referentes da Feof-b, além disso, não apresenta atividade eletroquímica [64, 79].

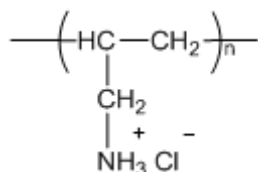


Figura 12: Estrutura química da PAH.

A Feof-b foi isolada da planta *Turnera subulata Sm*, pertencente a família *Turneraceae* pelo grupo de pesquisa da profa. Maria de Fátima V. souza. O material botânico foi coletado no Campus UFPB/João Pessoa - Paraíba, seco em estufa a 40 °C e triturado em moinho mecânico, obtendo-se o pó. A substância foi separada por cromatografia e após sucessivas etapas de extração e purificação a sua estrutura química foi definida através de espectroscopia no IV e RMN ^1H , sendo caracterizada como Feof-b [47, 100].

A Figura 13 mostra a estrutura da Feof-b utilizada neste trabalho [47, 100].

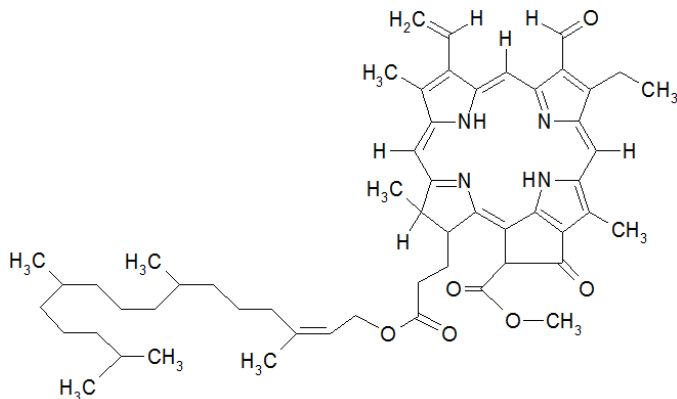


Figura 13: Fórmula estrutural da Feof-b [47, 100].

2.3.2 Fabricação dos filmes automontados

Foram preparados filmes em bicamadas contendo a Feof-b imobilizada tanto com o polímero hidrocloreto de polialilamina (PAH), quanto com a goma do cajueiro. Para efeito de comparação, também foram estudados filmes de monocamada apenas com a Feof-b.

Os filmes em bicamadas foram depositados manualmente através da técnica de automontagem descrita anteriormente (Seção 2.1.1.1) e as soluções utilizadas em sua preparação foram acomodadas em *ependorfs*. Inicialmente o substrato (vidro, quartzo ou ITO), previamente limpo, foi imerso na solução contendo a PAH por um período de 5 minutos e em seguida procedeu-se com a lavagem, mergulhando-se o substrato por três vezes em solução de lavagem (pH 7-8), para remoção do material não adsorvido, seguido da secagem do sistema substrato/monocamada com fluxo de nitrogênio. Posteriormente o sistema substrato/monocamada foi imerso na solução de Feof-b, também durante um período de 5 minutos para que a primeira bicamada fosse formada (substrato/PAH/Feof-b). Em seguida procedeu-se com a lavagem do conjunto substrato/bicamada, agora em uma mistura de etanol e água na proporção 9:1, novamente para a remoção do material não adsorvido seguido da secagem com fluxo de nitrogênio. Os valores de pH utilizados foram ajustados com HCl 0,10 mol/L e NH₃OH 0,10 mol/L de acordo com o valor de pH desejado.

A formação do filme em bicamadas de goma do cajueiro e Feof-b foi realizada exatamente como descrita para a PAH, apenas substituindo este polímero sintético pela goma natural do cajueiro. Cabe

ainda ressaltar que a PAH atua como polieletrólito catiônico enquanto a goma do cajueiro atua como um polieletrólito aniônico. Assim sendo, através deste estudo será possível verificar a influência da carga do material intercalado com a Feof-b nas propriedades finais do filme.

A versatilidade da técnica de automontagem permitiu a fabricação de filmes com estrutura de quadricamadas. Neste caso, a deposição dos materiais com cargas de sinais opostos sobre os substratos sólidos resultaria em uma estrutura do tipo “sanduíche” através das interações eletrostáticas existentes. Assim, foram depositadas camadas alternadas de PAH (material catiônico) e a goma do cajueiro (caráter aniônico) e ainda a Feof-b, na ordem PAH/Goma/PAH/Feof-b, Figura 14.

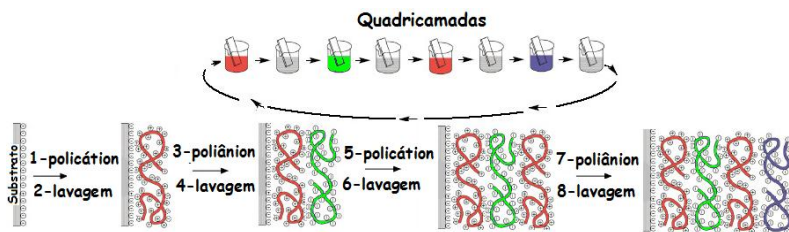


Figura 14: Esquema de formação de filmes contendo quadricamadas [64].

2.3.3 Caracterização dos filmes automontados

2.3.3.1 Espectroscopia na região do Ultra-Violeta Visível (UV – Vis)

Foram realizadas medidas de espectroscopia na região do UV-Vis, tanto na caracterização das soluções dos compostos formadores dos filmes, como durante as etapas de deposição para o monitoramento do processo de formação dos filmes. Os espectros foram obtidos para as soluções dos materiais utilizando uma cubeta de quartzo e também para um número variável de mono/bi ou quadricamadas depositadas sobre a placa de quartzo, com o objetivo de se comparar o comportamento do material em solução e imobilizado na forma de filme. As medidas de absorção foram realizadas com um espectrofotômetro Ocean Optics USB 4000 existente em nosso grupo de pesquisa.

2.3.3.2 Microscopias de Força Atômica (AFM)

Nos últimos anos, a técnica de microscopia de força atômica (*atomic force microscopy* – AFM), tem se tornado uma das principais ferramentas na análise de superfícies de materiais sólidos com resoluções que podem atingir escalas nanométricas. A técnica baseia-se na varredura da superfície do material por uma ponta de prova registrando-se as forças de atração e repulsão que esta sofre devido ao contato (físico ou não) com a superfície, e com isso construindo um perfil morfológico.

Em nosso trabalho, a espessura e a morfologia dos filmes foram analisadas utilizando um AFM, modelo Nanosurf Easyscan2, existente em nosso grupo de pesquisa. As medidas foram realizadas em modo “*Tapping*”, com velocidade de uma linha por segundo, resolução de 512 x 512 linhas, variando-se o tamanho da imagem conforme necessário.

As medidas de espessura dos filmes foram obtidas fazendo um risco suficientemente profundo para se atingir a superfície do substrato, formando dessa maneira um degrau no filme. Durante a medida a ponteira percorre a superfície do filme medindo o degrau entre o risco e a região vizinha contida no filme, determinando deste modo sua espessura.

2.3.3.3 Medida Eletroquímica

2.3.3.3.1 Voltametria Cíclica (VC)

As medidas eletroquímicas foram realizadas pela técnica de VC tanto para a caracterização do sistema em estudo quanto para os testes de aplicação. Neste caso, o filme foi estudado como sensor para detecção de H_2O_2 . Os experimentos foram realizados com um potenciostato da marca AUTOLAB modelo PGSTAT302N, utilizando o programa Nova 1.5 e desenvolvido no LabSin. Tais medidas foram obtidas em uma célula eletroquímica com capacidade de 100 mL contendo três eletrodos: um contra eletrodo de platina ($7,0 \text{ cm}^2$), um eletrodo saturado de calomelano (ESC) como referência, e como eletrodo de trabalho, os filmes automontados depositados sobre ITO contendo 3 mono, 3 bi ou 3 quadricamadas. Como eletrólito suporte foi utilizado uma solução de HCl 0,1 mol/L em meio aquoso. Todos os ensaios por VC foram realizados a uma velocidade de varredura de 50 mV/s, a temperatura ambiente.

Foram preparados testes de detecção voltamétrica de H_2O_2 utilizando filmes contendo três monocamadas de Feof-b, ou PAH ou ainda goma do cajueiro. Posteriormente, os testes foram realizados para os sistemas em bicamada, cujos filmes também foram preparados com três bicamadas. Para o estudo das bicamadas também foi averiguado o efeito da sequência de deposição dos materiais frente ao H_2O_2 . Os filmes em bicamadas estudados foram: PAH/Feof-b, Feof-b/PAH, Goma/Feof-b e Feof-b/Goma.

Nos testes de detecção foi utilizada uma concentração fixa de H_2O_2 (100 mmol/L) adicionado ao eletrólito de suporte.

2.3.3.3.2 Cronoamperometria

Os experimentos de cronoamperometria registram um valor de corrente como função do tempo. Para obtenção das curvas utilizamos o programa Nova 1.5 que permite dividir as medidas em duas etapas distintas, antes e após os acréscimos de H_2O_2 , possibilitando uma análise de forma independente.

Os experimentos de cronoamperometria foram realizados com o propósito de obter a curva de calibração para o sensor que obteve o melhor desempenho na detecção de H_2O_2 a partir do estudo de VC.

Desta forma, as medidas cronoamperométricas foram realizadas em uma célula eletroquímica com o mesmo arranjo que aquela utilizada em VC, como está descrito no item (2.3.3.3.1), sendo composta por um sistema de três eletrodos conectados ao potenciostato. Porém, uma única arquitetura foi utilizada como eletrodo de trabalho, que corresponde ao sistema bicamada Goma/Feof-b (sistema mais sensível à H_2O_2). Como eletrólito suporte foi utilizado uma solução contendo 100 mL de HCl 0,1 mol/L em meio aquoso. Além disso, foi necessário o auxílio de um agitador magnético para uma homogeneização da solução após cada acréscimo de H_2O_2 .

Na primeira etapa da medida cronoamperométrica, com o potencial fixo em 0,0 V/SCE, aguarda-se 1200 segundos, até que a corrente alcance um valor estacionário, para que então, se inicie o incremento de H_2O_2 . Na segunda etapa, após a estabilização da corrente, realizam-se na solução de HCl as adições contendo 10 μ L de H_2O_2 em intervalos de 100 segundos durante 1800 segundos, o que equivale a aproximadamente 18 acréscimos para cada amostra. Cada adição de

H_2O_2 é correspondente a um incremento de aproximadamente 1,1 mmol/L na solução total. Imediatamente após o acréscimo é possível observar um salto de corrente, que representa uma elevação proporcional ao acréscimo de H_2O_2 , atingindo a partir deste um novo patamar e assim sucessivamente para as adições subsequentes de H_2O_2 . Ao fim de todos os acréscimos uma curva em forma de patamares é gerada.

2.4 Resultados e Discussões

Esta seção apresenta o estudo e caracterização de uma nova plataforma para aplicações práticas, onde a Feof-b, composto derivado da clorofila, foi investigada e caracterizada.

Inicialmente são apresentadas as medidas de espectroscopia UV-Vis, onde a Feof-b foi estudada em solução e em seguida, na forma de filme ultrafino para diversas arquiteturas. A Feof-b foi automontada juntamente com outros dois materiais que apresentam cargas opostas, PAH (catiônica) e goma do cajueiro (aniônica). Este estudo foi importante para investigar a carga que este novo material apresenta, além disso, a possibilidade de montar filmes nanométricos com a Feof-b inserida. Na sequência são apresentadas as características morfológicas para os diferentes filmes a partir das medidas realizadas com o auxílio de um AFM, possibilitando que estudos como rugosidade e espessura fossem discutidos. Por fim, nesta seção são apresentadas as medidas voltamétricas e amperométricas. A VC primeiramente nos proporcionou a informação a respeito das características eletroquímicas para a Feof-b, ou seja, se esse material exibe características de um material eletroativo. Em seguida, a VC foi empregada para estudar a sensibilidade dos eletrodos modificados com Feof-b (para diferentes sistemas de deposição) no teste catalítico para H_2O_2 . O melhor sistema encontrado em VC para detecção de H_2O_2 foi escolhido para obter a curva de calibração, através das medidas de cronoamperometria, e desta forma, informações que envolvem a determinação da sensibilidade, linearidade e tempo de resposta foram obtidas para o sensor.

Assim, o objetivo principal deste trabalho envolveu o estudo e caracterização de um novo material conhecido como Feof-b, com uma aplicação que possibilita uma nova alternativa para o estudo e desenvolvimento de dispositivos sensores.

2.4.1 Monitoramento do crescimento dos filmes

Uma variedade de técnicas experimentais vem sendo usada para estudar e caracterizar os filmes automontados. Uma das técnicas amplamente utilizada é a espectroscopia UV-Vis, uma vez que maioria dos materiais empregados na fabricação de camadas automontadas absorve luz nessa região do espectro eletromagnético. Desta forma, a espectroscopia de UV-Vis proporciona uma alternativa direta para

verificar a formação das múltiplas camadas e estimar a evolução da absorbância em cada etapa deposição [34].

A Figura 15 (A) mostra o espectro de UV-Vis da solução de Feof-b. Dentre os processos de absorção registrados dois deles destacam-se pela intensidade do sinal e estão relacionados a transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$. O primeiro, localizado entre 400 e 450 nm corresponde à banda de Soret [73, 74, 101], característica de porfirinas e seus derivados, enquanto o segundo processo de absorção observado entre 600 e 700 nm refere-se à banda Q [73, 101]. Os dados obtidos para Feof-b em solução assemelham-se aos dados relatados na literatura [73, 74]. As soluções de PAH e goma do cajueiro não absorvem na região do visível (Figura 15 B), portanto não interferem no monitoramento da adsorção da Feof-b nos filmes automontados.

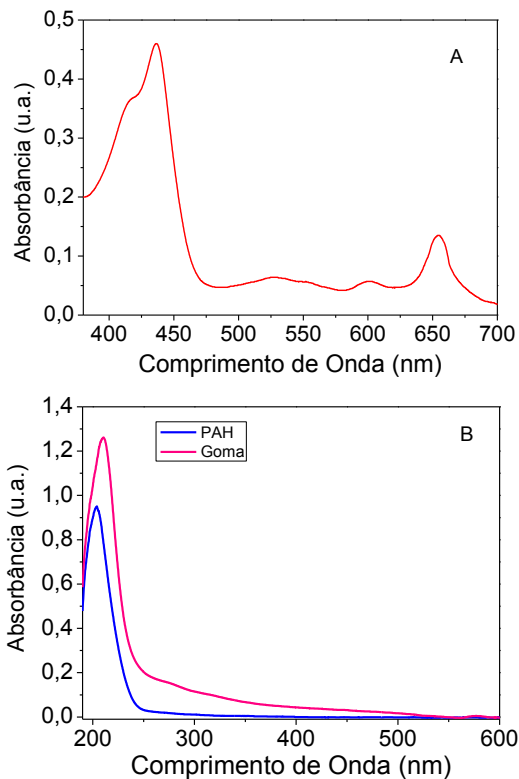


Figura 15: Espectro de absorção da solução de (A) Feof-b e (B) PAH e goma do cajueiro.

Em uma etapa subsequente realizamos testes de adsorção de monocamadas de Feof-b, verificando a possibilidade de preparação de filmes automontados, a partir de interações secundárias Feof-b-Feof-b, sem um agente ligante necessário para alternância entre as propriedades aniônicas e catiônicas das moléculas. Os resultados estão expressos na Figura 16 (A), onde o perfil é muito semelhante ao obtido para Feof-b em solução. Além disso, nota-se nitidamente que, pelo menos até 20 monocamadas de Feof-b, a deposição foi muito bem sucedida, o que pode ser comprovado pela quantidade de material adsorvido nesta etapa de deposição.

Com base nos dados de UV-Vis, Figura 16 (A) observa-se um pequeno deslocamento da banda de Soret do azul para região do violeta. A banda inicialmente observada para a solução em 436 nm (Figura 15 (A)) desloca-se para 406 nm, no caso do filme com monocamadas de Feof-b. Além disso, no espectro da solução existe um ombro da banda em 414 nm, o qual não é mais visível no espectro do filme, que pode estar sendo mascarado pelo deslocamento da banda. Estas alterações entre os espectros de solução e filmes também já foram observadas de forma similar na literatura, como pôde ser observado na Figura 9 no estudo realizado por Bellamy e colaboradores [75], porém utilizando a feofitina-a e podem estar relacionados a efeitos de agregação e interação das moléculas nos filmes. Com relação à banda Q, os filmes apresentaram um leve deslocamento desta banda para o vermelho, de 655 nm para 676 nm.

O mecanismo original do método automontagem está relacionado com a adsorção espontânea de camadas de polímero de carga oposta, e isso explica com sucesso os mecanismos de adsorção para alguns polieletrólitos [34]. No entanto, para o crescimento de um filme com multicamadas onde apenas um tipo de material é utilizado (nesse caso somente Feof-b), as interações secundárias designadas, forças de van der Waals e ligações de H, prevalecem sobre as eletrostáticas e dominam a formação do filme [35, 38, 62]. Um aspecto importante dos filmes automontados é o aumento linear da espessura com o número de bicamadas, o que significa que a mesma quantidade de material é adsorvida após cada etapa de deposição [34]. Por outro lado, a Figura 16 (B) mostra a dependência da absorção óptica a 405 nm para filmes automontados de Feof-b como uma função do número de monocamadas e observa-se um aumento não-linear, aproximando-se

mais de um comportamento exponencial simples. Está bem estabelecido que um crescimento não-linear para as primeiras camadas de adsorção pode estar associado aos efeitos do substrato [34]. Filmes com crescimento exponencial foram descritos por Elbert e colaboradores [102] para o filme de poli(L-lisina)/alginato (PLL/ALG). Depois disso, diversos outros estudos mostraram filmes multicamadas que exibem este tipo de crescimento [40, 103, 104]. A partir da Figura 16 (B) é visto que a quantidade de Feof-b adsorvida aumenta exponencialmente dentro do número de camadas investigado, indicando que a quantidade de material adsorvido não é a mesma em cada etapa de deposição. O sinal de absorvância é intenso para o filme contendo monocamadas de Feof-b, indicando que o sistema dispõe de uma grande quantidade de material adsorvido. Portanto, presume-se que as interações que ocorrem entre as moléculas de Feof-b apresentam um caráter altamente atrativo.

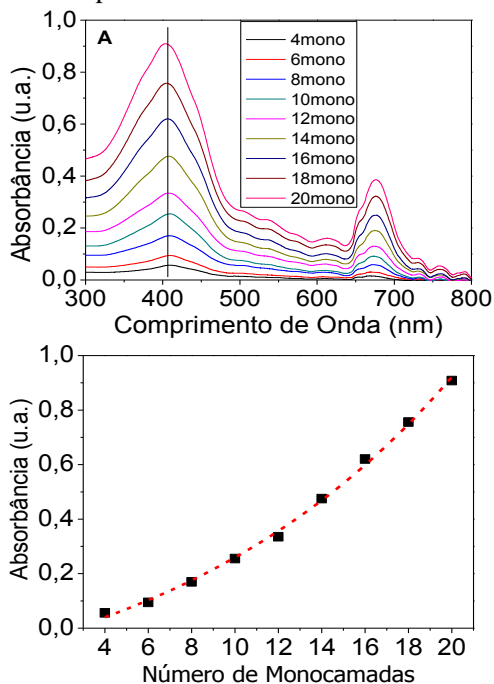


Figura 16: (A) Espectro de absorção na região do visível para o filme automontado das monocamadas de Feof-b e (B) a relação entre a absorvância da banda em 406 nm em função do número de bicamadas, onde a linha tracejada indica um ajuste exponencial.

Em uma nova abordagem foram obtidos espectros de UV-Vis para os filmes bicamadas de PAH/Feof-b (Figura 17) e Goma/Feof-b (Figura 18). O crescimento dos filmes foi monitorado na região entre 400 a 450 nm, e os espectros registrados a cada duas bicamadas depositadas.

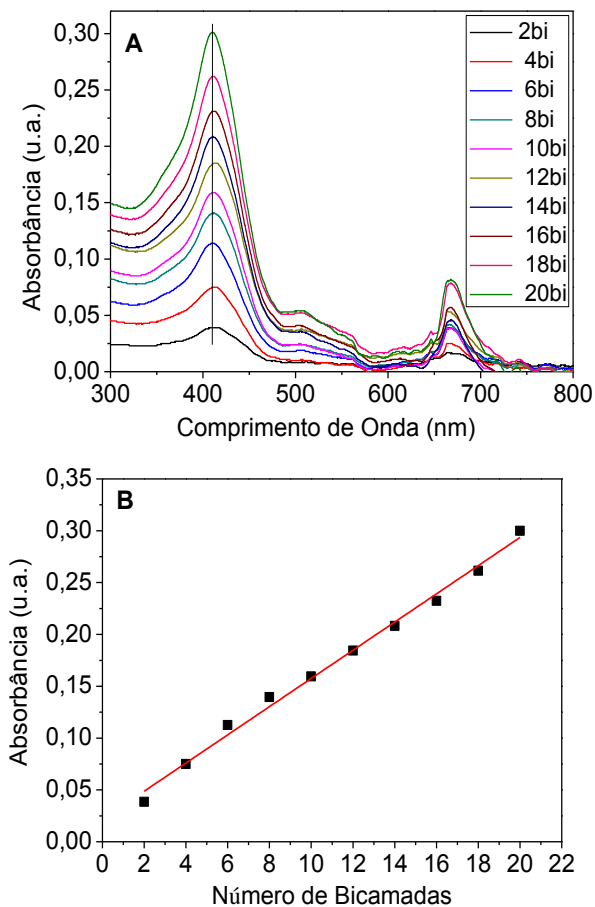


Figura 17: (A) Espectro de absorção para o filme automontado de PAH/Feof-b. (B) Relação entre a absorbância máxima (em 411 nm) em função do número de bicamadas.

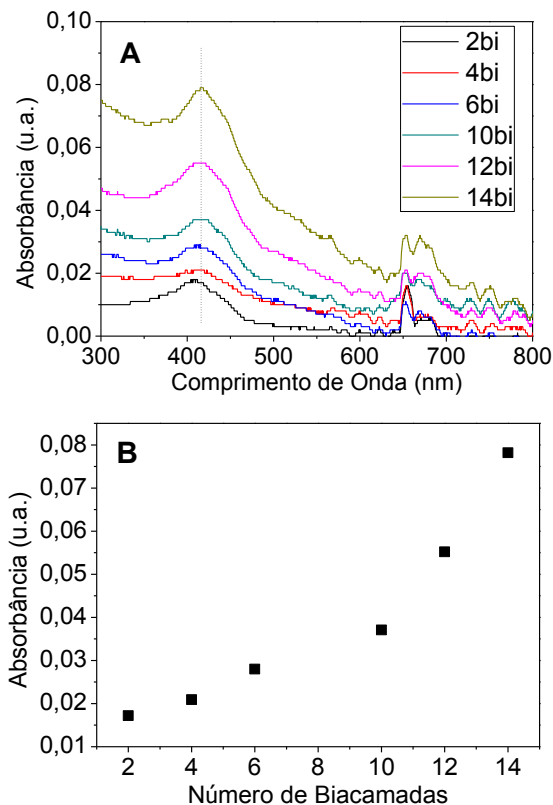


Figura 18: (A) Espectro de absorção na região do visível para o filme automontado do sistema Goma/Feof-b. (B) Relação entre a absorbância máxima (em 416 nm) em função do número de bicamadas.

O objetivo deste estudo foi investigar a influência da carga de polieletrólito na formação do filme. De um modo geral, os espectros obtidos para ambos os filmes, PAH/Feof-b (Figura 17 (A)) e Goma/Feof-b (Figura 18 (A)), foram semelhantes àqueles obtidos para a Feof-b em solução (Figura 15) e em filme monocamada (Figura 16 (A)). No entanto, os resultados obtidos mostraram que a PAH é um polieletrólito mais eficiente para produção de filmes multicamadas com a Feof-b, uma vez que os espectros exibiram maiores valores de absorção e bandas bem definidas (Figura 17 (A)), quando comparados àqueles obtidos com a goma do cajueiro (Figura 18 (A)). Provavelmente ocorre uma forte interação entre a PAH e a Feof-b devido ao caráter catiônico exibido pela mesma. A modificação do substrato pela PAH

resulta em um maior número de sítios de ancoramento, o que resulta na adsorção de uma quantidade maior de material quando comparado à goma do cajueiro. Estudos anteriores [40] mostraram o caráter aniônico da goma do cajueiro, desta forma a pouca afinidade observada entre a goma do cajueiro e a Feof-b sugere que também a Feof-b tenha caráter aniônico nas condições utilizadas para a deposição dos filmes.

Ainda com base nos dados de UV-Vis das Figuras 17 (A) e 18 (A), observa-se um pequeno deslocamento da banda de Soret para 411 e 416 nm, no caso dos filmes de PAH/Feof-b e Goma/Feof-b, respectivamente. Com relação à banda Q, ambos os filmes também apresentaram um leve deslocamento desta banda para o vermelho, de 655 para 667 nm no caso do filme PAH/Feof-b e seu quase desaparecimento para o filme com bicamadas de Goma/Feof-b.

As Figuras 17 (B) e 18 (B) mostram a relação da absorbância em função do número de bicamadas depositadas para os filmes de PAH/Feof-b e Goma/Feof-b, respectivamente. Um comportamento oposto em relação ao filme de monocamada de Feof-b foi observado para o filme com bicamadas de PAH/Feof-b. Resultados semelhantes foram obtidos anteriormente em um sistema utilizando azocorante [105] em vez de Feof-b. A quantidade de material adsorvido para o filme PAH/Feof-b é, praticamente, constante com o número de bicamadas depositadas, conduzindo a um aumento linear, o que caracteriza o sistema como um processo autoregulado [40], onde a mesma quantidade de material com carga oposta é adsorvida em cada etapa de deposição. Já para o filme Goma/Feof-b a linearidade não é observada, uma vez que ambas as substâncias têm a mesma carga. Neste caso, as interações secundárias prevalecem sobre as eletrostáticas.

Em uma nova tentativa de produzir filmes automontados de Feof-b com a goma do cajueiro, foram propostos filmes com uma estrutura em quadricamadas PAH/Goma/PAH/Feof-b, onde a PAH (polieletrólito catiônico), estaria intercalado entre as camadas de goma do cajueiro e Feof-b, ambos aniônicos (Figura 19).

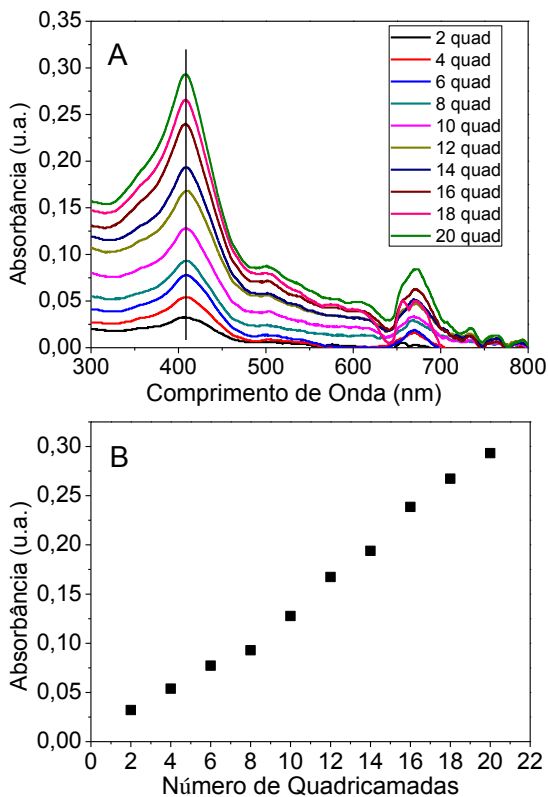


Figura 19: (A) Espectro de absorção para o filme automontado para o sistema de quadricamadas de PAH/Goma/PAH/Feof-b. (B) Relação entre a absorbância máxima (409 nm) em função do número de quadricamadas.

A formação do filme em quadricamadas é mostrada na Figura 19 (A), onde é exibido um comportamento muito similar aos filmes de PAH/Feof-b, inclusive as intensidades do pico mais intenso em ambos os filmes são praticamente idênticas, indicando que a interação entre a PAH e a Feof-b estão dominando a formação do filme. Aqui também ocorre o mesmo deslocamento das bandas Soret e Q para 409 e 670 nm, respectivamente. Entretanto, a relação entre os valores de absorbância e o número de quadricamadas depositadas parece não seguir um comportamento linear, sugerindo ser não autoregulado, (Figura 19 (B)).

2.4.2 Medidas AFM

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos pela técnica de AFM no estudo da morfologia e espessura dos filmes. Os dados obtidos estão agrupados na Tabela 02 para melhor visualização.

O valor de rugosidade superficial é um importante parâmetro utilizado em sensores, uma vez que um maior valor de rugosidade implica também num aumento na área superficial e consequentemente dos sítios ativos, de modo a facilitar o ancoramento de biomoléculas, e com isso aumentar a interação da superfície com o analito.

A Figura 20 mostra imagens de AFM para filmes com 15 e 20 monocamadas de Feof-b. Aparentemente o aumento do número de bicamadas deixou a superfície do filme mais suave, o que é comprovado pelo valor da rugosidade média da superfície (RMS) fornecido pelo programa, sendo 9,0 e 7,0 nm para os filmes com 15 e 20 monocamadas, respectivamente.

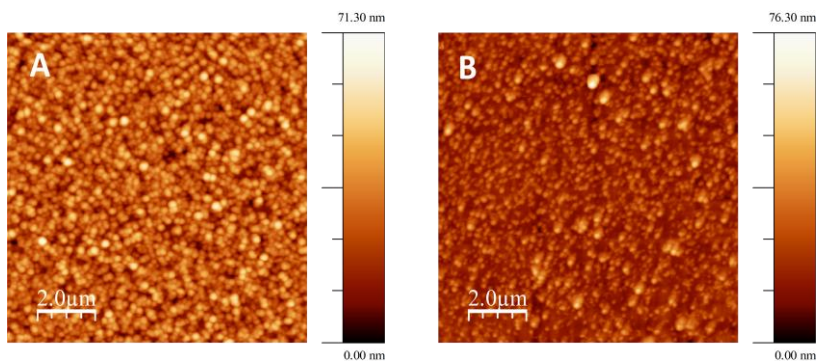


Figura 20: Imagens de AFM para filmes de Feof-b com 15 monocamadas (A) e 20 monocamadas (B).

Na Figura 21 apresentamos imagens de AFM para o sistema PAH/Feof-b para filmes com 15 e 20 bicamadas. O comportamento observado é o mesmo do caso anterior onde a rugosidade média dos filmes diminuiu com o aumento do número de bicamadas: 27,3 nm para 15 bicamadas e 15,0 nm para 20 bicamadas.

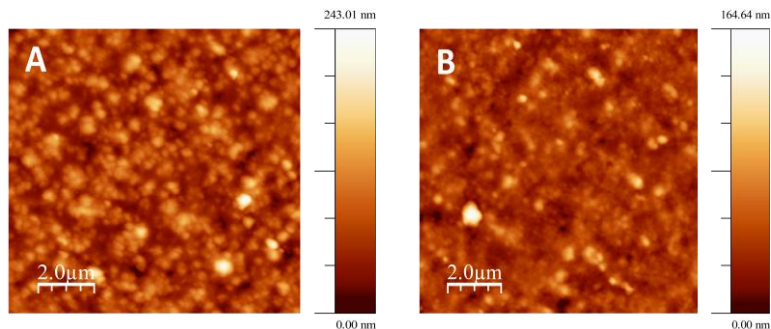


Figura 21: Imagens AFM para um filme de PAH/Feof-b apenas com (a) 15 bicamadas e (b) 20 bicamadas.

A Figura 22 (A) apresenta a imagem de AFM para um filme de 15 bicamadas de Goma/Feof-b. Aparentemente poucas moléculas estão incorporadas ao substrato para este sistema, o que pode ser confirmado pela inhomogeneidade da superfície com uma rugosidade média de 5,9 nm. Na Figura 22 (B) é mostrada a imagem de AFM da superfície do filme automontado contendo 20 quadricamadas de PAH/Goma/PAH/Feof-b. O valor da rugosidade média para esse filme é de 18 nm.

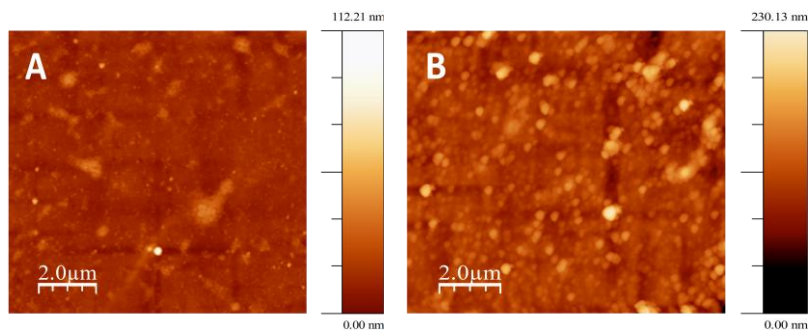


Figura 22: Imagens AFM para os filmes (A) Goma/Feof-b com 15 bicamadas; e (B) PAH/Goma/PAH/Feof-b com 20 quadricamadas.

A Figura 23 mostra como foi realizada a medida da espessura do filme de PAH/Feof-b de 20 bicamadas. Na Figura 23 (A) pode-se observar a topografia do filme, onde as regiões mais claras são correspondentes à superfície que contém o filme e a parte escura onde o filme foi removido com auxílio de uma agulha. Um corte transversal entre o canal e as regiões vizinhas, que contém o filme, foi feito com o

programa do equipamento para encontrar a espessura do filme e o resultado é mostrado na Figura 23 (B), sendo este valor equivalente a aproximadamente 100 nm.

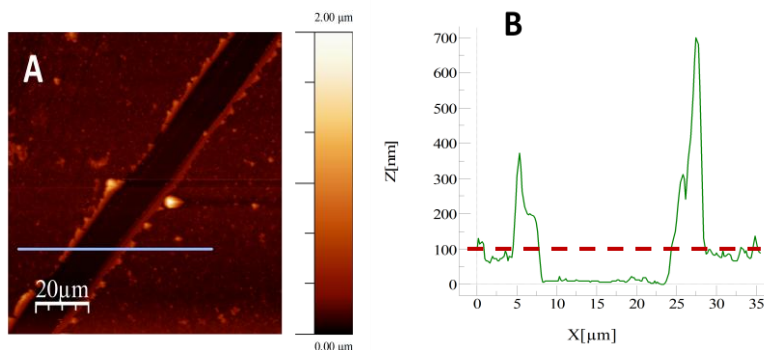


Figura 23: (A) Imagem AFM de um filme com 20 bicamadas de PAH/Feof-b e (B) secção transversal mostra exatamente a espessura do filme.

A Tabela 2 sintetiza os dados obtidos para as medidas de AFM nos filmes estudados.

Tabela 2: Valores da rugosidade média e espessura dos filmes estudados.

Filmes	Número de mono/bi/quadri camadas	Rugosidades (nm)	Espessura (nm)
Feof-b	15	9,0	--
Feof-b	20	7,0	--
PAH/Feof-b	15	27,3	75
PAH/Feof-b	20	15,0	100
PAH/G/PAH/Feof-b	20	18,0	100
Goma/Feof-b	15	5,9	--

Das imagens de AFM vemos que os filmes de monocamadas de Feof-b são os mais homogêneos, o que também reflete diretamente nos

menores valores de rugosidade que estes filmes apresentam. Outro fator a ser observado, é que eles apresentam características mais granulares com boa monodispersividade dos tamanhos de grão, o que também reflete nos valores menores da sua rugosidade. É importante ressaltar que nesta etapa, devido a falta de material (Feof-b) para preparar a solução dos filmes com 15 e 20 monocamadas de Feof-b, para investigar a morfologia dos filmes através de medidas com AFM, a solução utilizada nesta etapa foi três vezes diluída, em comparação com a solução inicial utilizada para o sistema bicamadas e quadricamadas, ou seja, 0,22 mg/mL e 0,67 mg/mL, respectivamente. Este fato pode influenciar a morfologia dos filmes, mas acreditamos que a maior contribuição para as diferenças observadas é a presença das matrizes adicionais, PAH e goma do cajueiro.

Comparando os valores encontrados para os filmes de 20 bicamadas para o sistema PAH/Feof-b e 20 quadricamadas PAH/Goma/PAH/Feof-b, podemos observar pela Tabela 02 que as espessuras dos filmes são similares. Como as medidas de absorção indicaram que aproximadamente a mesma quantidade de Feof-b foi adsorvida, isso sugere que a goma de cajueiro praticamente não contribui para a espessura dos filmes e/ou que uma quantidade muito pequena de goma do cajueiro foi adsorvida. Se olharmos para a rugosidade destes dois filmes, vemos que ela é um pouco maior para o filme com quadricamadas, o que é um reflexo deste ser menos homogêneo (como mostra a imagem de AFM). Este efeito parece estar relacionado à inserção da goma.

Comparando os filmes de 15 bicamadas de PAH/Feof-b com o filme de 15 bicamadas de Goma/Feof-b, observa-se que o primeiro também exibe uma morfologia granular (como apresentado para as monocamadas de Feof-b), mas com maiores domínios de grãos, provavelmente devido a aglomerações de moléculas de Feof-b sobre a matriz PAH (RMS de 27 nm). Já o filme Goma/Feof-b é muito liso, com o valor RMS de 6,0 nm, sem a estrutura granular característica presente nos outros filmes. Na realidade, parece que uma menor quantidade de moléculas de Feof-b é incorporada nesta última estrutura, o que corrobora os valores reduzidos de absorção.

Para o sistema PAH/Goma/PAH/Feof-b temos apenas a medida para 20 quadricamadas, pois foi preparada apenas uma lâmina nesta estrutura e as medidas de absorção foram sendo capturadas à medida que as camadas foram sendo construídas. Já os filmes com Goma/Feof-b

eram pouco homogêneos tornando difícil um estudo sistemático. Apresentamos os resultados de um filme apenas para ilustrar.

Salientamos que a espessura não pôde ser medida para as monocamadas de Feof-b e para o sistema Goma/Feof-b. Isso ocorre quando o valor da rugosidade torna-se próximo da espessura do filme. Portanto, podemos dizer que apesar de ocorrer uma excelente adsorção da Feof-b na estrutura de monocamada, onde os resultados de absorção sugerem inclusive uma adsorção de mais material que os filmes de bicamadas e quadricamadas, a espessura do filme com 20 monocamadas deve ser em torno 2 vezes o valor da sua rugosidade, ou seja, entre 15 e 20 nm, tornando este filme bastante compacto. Isso novamente sugere que a PAH é a grande responsável pela espessura dos filmes em bicamadas e quadricamadas.

A espessura do filme onde a goma de cajueiro faz bicamada com a Feof-b também não pôde ser medida, mas neste caso, tanto as medidas de absorção como a imagem de AFM indicam que a adsorção de Feof-b foi bem menor.

2.4.3 Caracterização Eletroquímica

2.4.3.1 VC em meio ácido

Após a confirmação de que era possível a automontagem dos filmes com os polieletrólitos goma do cajueiro e PAH com a Feof-b para a obtenção dos filmes automontados com diferentes arquiteturas, todos os sistemas aqui propostos foram estudados pela técnica de VC com o objetivo de caracterizar as espécies imobilizadas e também verificar a viabilidade de aplicação destes filmes como sensores eletroquímicos.

Realizamos o estudo eletroquímico para a Feof-b em meio ácido (HCl 0,1 mol/L), na janela de potencial entre 0,5V a 1,3 V, pois neste intervalo de potencial foi observado que a Feof-b exibe um processo de oxidação bem definido (Figuras 24 (B)). A partir da comparação com o comportamento de um sistema contendo ftalocianina de níquel (NiTsPc) [79], é possível sugerir que a oxidação observada a 1,05 V/SCE está relacionada com o macrociclo da Feof-b. Até onde sabemos, não existem trabalhos na literatura sobre a janela de potencial para o estudo de processo redox para a Feof-b em meio aquoso.

A Figura 24 mostra os voltamogramas cíclicos no intervalo de potencial de interesse para o eletrodo de ITO puro e para o ITO modificado com três monocamadas de PAH, ou goma do cajueiro, ou Feof-b.

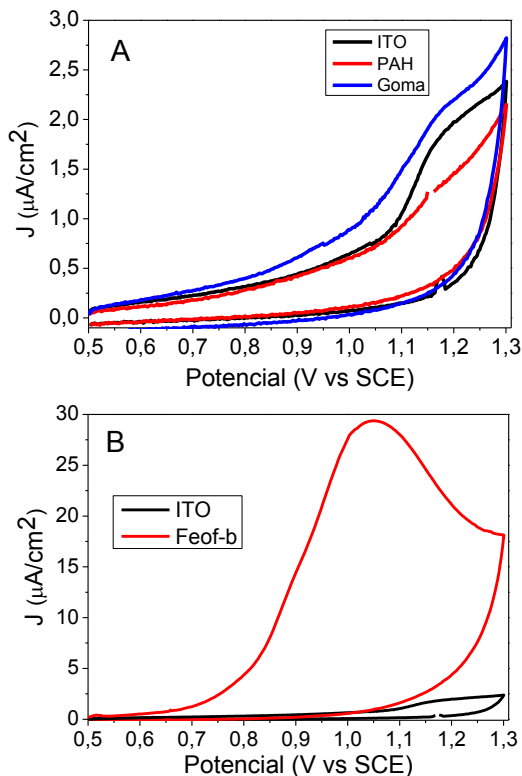


Figura 24: Voltamogramas cíclicos: (A) para o ITO puro e para ITO modificado com três monocamadas de PAH ou goma do cajueiro, (B) para o ITO puro e modificado com três monocamadas de Feof-b. Todas as medidas foram realizadas em HCl 0,1 mol/L, a 50 mV/s.

A Figura 24 (A) exhibe as respostas eletroquímicas obtidas para o substrato (ITO) não modificado e modificado com três monocamadas da goma de cajueiro ou de PAH. Em todos os casos não foi observado um comportamento típico de um material eletroativo, onde, o aparecimento de um ombro na região de cerca de 1,2 V pode estar associado ao ITO nas condições estudadas, eletrólito e janela de potencial analisados. O processo de oxidação observado na região de 1,2

V torna-se desprezível quando comparado ao substrato modificado com as três monocamadas de Feof-b (Figura 24 (B)).

Apesar da goma do cajueiro e da PAH não exibirem eletroatividade (Figura 24 (A)), a interação destes materiais com a Feof-b quando imobilizados na forma de filmes finos em multicamadas, permitiu o surgimento de novas propriedades, como serão mostradas a seguir.

Com objetivo de investigar o efeito da sequência da deposição dos filmes de bicamadas foi realizada a caracterização eletroquímica para os filmes contendo i) PAH/Feof-b e Feof-b/PAH, ii) Goma/Feof-b e Feof-b/Goma, Figura 25 (A) e (B).

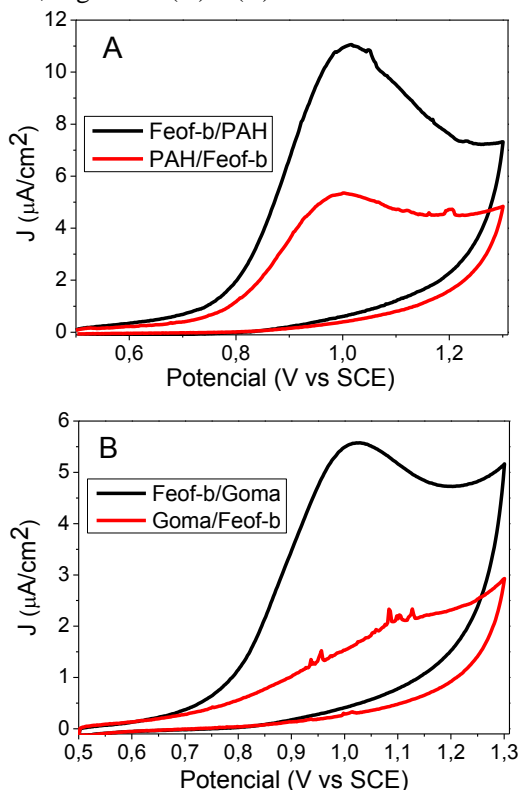


Figura 25: Voltamogramas cíclicos para ITO modificado com o sistema com bicamadas: (A) PAH/Feof-b ou Feof-b/PAH e (B) Goma/Feof-b ou Feof-b/Goma. Todas as medidas foram realizadas em HCl 0,1 mol/L a 50 mV/s.

Na Figura 25 (A) e (B) observa-se que a sequência de deposição dos materiais que constituem o filme bicamada influencia o perfil eletroquímico destes sistemas, interferindo tanto na intensidade do sinal quanto na forma do voltamograma. Os sistemas em bicamadas contendo a Feof-b imobilizada em conjunto com a PAH, Figura 25 (A) mostram maiores valores de corrente quando comparados ao sistema onde a PAH foi substituída pela goma do cajueiro, Figura 25 (B). O sinal de corrente torna-se ainda maior quando o ITO é modificado primeiro pela Feof-b para depois haver a deposição da PAH, sequência Feof-b/PAH. Já para o caso do filme contendo a goma do cajueiro, observa-se que quando o ITO é modificado pela goma do cajueiro para posteriormente ser feito a deposição da Feof-b (filme Goma/Feof-b), o sinal eletroquímico característico da Feof-b é suprimido, mostrando uma forte diminuição de corrente, Figura 25 (B).

Para efeito de comparação, também foram estudados filmes contendo três monocamadas somente da Feof-b e ainda filmes contendo três quadricamadas da sequência PAH/Goma/PAH/Feof-b, (Figura 26).

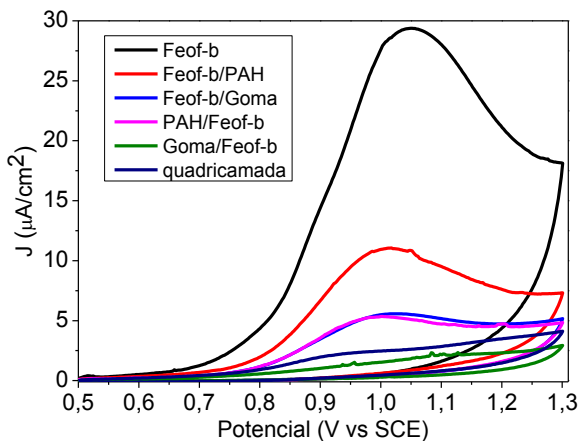


Figura 26: Voltamogramas cíclicos para o ITO modificado com os filmes: Feof-b, PAH/Feof-b, Feof-b/PAH, Goma/Feof-b, Feof-b/Goma, e PAH/Goma/PAH/Feof-b. Todas as medidas foram realizadas em HCl 0,1 mol/L, a 50 mV/s.

Uma análise da Figura 26 mostra que o filme contendo apenas as três monocamadas de Feof-b apresenta a melhor resposta eletroquímica no intervalo de potencial avaliado, tanto em relação à intensidade do sinal de corrente quanto à definição do processo de oxidação da Feof-b.

A Tabela 3 apresenta os valores de E_{pa} e J_{pa} obtidos a partir da Figura 26. Dentre os valores apresentados observa-se que o eletrodo de trabalho que possui melhor sinal de corrente é comprovadamente o filme contendo apenas três monocamadas de Feof-b. Com relação aos filmes bicamadas, podemos observar o maior sinal para a sequência Feof-b/PAH ($11,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) e o menor sinal para a bicamada de Goma/Feof-b ($2,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$), seguido do sistema quadricamada com $2,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$.

Tabela 3: Valores de E_{pa} e J_{pa} para os eletrodos de trabalho Feof-b, Feof-b/PAH, PAH/Feof-b, Feof-b/Goma e PAH/Goma/PAH/Feof-b em eletrólito ácido $0,1 \text{ mol/L}$.

Eletrodo de Trabalho	E_{pa} (V)	J_{pa} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
ITO/Feof-b	1,05	29,4
ITO/Feof-b/PAH	1,01	11,1
ITO/PAH/Feof-b	1,00	5,4
ITO/Feof-b/Goma	1,02	5,7
ITO/Goma/Feof	1,09	2,1
ITO/PAH/Goma/PAH/Feof-b	0,95	2,4

2.4.3.2 Teste de detecção de peróxido de hidrogênio por VC

A fim de conhecer o efeito da Feof-b na redução de H_2O_2 os testes de detecção foram realizados em meio ácido, HCl $0,1 \text{ mol/L}$, contendo 100 mmol/L de H_2O_2 . Foram testados os filmes contendo três monocamadas Feof-b, goma do cajueiro e PAH, além dos filmes contendo três bicamadas de Feof-b/Goma, Goma/Feof-b, PAH/Feof-b e Feof-b/PAH, sendo as respostas voltamétricas mostradas na Figura 27.

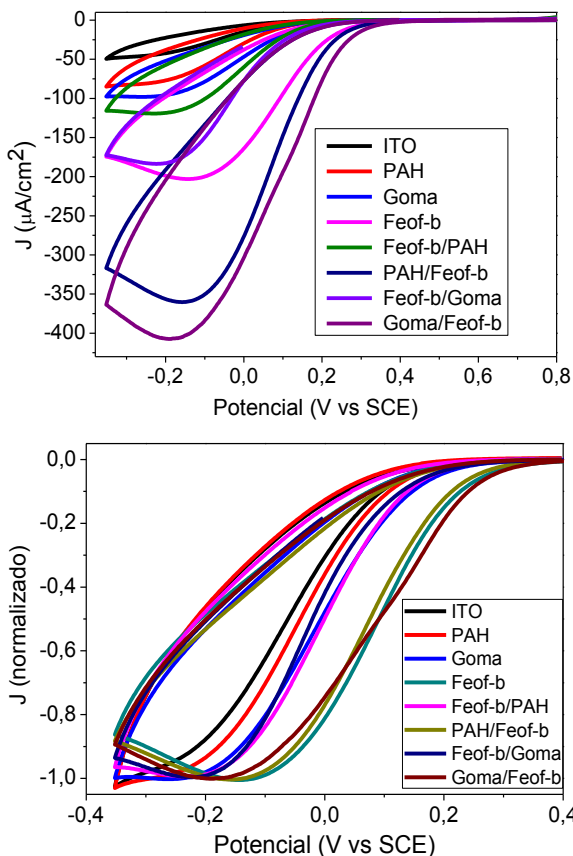


Figura 27: (A) Voltamogramas cíclicos para ITO puro e filmes monocamadas de PAH, Feof-b, e goma, além de filmes bicamadas de Feof-b/Goma, Goma/Feof-b, PAH/Feof-b e Feof-b/PAH. As medidas foram realizadas em HCl 0,1 mol/L, contendo 100 mmol/L de H_2O_2 , a 50 mV/s; (B) Curvas normalizadas.

Observa-se que ambos os filmes com PAH e goma do cajueiro aumentam a corrente de redução do peróxido, em comparação com o filme de ITO puro. As curvas normalizadas (Figura 27 (B)) indicam que o filme contendo monocamadas de goma do cajueiro apresenta uma leve atividade catalítica para a redução de H_2O_2 , uma vez que o valor máximo de corrente é detectado em menores valores de potencial catódico (-0,26 V/SCE). Para o filme com monocamadas de Feof-b, por outro lado, a corrente de redução dobra em comparação com o filme de

goma de cajueiro e o pico de corrente ocorre em $-0,14$ V/SCE, indicando uma atividade eletrocatalítica mais eficiente para H_2O_2 . Observa-se também na Figura 27 (A) que as bicamadas com a Feof-b na parte externa (Goma/Feof-b e PAH/Feof-b) apresentam os maiores valores de densidade de corrente. Interessantemente, o resultado mais surpreendente, no entanto, observa-se para o eletrodo modificado com o filme bicamada de Feof-b conjugado com goma do cajueiro, que apesar de ter exibido a menor quantidade de material adsorvido nas medidas de UV-Vis e AFM, apresenta o valor do pico de corrente catódica mais intenso para redução do peróxido, sugerindo que a presença da goma de cajueiro melhora a resposta da Feof-b em relação ao H_2O_2 . Há muitos exemplos na literatura em que o mais importante não é a quantidade de material adsorvido, mas as interações entre os materiais envolvidos e a quantidade de sítios livres. O efeito sinérgico entre os diferentes materiais na estrutura de bicamada pode originar novas propriedades em comparação com os materiais isoladamente. Em trabalhos anteriores, já foi observado que os filmes multicamadas de diferentes materiais com goma do cajueiro melhora a estabilidade em meio ácido e amplifica a resposta elétrica [80, 41]. Observou-se também que os filmes multicamadas de ftalocianina de ferro (FeTsPc) com goma do cajueiro intensificam os valores de corrente medidas eletroquímicas [40]. Estes resultados indicam que a presença de Feof-b sob a forma de multicamadas possui atividade eletrocatalítica eficiente com respeito ao H_2O_2 . A Feof-b ativa a superfície do eletrodo de modo a intensificar o sinal de densidade de corrente observado.

A Tabela 4 apresenta os valores de E_{pc} e J_{pc} obtidos a partir da Figura 27.

Tabela 4: Valores de potencial de pico catódico (E_{pc}) e densidade de corrente de pico catódico (J_{pc}) para os eletrodos de trabalho: ITO puro, ITO/PAH, ITO/Goma, ITO/Feof-b ITO/Feof-b/PAH, ITO/PAH/Feof-b, ITO/Feof-b/Goma e ITO/Goma/Feof-b em eletrólito ácido $0,1$ mol/L na presença de uma concentração fixa de peróxido de hidrogênio (100 mmol/L).

Eletrodo de Trabalho	E_{pc} (V)	J_{pc} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
ITO	-0,30	- 48
ITO/PAH	-0,30	- 82
ITO/Goma	-0,26	- 98
ITO/Feof-b	-0,14	- 200
ITO/Feof-b/PAH	-0,22	- 120
ITO/PAH/Feof-b	-0,16	- 360
ITO/Feof-b/Goma	-0,22	- 180
ITO/Goma/Feof-b	-0,19	- 410

Uma análise geral da Tabela 4 permite observar que a Feof-b apresenta uma sensibilidade a peróxido bastante promissora, cujo sinal foi intensificado para os sistemas bicamadas, onde a Feof-b foi imobilizada com a PAH e a goma do cajueiro. A Feof-b atua na detecção do peróxido com eficiência em três diferentes sistemas de modificação do eletrodo, onde ela foi inserida: 1) para o eletrodo modificado apenas com a Feof-b, formando o sistema de monocamada; 2) constituindo arquiteturas de bicamadas, onde a Feof-b foi intercalada com outros dois diferentes materiais formando os eletrodos modificados de: PAH/Feof-b; e Goma/Feof-b. Assim, o estudo catalítico mostrou alta sensibilidade ao H_2O_2 para o filme de Goma/Feof-b (410 μA), seguido do sistema PAH/Feof-b (360 μA) e finalmente pelo sistema monocamada de Feof-b (200 μA).

Como pode ser visto na Figura 27 e de forma mais clara na Figura 28, a detecção de H_2O_2 para o eletrodo de ITO puro, produz apenas uma pequena resposta de corrente, enquanto que a corrente catalítica detectada para o eletrodo de ITO modificado com multicamadas de Goma/Feof-b aumentou significativamente. Para verificar se essa corrente foi devida à capacidade electrocatalítica do H_2O_2 , uma experiência de controle sem H_2O_2 foi realizada. Neste contexto, a Figura 28 mostra os voltamogramas cíclicos do eletrodo ITO puro e modificado com Goma/Feof-b, na ausência e na presença de H_2O_2 . Através da resposta electroquímica pode ser observado que nenhum pico característico aparece no voltamograma cíclico para ambos os eletrodos quando o peróxido não está presente na solução. Estes resultados confirmam que a corrente catalítica para H_2O_2 foi devido à presença das multicamadas de Goma/Feof-b.

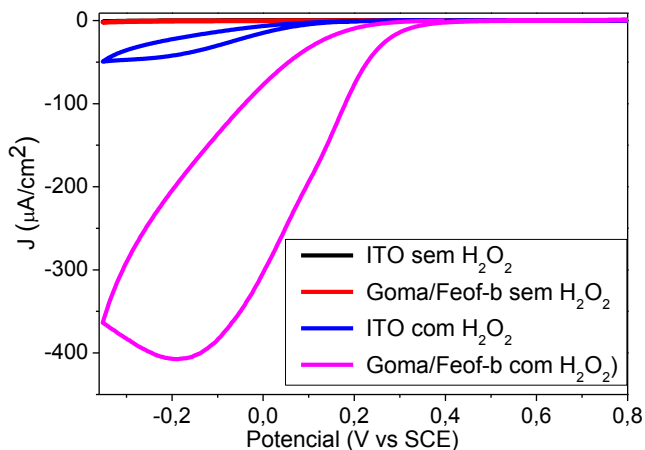


Figura 28: Voltamogramas cíclicos para o ITO puro e para o eletrodo de ITO modificado com o filme multicamadas de Goma/feof-b na ausência e na presença de 100 mmol/L de H_2O_2 em HCl (0,1 mol/L) a uma velocidade de varredura de 50 mV/s.

2.4.3.3 Cronoamperometria

As medidas amperométricas são realizadas para observar as características do eletrodo como sensibilidade, linearidade e tempo de resposta, características estas que definem a potencialidade do eletrodo como sensor. Todas as medidas estão relacionadas com a variação da corrente, em relação ao acréscimo do H_2O_2 na solução aquosa em meio ácido (HCl 0,1 mol/L).

A Figura 29 (A) ilustra a curva cronoamperométrica registrada para o eletrodo de ITO modificado com multicamadas de Goma/Feof-b após adições sucessivas de H_2O_2 com concentrações de 1,1 mmol/L sob agitação para o eletrólito HCl (0,1 mol/L). O potencial aplicado de 0,0 V foi escolhido como o potencial de trabalho para a determinação amperométrica de H_2O_2 , onde o risco de reações de interferência de outras espécies eletroativas na solução é minimizado, e também, neste potencial, a corrente de fundo e os níveis de ruído atingiram os seus valores mais baixos. A rápida resposta da corrente amperométrica pode ser observada quando alíquotas de H_2O_2 foram adicionadas à solução aquosa. A corrente máxima no estado de equilíbrio pode ser alcançada

dentro de 12 segundos, indicando um bom processo de difusão de H_2O_2 no eletrodo modificado. A corrente amperométrica aumentou linearmente com a concentração de H_2O_2 . A Figura 29 (B) mostra a curva de calibração entre a resposta de corrente e a concentração de H_2O_2 . O eletrodo apresentou uma faixa linear entre 3,3 e 19,8 mmol/L, governada pela equação: $j = 0,481 + 0,0561C$, com um coeficiente de correlação de 0,997.

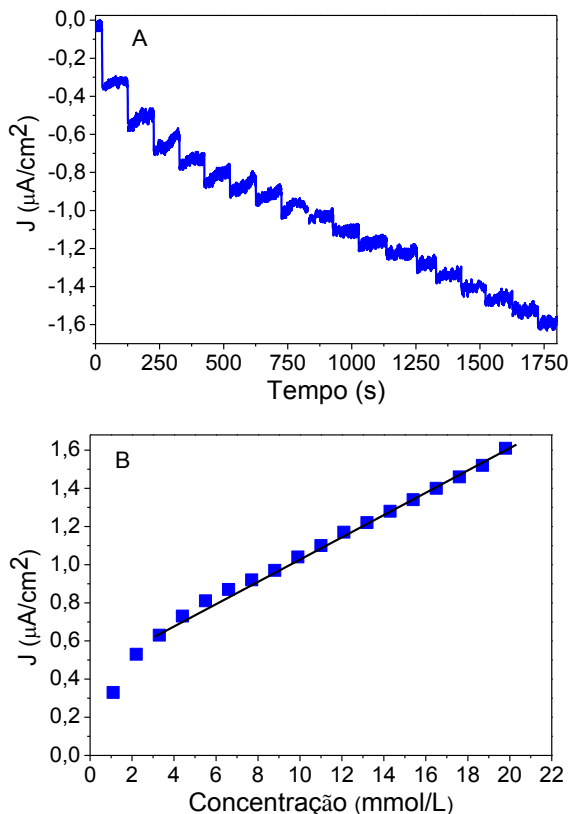


Figura 29: (A) Respostas Cronoamperométrica observada para o eletrodo ITO/Goma/feof em 0,1 mol/L de HCl, após injeções sucessivas de H_2O_2 (1,1 mmol/L). Potencial aplicado: 0.0V; e (B) Curva de calibração.

Os resultados da literatura sobre biossensores eletroquímicos para detecção de H_2O_2 [92, 94, 96], em princípio apresentaram melhores resultados que o nosso. Entretanto, o nosso sensor não chegou a ser otimizado. Além disso, o nosso tempo de resposta de 12 segundos é considerado baixo. Uma grande vantagem é que, no nosso caso, a detecção eletroquímica foi feita em um potencial de 0,0 V. Já no estudo de Wang e colaboradores [94], -0,4 V foi selecionado como o potencial para o experimento amperométrico. Eles demonstraram que a resposta amperométrica pode variar mais do que uma ordem de grandeza quando um potencial de -0,4 V é aplicado. Portanto, após otimização do nosso sistema uma resposta equivalente aos resultados encontrados na literatura poderá ser obtida. Portanto, a utilização do eletrodo ITO/Goma/Feof-b como sensor apresenta muitas vantagens, como, a fácil preparação dos filmes multicamadas Goma/Feof-b sobre o eletrodo, uma atividade eletrocatalítica adequada ao H_2O_2 , e a mais importante, ele pode ser operado em potencial 0.0 V/SCE.

Vale ressaltar que o nosso sistema utiliza dois materiais obtidos de plantas naturais (goma do cajueiro e Feof-b), ambas encontradas, sintetizadas e purificadas no Nordeste do Brasil, que além de outras vantagens, torna o nosso sensor um dispositivo extremamente simples, barato e que permite a exploração e utilização de recursos naturais obtidos da flora do Brasil. Portanto, essa abordagem apresenta um novo e eficiente tipo de sensor eletroquímico não enzimático para detecção H_2O_2 .

**CAPÍTULO 3: LAB-IN-A-SYRINGE UTILIZANDO
NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA DETECÇÃO DE
PROTEÍNAS**

Testes de ensaio de fluxo lateral (LFIA) utilizando AuNPs conjugadas com proteínas são um dos tipos mais utilizados de dispositivos para diagnósticos [106]. O LFIA pode ser aplicado em quase todas as circunstâncias em que um teste rápido é exigido, o que é de grande interesse em áreas de análise de alimentos [107], controle ambiental [10, 108] e saúde [23]. Isto ocorre principalmente devido à sua capacidade de analisar diferentes tipos de materiais biológicos, como soro [109] e urina [110]. As principais vantagens do LFIA estão relacionadas com a sua resposta rápida, não necessita de equipamento de detecção e fácil manuseio [106]. No entanto, eles têm três limitações importantes: (i) relativamente baixa sensibilidade, (ii) a necessidade do manuseio direto com a amostra, o que pode gerar situação de perigo, especialmente em ambientes de diagnóstico, em que amostras perigosas podem ser manipuladas e (iii) apenas baixos volumes de amostra podem ser processado em cada análise.

Assim, recentemente muitos esforços foram envidados para aumentar a sensibilidade do padrão do LFIA [9, 111]. A sensibilidade do ensaio foi melhorada a partir das abordagens descritas nas referências citadas, mas o problema relacionado com baixos volumes processados ainda precisa ser corrigido. Em virtude disso, novos dispositivos são altamente necessários para a análise de analitos, altamente diluídos, onde o volume das amostras não é uma limitação.

Um exemplo de potencial interesse deste novo tipo de dispositivo de detecção poderia ser a análise do antígeno específico da próstata (PSA), em amostras de urina, como uma ferramenta útil para o diagnóstico de câncer de próstata, sendo este o câncer mais comum na população masculina e a segunda causa mais frequente de morte por câncer em homens [23, 112-116]. A detecção deste marcador biológico na urina tem mostrado especial relevância como uma alternativa para a avaliação de PSA no soro, pois em condições benignas, como a prostatite e hiperplasia benigna da próstata, o PSA no soro pode ser imperfeito e apresentar níveis elevados. Bolduc e colaboradores [112] publicaram que um limiar de PSA urinário > 150 ng/mL pode diminuir o número de biópsias da próstata, a partir de uma coleta totalmente não invasiva.

Neste capítulo, propomos um novo dispositivo, que denominamos de laboratório-em-seringa (do inglês Lab-in-a Syringe – LIS), com base em um simples imunoenensaio de fluxo vertical (VFIA). Neste dispositivo, os componentes do ensaio foram confinados dentro de cartuchos de plástico, que podem ser conectados a uma seringa,

permitindo o processamento de um grande volume de amostra, em uma tentativa de aumentar a sensibilidade do ensaio. Como a maioria dos outros dispositivos baseados em papel, o LIS é fácil e rápido de ser utilizado, uma vez que a leitura pode ser obtida em menos de 15 minutos. Além disso, nós demonstramos o seu potencial de aplicabilidade para a detecção da concentração de PSA clinicamente relevante na urina humana.

Este trabalho foi desenvolvido durante o estágio sanduíche no Instituto Catalão de Nanociência e Nanotecnologia (ICN2) no Campus da Universidade Autônoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona), Espanha, sob a supervisão do professor Dr. Arben Merkoçi e Líder do Grupo de Nanobiossensores & Nanobioeletrônicos. O Prof. Merkoçi é um pesquisador renomado na área de dispositivos e sua pesquisa está focada na concepção e aplicação em biossensores baseados em nanotecnologia e nanociência. Estes biossensores baseiam-se na integração das moléculas biológicas (DNA, anticorpos, células e enzimas) e outros (bio)receptores com micro e nano-estruturas aplicados em diagnósticos, monitoramento e segurança ambiental.

O capítulo está dividido, em três partes distintas. A primeira aborda um estudo, a respeito dos fundamentos teóricos, o qual tem como objetivo, dar ao leitor a base para entender a importância do imunossensor, bem como o motivo pelo qual as nanopartículas são intensivamente utilizadas em biossensoriamento. Foco particular é dado para o sensor baseado na utilização de papel (fluxo lateral) e uma nova abordagem com fluxo vertical por nós proposta, ambos utilizando marcadores ópticos. Em seguida é descrita, detalhadamente a parte experimental, ou seja, os materiais e as técnicas experimentais utilizados, bem como, as condições em que as medidas foram realizadas e caracterizadas. Na última seção deste capítulo são apresentados os resultados, com as respectivas discussões para o desenvolvimento do dispositivo para detecção de proteínas.

3.1 Fundamentos Teóricos

3.1.1 PSA

A próstata é a glândula que faz parte do sistema reprodutor masculino, apresentando aproximadamente o tamanho de uma noz, responsável por produzir o líquido seminal [117]. Ela pode ser acometida pela hiperplasia prostática benigna, câncer de próstata e prostatite, que podem ser rastreados pelo exame de toque retal, e pelo nível elevado de PSA no soro [23, 117].

As causas do câncer da próstata são desconhecidas, mas alguns fatores de risco como histórico familiar da doença, raça, alimentação rica em gordura, e idade (pois, a sua incidência aumenta após os 50 anos), podem favorecer o aparecimento da doença [23, 117].

O toque retal é um método de diagnóstico importante, uma vez que ele pode estimar o volume da próstata indicando desta forma, a possibilidade de neoplasia do órgão, porém é ignorado por muitos homens por causar-lhes constrangimento [117].

O PSA é uma glicoproteína de 33 kDa sintetizada na glândula da próstata [23]. A determinação do PSA no soro humano é um importante teste para o diagnóstico de câncer de próstata [112, 114]. No entanto, o nível de PSA do soro pode ser imperfeito em alguns casos, em particular, em concentrações entre 2,5 ng/mL e 10 ng/mL, não demonstrando especificidade suficiente para ser utilizado como um teste de rastreamento para a detecção do câncer da próstata [112, 113]. Os pacientes com PSA entre estas concentrações elevadas, muitas vezes, passam por biópsia da próstata para descartar a possibilidade de câncer [112].

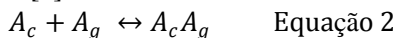
Detecção de câncer a partir de amostras de tecido da próstata por biópsia transretal é uma forma invasiva de diagnóstico. Além disso, as amostras de tecido podem não refletir totalmente a natureza do tumor, e o tecido neoplásico pode ser desperdiçado. Assim, o desenvolvimento de novas alternativas para a detecção do câncer de próstata continua a ser um desafio importante. Os ensaios com base em urina podem ser candidatos atrativos para protocolos de rastreamento em larga escala, com a vantagem de ser um meio não invasivo ao paciente [112, 118].

O primeiro trabalho que relatou a presença de PSA na urina foi publicado em 1985 [112, 118]. Ao longo dos anos, o PSA foi medido em amostras de urina, e alguns trabalhos foram publicados sobre os testes de diagnóstico para câncer de próstata, [112-116]. Stepbate

Bolduc, e colaboradores [112], avaliaram a utilidade do PSA urinário no diagnóstico diferencial entre hiperplasia benigna da próstata e câncer de próstata, especialmente quando o teste de PSA no soro é equívoco. Além disso, eles concluíram que um limiar de PSA urinário > 150 ng/mL pode ser utilizado para diminuir o número de biópsias da próstata. Desta forma, a detecção de PSA urinário pode ser um tipo de ferramenta promissora, em especial na zona cinzenta (entre 2,5 e 10 ng/mL) de PSA no soro.

3.1.2 Anticorpo – Antígeno

Muitos sistemas biológicos estão sendo utilizados como elemento de reconhecimento na elaboração de biossensores, dentre eles estão os anticorpos e os ácidos nucleicos (DNA e RNA). Esses biossensores são baseados em reações imunológicas envolvendo, por exemplo, a forma de reconhecimento do antígeno (A_g) pelo sítio de ligação ao anticorpo (A_c) para formar o complexo anticorpo/antígeno (A_cA_g) na Equação 2 [1]:



A interação entre um antígeno e um anticorpo específico a esse antígeno (e vice-versa) pode ser entendida como um sistema análogo a um princípio chave-fechadura, a partir do qual uma única chave permite a abertura de uma fechadura, de uma maneira altamente específica. Esta importante propriedade dos anticorpos é o segredo para a sua gama de aplicações em biossensores, uma vez que apenas o antígeno específico, que se deseja detectar, em uma determinada amostra (analito de interesse), ajusta-se ao sítio de ligação do anticorpo [3].

Os anticorpos também chamados de imunoglobulinas (Ig) são glicoproteínas de alto peso molecular. Em geral, há cinco classes distintas (IgA, IgG, IgM, IgD, e IgE), que diferem entre si nas seqüências de aminoácidos [119, 120].

A IgG é a classe mais abundante das glicoproteínas (aproximadamente 70%) e na maioria das vezes a mais empregada em técnicas imunoanalíticas [119]. Conforme mostra a Figura 30, a IgG é uma molécula em forma de "Y", constituída por 2 cadeias leves (L) e 2 cadeias pesadas (H), ligadas entre si por pontes de dissulfeto. Ambas as cadeias leves e pesadas são divididas em domínios constantes (C) e variáveis (V). Os domínios variáveis em ambos os tipos de cadeia

constituem o sítio determinante de interação entre o anticorpo-antígeno [119, 120].

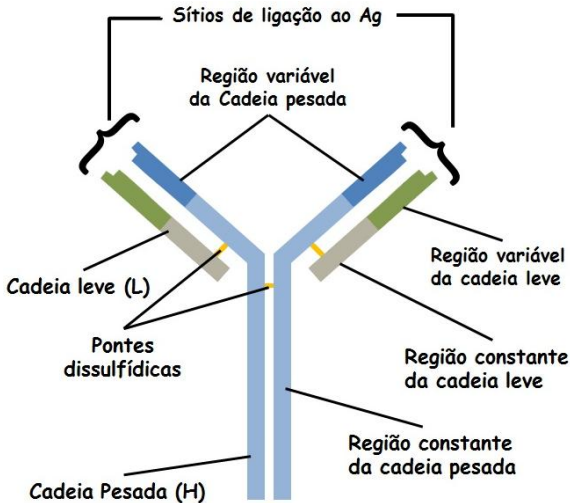


Figura 30: Representação esquemática da molécula de anticorpo.

A detecção de cada antígeno requer a produção de um anticorpo específico. Podem ser usados anticorpos monoclonais ou policlonais. Os primeiros, têm a mesma afinidade, pois são produzidos por um único clone de células produtoras de anticorpo. Os anticorpos policlonais possuem afinidades variáveis e são mais baratos [1]. Dependendo da funcionalidade e da finalidade a ser operada, um ou outro será escolhido.

3.1.3 Imunoensaio de fluxo lateral (LFIA)

Métodos rápidos, sensíveis, de fácil aplicação e leitura dos resultados e de baixo custo para a detecção de proteínas são de enorme interesse no diagnóstico do cotidiano, uma vez que a detecção precoce aumenta as chances de sucesso no tratamento de uma doença, possibilitando salvar muitas vidas. Isto é especialmente importante em locais de baixa renda, com poucos recursos laboratoriais, regiões muito distantes ou em campos de batalha, que são desprovidos de pessoal treinado e qualificado, onde as condições não permitem a utilização de dispositivos complexos, complicados e demorados. Além disso, em países onde as tecnologias mais avançadas, equipamentos sofisticados e

dispendiosos não estão disponíveis para a maioria das pessoas [9, 106, 111].

O LFIA baseado em nanopartículas conjugadas com um elemento de reconhecimento biológico, como anticorpos ou ácidos nucleicos, constituem exemplos de dispositivos promissores a serem utilizados como resposta para essa demanda. Os biossensores de fluxo lateral baseados em papel são excelente exemplo de dispositivos resultantes da sinergia entre a nanomateriais e a tecnologia de biossensoriamento. Eles são acessíveis, pois o papel é um substrato barato e abundante; rápidos e de fácil manuseio, pois em poucos minutos o teste é concluído; sensível e específico, pois são baseados em imunorreações ou hibridizações de ácidos nucleicos; ademais, os resultados podem ser lidos qualitativamente a olho nu, ou por equipamento de baixo custo quando a detecção quantitativa se faz necessária; e finalmente são bastante estáveis em um grande intervalo de temperaturas [9, 106].

Um marco no campo dos biossensores baseado em papel foi a comercialização do teste de gravidez, com base na detecção rápida de HCG, a partir de uma simples adição de urina na tira de teste [9, 19, 106, 111, 121]. Após o teste de gravidez, surgiram no mercado outros dispositivos baseados no LFIA para detecção de drogas (toxicod dependência), marcadores cardíacos, agentes patogênicos e outras doenças infecciosas [25, 106].

Os LFIA possuem todos os reagentes pré-armazeados em uma tira [106]. O imunoenensaio baseia-se no reconhecimento de um analito de interesse, como proteínas, por exemplo, a partir da utilização de anticorpos, podendo ser operado em um formato sanduíche ou competitivo [9]. A resposta é visualizada utilizando o marcador apropriado, sendo as AuNPs um dos mais amplamente requisitados. O tempo de análise curto dos resultados diretamente a olho nu a partir do acúmulo da partícula detectora de sinal na zona de detecção, assegura a conveniência de se realizar os testes colorimétricos no local [19, 106 111].

Neste contexto, os LFIA baseados em AuNPs, permitem uma operação fácil e rápida, sem a manipulação de reagentes tóxicos, proporcionando meios atrativos para o desenvolvimento de biossensores [19].

3.1.3.1 Princípio básico

O LFIA consiste geralmente de 4 partes diferentes: o *sample pad*, o *conjugation pad*, o *detection pad* e o *absorbent pad* [20, 25, 106]. Feito de celulose, o *sample pad* tem o papel de aceitar a amostra, filtrá-la de impurezas e armazenar o tampão de ensaio seco, garantindo as condições ideais durante o fluxo. O *conjugation pad*, geralmente feito de fibra de vidro, é utilizado para armazenar o reagente seco do ensaio, que contém o indicador do sinal (por exemplo, as AuNPs). A solução do conjugado é colocada em um estado desidratado na membrana, e liberada de forma eficiente quando o ensaio está sendo executado. No *detection pad*, os reagentes de captura são imobilizados sobre a membrana, frequentemente de nitrocelulose, para obter a zona de controle e de teste. É neste *pad* que o sinal é desenvolvido. O *absorbent pad* tem o papel de reter todo o líquido adicionado na tira, concentrando-o na região do *absorbent pad* durante o ensaio. Normalmente, o material da membrana nesse *pad* consiste de celulose [20, 27, 106]. Ver esquema na Figura 31.

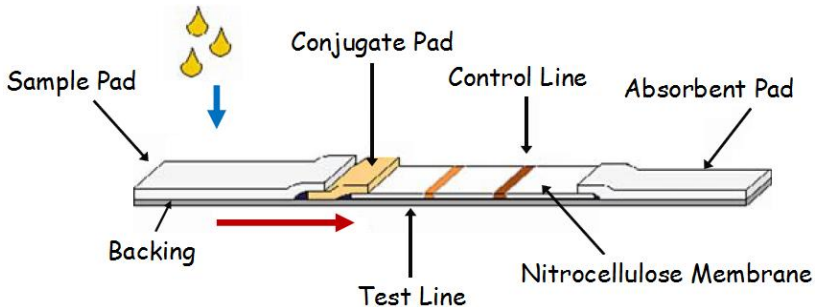


Figura 31: Esquema ilustrativo do método de LFIA [20].

Para garantir uma boa confiabilidade no desenvolvimento de um teste LFIA, torna-se importante a escolha cuidadosa de alguns parâmetros, como: a partícula indicadora do sinal; a qualidade do anticorpo; a concentração e pH ideal de anticorpo para conjugação com a partícula detectora; e o material da membrana.

A membrana de nitrocelulose é, provavelmente, a parte mais importante utilizada em uma tira de teste de fluxo lateral. Ela serve como superfície de ligação e imobilização para os anticorpos de captura, nas linhas de teste e controle; é a superfície onde o complexo anticorpo-antígeno é formado; é a superfície a partir da qual o sinal é detectado

visualmente; e também controla o fluxo capilar da fase móvel [20, 27, 122].

A taxa de fluxo capilar é a velocidade (distância percorrida por unidade de tempo) com que a amostra se move ao longo da tira, após a sua introdução no *sample pad*. No entanto, a taxa de fluxo é difícil de medir com precisão, uma vez que a taxa decaí exponencialmente à medida que o fluido se difunde ao longo da membrana. O tempo de fluxo capilar é um parâmetro mais fácil de medir. Ele é definido como o tempo necessário para que o líquido se mova ao longo da membrana e preencha completamente uma tira de comprimento definido, e é expresso em segundo por centímetro [20, 122].

A Millipore [122] fabrica uma gama de membranas *Hi-Flow Plus* (HF) especificamente projetadas para uso em imunoenaios de fluxo lateral. A taxa de fluxo capilar está relacionado a rapidez com que o teste é executado, com a sensibilidade do sistema de detecção, e com o tamanho dos poros [20, 122, 123]. Conhecer e entender a relação entre esses parâmetros permite que seja selecionada a membrana apropriada para o desenvolvimento do teste do LFIA. Por exemplo, a Millipore oferece a membrana HF 075, de taxa de fluxo rápido, para testes onde a velocidade do ensaio é fundamental, e a sensibilidade não é um fator relevante [122]. Para essas membranas com menor tempo de fluxo capilar, os tamanhos dos poros são maiores e variam de 12-17 μm [123]. No outro extremo, a membrana HF 240, com taxa de fluxo mais lenta, é recomendada para testes em que a velocidade é menos importante, ou alta sensibilidade é necessária para o desenvolvimento do ensaio [122]. Para essas membranas com maior tempo de fluxo capilar, os tamanhos dos poros são menores (3 a 5 μm) [123]. Existe também, a membrana HF 180, que é mais adequada para ensaios onde vários parâmetros são importantes, como a velocidade e a sensibilidade [122]. Nesta última, os tamanhos dos poros (5 a 8 μm) são maiores que a membrana 240 e menores que a 075 [123].

3.1.3.2 Formatos dos LFIA

O LFIA é baseado no reconhecimento de um analito de interesse através da utilização principalmente de anticorpos [27]. Vários formatos foram descritos para LFIA, mas destacamos os dois mais utilizados: o ensaio competitivo e o sanduíche. Estes formatos são escolhidos dependendo da substância que se deseja analisar.

Os conceitos apresentados a seguir para os formatos do LFIA foram baseados nas referências [19, 21, 27, 121, 124-126].

Quando o analito é de baixa massa molecular, como no caso da maioria das toxinas, imunoenaios em um formato competitivo são mais adequados [21]. Os mesmos princípios utilizados nos imunoenaios do tipo microplaca podem ser aplicados no teste LFIA, com exceção de que a interação entre os reagentes e as imunorreações ocorrem sobre um suporte adequado (membrana) e por meio de um fluxo lateral, além disso, não é necessário etapas de lavagem. Existem duas abordagens com base no formato competitivo: o formato competitivo indireto (em que o antígeno é revestido sobre a membrana e o anticorpo é marcado, Figura 32) e o formato direto (onde o antígeno é marcado e o anticorpo é revestido sobre a membrana, Figura 34) [21].

Os princípios do ensaio imunocromatográfico competitivo indireto estão representados esquematicamente na Figura 32. Resumidamente: são imobilizados previamente sobre a membrana de detecção o antígeno-marcado (com uma proteína), e o anticorpo anti-espécie (branco), como zona de teste e a zona de controle, respectivamente. Os conjugados são formados por anticorpos específicos (anticorpos anti-toxinas, preto), e anticorpos não-específicos (cinza), ambos marcados com AuNPs. No desenvolvimento do ensaio, o anticorpo-específico marcado com AuNPs é liberado a partir da amostra líquida e flui através da membrana, até atingir a zona de detecção, interagindo primeiramente com o antígeno-marcado, revestido na zona de teste. Na ausência do analito (toxina livre) na amostra (amostra negativa, Figura 32 (A)), os antígenos (conjugado com a proteína) na zona de teste capturam os anticorpos-específicos funcionalizados com AuNPs de modo que uma linha visível é formada. Normalmente, uma segunda linha visível chamada "linha de controle" é formada pela interação entre os anticorpos anti-espécies e os anticorpos não-específicos. A linha de controle confirma o desenvolvimento adequado do ensaio, indicando a integridade dos reagentes e o funcionamento correto do dispositivo. Quando o analito está presente na amostra, acima da mais baixa concentração detectável, ou seja, no limite de detecção (amostra positiva, Figura 32 (B)), os sítios de ligação para os anticorpos-específicos marcados com AuNPs são saturados a partir da ligação com a toxina livre na amostra e impedem o mesmo de ligar-se ao antígeno-marcado revestido da zona de teste, resultando no desaparecimento da linha de teste [21].

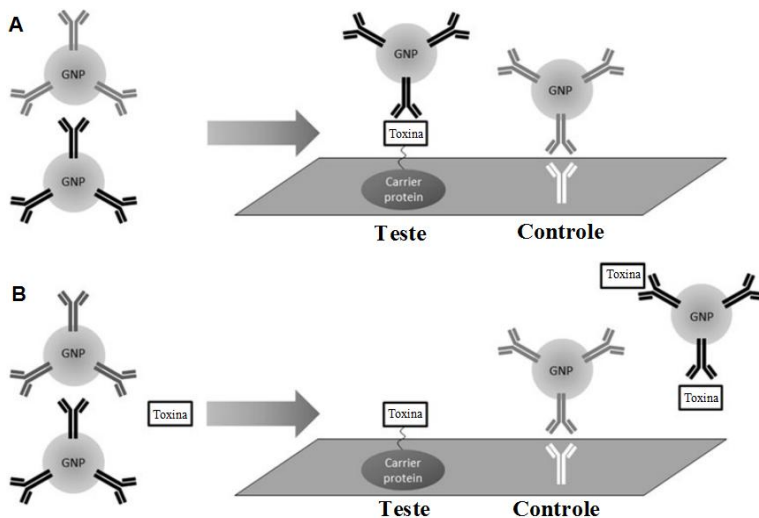


Figura 32: Diagrama esquemático de um imunoensaio de fluxo lateral no formato competitivo indireto: (A) na ausência do analito (toxina livre na amostra); e (B) analito presente na amostra [21].

A interpretação dos resultados do ensaio competitivo é realizada a partir da observação da intensidade de cor gerada na linha de teste e de controle, como representado na Figura 33. Assim, para ambas as linhas de controle e teste intensas: o teste é considerado válido e a amostra negativa (analito (toxina livre) abaixo do limite de detecção); linha de controle intensa e linha de teste pouco intensa: válido, a quantidade da toxina está perto do limite de detecção; linha de controle intensa e ausência da linha de teste: válido, amostra positiva (toxina dentro do limite de detecção); ausência da linha de controle e linha de teste intensa ou desaparecendo: teste inválido [124].

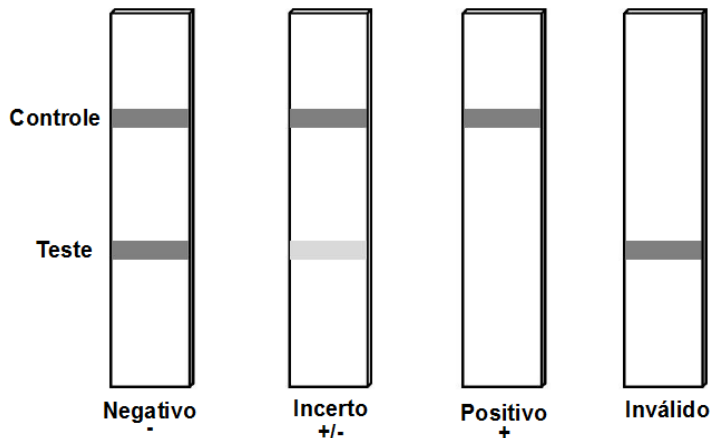


Figura 33: Interpretação dos resultados do ensaio de fluxo lateral no formato competitivo [124].

Os princípios do ensaio imunocromatográfico competitivo direto estão representados esquematicamente na Figura 34. Resumidamente, o anticorpo específico ao analito é imobilizado sobre a zona de teste (preto) e a zona de controle é formada por um segundo anticorpo que não é específico ao analito (branco) ou por um ligante, por exemplo, estreptavidina. No *conjugate pad*, parte das AuNPs são funcionalizadas com o analito ligado a uma proteína (formando o conjugado AuNPs/analito-proteína) e outra parte com o par do segundo ligante, por exemplo, um antígeno não específico (formando o conjugado AuNPs/anígeno-qualquer) ou biotina (formando o conjugado AuNPs/Biotina). O par formado pelo complexo AuNPs/biotina-estreptavidina, por exemplo, garante o desenvolvimento da cor vermelha, causada pelo acúmulo de AuNPs na zona de controle, independente da presença ou ausência de analito livre na amostra e independentemente do que acontece na zona de teste. Na ausência de analito livre na amostra, os anticorpos específicos revestidos na zona de teste capturam o conjugado AuNPs/analito-proteína e uma elevada intensidade de cor poderá ser observada (Figura (A)). Se o analito estiver presente na amostra, o analito livre e analito-marcado (conjugado AuNPs/analito-proteína) competirão por sítios de ligação do anticorpo específico na linha de teste e, assim, pode ocorrer a inibição de cor nesta zona (Figura (B)) [21].

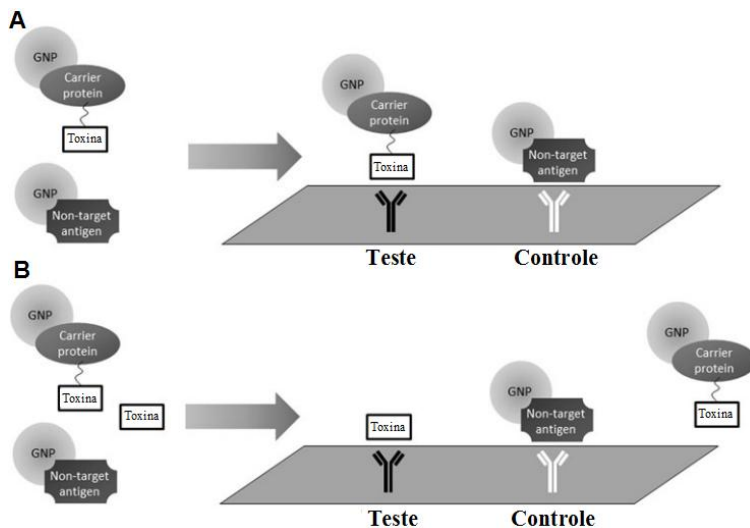


Figura 34: Representação esquemática do imunoenensaio de fluxo lateral no formato competitivo, em que o antígeno é marcado e o anticorpo é revestido sobre a membrana [21].

Portanto, o LFIA no formato competitivo a resposta está inversamente correlacionada com a concentração do analito (ou seja, quanto mais analito presente na amostra, pouco ou nenhum sinal é observado na zona de teste e na ausência de analito o sinal obtido é intenso) [27].

Por outro lado, o formato sanduíche é utilizado para detectar analitos grandes, com múltiplos sítios de ligação [20, 126], como, HCG [19, 22], PSA [23] e HgG [9]. O teste é composto de dois anticorpos específicos que podem se ligar ao analito alvo: um anticorpo que é conjugado com as nanopartículas de ouro (formando o conjugado: AuNPs/anticorpo), e um anticorpo de captura. O conjugado AuNPs/anticorpo é depositado sobre a fibra de vidro no *conjugate pad* para servir como o reagente de detecção, capaz de gerar uma reação colorimétrica; o anticorpo de captura é imobilizado na zona de teste da membrana de nitrocelulose (NC). Um terceiro anticorpo (anti-anticorpo), que é específico ao anticorpo conjugado com as AuNPs, mas inespecífico ao analito, pode ser imobilizado na membrana de NC como zona de controle. Quando a solução da amostra é aplicada ao *sample pad*, ela migra pela força capilar e hidrata o conjugado

AuNPs/anticorpo, no *conjugation pad*, que é então, liberado. Em seguida, a ligação entre o conjugado AuNPs/anticorpo e o analito acontece. Subsequentemente, o complexo formado (AuNPs/anticorpo-analito) migra até a extremidade da tira, que contém as duas zonas de detecção. Na zona de teste, os anticorpos, específico ao analito, capturam o complexo AuNPs/anticorpo-analito. Após a reação, a cor vermelha causada pelo acúmulo de AuNPs, aparece na zona teste. Portanto, um ensaio do tipo sanduíche é formado entre o conjugado AuNPs/anticorpo, o analito e o anticorpo de captura imobilizado na membrana de NC. O excesso de conjugado AuNPs/anticorpo é capturado pelo anticorpo (anti-anticorpo) imobilizado na zona de controle. O sinal de cor gerado pela reação pode ser lida de maneira qualitativa e quantitativa, em aproximadamente 20 minutos após a introdução da amostra no *sample pad* [19, 121, 125].

A ilustração esquemática está representada na Figura 35.

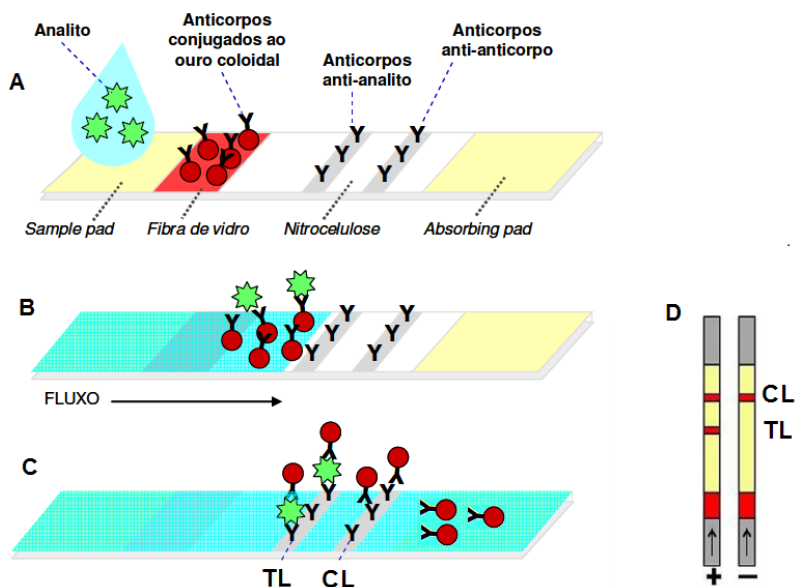


Figura 35: Ilustração esquemática da configuração de tira de teste de fluxo lateral no formato sanduíche: (A) a amostra contendo analito é aplicada ao *sample pad*; (B) o analito se liga aos anticorpos no *conjugation pad* e o migram ao longo da membrana de NC por ação capilar; (C) o complexo AuNPs/anticorpo-analito formado é capturado pelo anticorpo imobilizado na linha de teste e o excesso de conjugado AuNPs/anticorpo continuam a

migrar até o *absorbent pad*; (D) Interpretação do resultado do teste: Resultado Positivo – Na presença de analito na amostra o desenvolvimento da cor vermelha aparece em ambas as linhas de teste e controle. Resultado Negativo – Na ausência de analito na amostra, somente ocorre desenvolvimento de cor vermelha na linha de controle (CL), mostrando que o teste funcionou adequadamente [125, e adaptado de 127].

Portanto, no formato de sanduíche, a presença do analito na amostra gera duas linhas na tira (teste e controle), confirmando um resultado positivo, e na ausência de analito, apenas a linha de controle aparece, comprovando um resultado negativo. A intensidade da cor na linha de teste é diretamente proporcional à quantidade de analito presente na amostra [27, 126].

3.1.4 Nanopartículas de Ouro (AuNPs) ou ouro coloidal

O uso de colóides metálicos para fins decorativos, já era conhecido na Idade Média: por exemplo, soluções de nanopartículas de ouro (Au) e prata (Ag) eram empregadas na fabricação de vitrais coloridos nas igrejas [128]. Outro exemplo conhecido de um material de vidro composto com nanopartículas de Au e Ag é o copo de *Lycurgus*, obra do Império Romano exposta no Museu Britânico, em Londres. O copo tem tonalidade verde ao ser visualizado por reflexão da luz e sua cor muda para vermelho quando observado por transmissão. É a presença de pequenos cristais de metal (~70 nm) contendo Au e Ag que dá ao copo de *Lycurgus* sua exibição de cores diferenciada [128-130].

As cores intensas das NPs metálicas são um exemplo das suas propriedades ópticas que surgem a partir de sua interação com a radiação eletromagnética. Essas propriedades são observadas no Au devido à presença de elétrons livres. Quando a luz interage com as AuNPs induzindo uma excitação em uma frequência particular, ela causa uma oscilação coletiva coerente dos elétrons livres. Este processo é conhecido como a ressonância de plasmon localizado de superfície (LSPR) [131].

As cores das nanopartículas metálicas dependem do seu tamanho, forma, e de seu estabilizante. As AuNPs exibem fortes absorções na região visível do espectro eletromagnético, com origem em suas propriedades de ressonância de plasmons de superfície. Essas propriedades fazem das AuNPs ferramentas muito úteis no diagnóstico,

uma vez que a cor dos colóides é diretamente visível a olho nu, sendo de fundamental interesse para o teste rápido [28].

3.1.4.1 Síntese de AuNPs

A revisão a seguir foi embasada na referência [132].

Michael Faraday, em 1857, foi o primeiro a relatar cientificamente sobre a preparação e as propriedades ópticas do ouro coloidal [20, 129]. Faraday, estudando a síntese e as cores do ouro coloidal, obteve uma suspensão coloidal, vermelha, reduzindo cloreto de ouro por fósforo em uma mistura bifásica de dissulfeto de carbono em água ($\text{CS}_2/\text{H}_2\text{O}$) [129, 130, 132]. Desde esse estudo pioneiro, uma ampla gama de trabalhos científicos foram publicados sobre a síntese de AuNPs utilizando diferentes solventes orgânicos ou aquosos, e a partir deste, diversas rotas de síntese foram desenvolvidas visando a obtenção de AuNPs monodispersas, com tamanhos e formas bem definidas e na dimensão desejada [130, 132]. Em 1951 Turkevich [133], sintetizou AuNPs pela redução de HAuCl_4 com citrato trissódico, em técnica que foi refinada por Frens em 1973. Em 1994, Brust e colaboradores [134] desenvolveram o método bifásico (água-tolueno) usando tiol para estabilizar as nanopartículas de ouro, e mostraram através de imagem obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) a obtenção de nanopartículas com tamanho reduzido (1-3 nm) e com distribuição de tamanhos de partícula entre 2,0-2,5 nm [132, 134].

Os métodos de síntese geralmente baseiam-se na redução de sal de ouro pela adição de um agente redutor e um estabilizante. O método de redução de citrato é um dos mais populares devido às suas vantagens: redutor de baixo custo e utilização de água como solvente, o que elenca no campo da química verde [135].

3.1.4.1.1 Síntese por citrato

O mecanismo de reação responsável pela formação das AuNPs, durante a síntese, em uma redução típica por citrato, é dependente da concentração dos íons de citrato ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$), cloreto de ouro (HAuCl_4), e da temperatura [126]. Neste método, além de atuar como redutor, o citrato também fornece estabilidade às nanopartículas de ouro devido a sua carga negativa, o que faz com que as nanopartículas se repilam umas às outras [126, 132].

O método de Turkevich [133] é um dos métodos relatados para obtenção de AuNPs baseado em uma simples redução do sal de ouro por citrato em solvente aquoso [132]. No método padrão, a solução de ácido cloroaurico é aquecida até atingir o ponto de ebulição, com boa agitação mecânica, quando então o citrato trissódico é adicionado rapidamente, sob agitação constante. Após alguns minutos, a suspensão coloidal com cor de vinho tinto é obtida. As imagens de TEM mostraram que a amostra é composta por AuNPs esféricas, e o histograma de distribuição do diâmetro obtido contando cerca de 1046 partículas apresentou um diâmetro predominante de 20 nm [133].

Em 1973, Frens [136] publicou algumas alterações no método de Turkevich. Controlando a razão Au: citrato trissódico em seis suspensões de ouro, ele obteve como resultado, AuNPs com diâmetros de 16 nm a 150 nm. A distribuição de tamanho para todas as seis suspensões de nanopartículas pode ser observada a partir das imagens registradas no TEM [136].

Nos últimos anos, vários grupos de pesquisa revisitaram os métodos Turkevich-Frens, almejando obter um mecanismo conveniente para formação das AuNPs. Por exemplo, determinou-se que tamanhos menores de AuNPs podem ser obtidas quando se utiliza concentrações mais elevadas de citrato, uma vez que a estabilização ocorre mais rapidamente, enquanto que uma baixa concentração de citrato gera AuNPs maiores e causam sua agregação. Em 2010, Puentes e colaboradores [137] prepararam AuNPs por redução de citrato, utilizando óxido de deutério (D_2O) como solvente em vez de água (H_2O) e obtiveram AuNPs com tamanhos menores, que justificaram como consequência de uma redução mais rápida [132, 137].

3.1.4.2 Conjugados de ouro coloidal

Ao contrário do ouro metálico, que na sua forma mássica (macroscópico) apresenta cor amarelada, a cor do ouro coloidal varia quando ele atinge dimensão nanométrica. Por exemplo, as nanopartículas esféricas de ouro com aproximadamente 10 - 40 nm apresentam intensa coloração vermelha [28, 128, 138].

Para evitar que as nanopartículas de ouro se agreguem (processo pelo qual duas ou mais nanopartículas se agrupam formando aglomerados) é fundamental a presença de uma camada de estabilizante, garantindo que as AuNps se mantenham estáveis e dispersas na

suspensão coloidal [138]. No entanto, na presença de eletrólitos, tais como cloreto de sódio, a carga superficial do colóide é blindada, diminuindo a força de repulsão eletrostática entre elas. As forças atrativas se tornam dominantes e como resultado, as partículas de ouro se agregam [20, 28]. Este fenômeno pode ser visualizado através da observação da cor, como mostra a Figura 36.

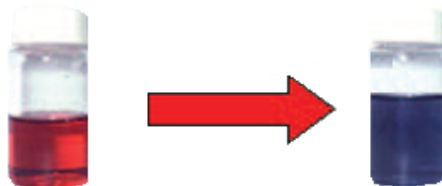


Figura 36: Mudança na coloração de uma suspensão de nanopartículas devido ao processo de agregação [138].

A agregação das nanopartículas, ou seja, a perda da estabilidade é geralmente, acompanhada pela alteração de cor na suspensão coloidal [138]. Por exemplo, em uma suspensão com AuNPs de 40 nm, a cor das NPs muda de vermelho para azul quando agregadas [28]. Além disso, à medida que o tamanho das partículas do ouro coloidal aumenta, elas se tornam mais propensas à agregação, assim como acontece com a sua sensibilidade aos sais [28].

Quando ocorre a agregação das nanopartículas, os comprimentos de onda da luz absorvida mudam, e a agregação é reconhecida pelo deslocamento da banda de plasmons para comprimento de onda mais elevado, ou seja, para regiões de menor energia. A Figura 37 exibe os espectros de absorção registrados por Toma e Bonifácio antes e após o processo de agregação de nanopartículas [138].

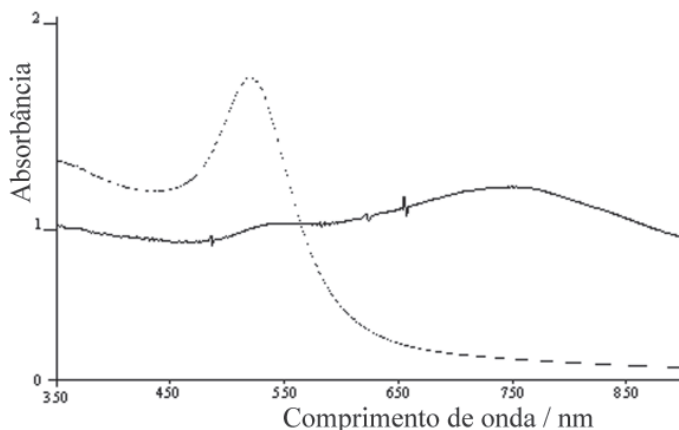


Figura 37: Espectros de absorção de suspensões de nanopartículas de ouro antes (linha pontilhada) e após (linha contínua) o processo de agregação [138].

Algumas proteínas, por exemplo, anticorpos podem adsorver fortemente à superfície das AuNPs, mantendo suas propriedades biológicas e formando conjugados estáveis [27, 28]. A interação entre proteínas e as AuNPs é fundamentada em três fenômenos separados, mas dependentes: (A) de interação iônica entre a superfície das AuNPs carregadas negativamente e os sítios carregados positivamente na proteína; (B) atração hidrofóbica entre a proteína e a superfície do metal; (C) ligação dativa entre o metal (elétrons de condução do ouro) e os átomos de enxofre, presentes nos aminoácidos da proteína (Figura 38) [28, 139].

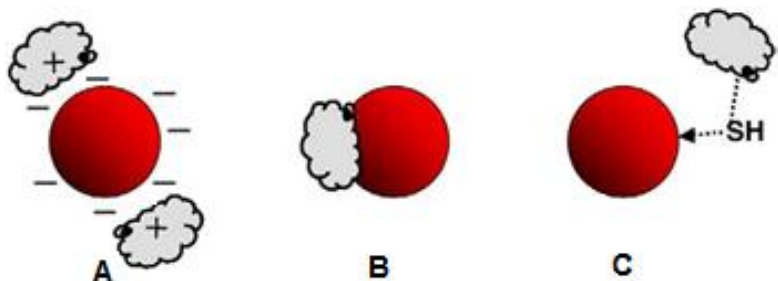


Figura 38: Imagem esquemática da adsorção de proteínas sobre colóides de ouro [28].

Quando uma concentração suficiente de proteína é adsorvida sobre a superfície das AuNPs, mesmo que seja na presença de uma solução com elevado teor de sal, as nanopartículas não se tornam sujeitas à agregação, uma vez que a presença da proteína ajuda a evitar a aglomeração das nanopartículas, pois inibe a ligação com outras partículas de ouro [28]. Esta é uma excelente ferramenta para determinar se o colóide foi apropriadamente protegido. Durante a conjugação entre o ouro coloidal e a proteína, o valor de pH em que não ocorre a agregação será o pH ideal para a estabilização das AuNPs [20]. A condição ideal de pH, bem como a quantidade mínima de proteína necessária para a estabilização das AuNPs pode ser determinada a partir do estudo conhecido como teste de agregação (GAT) e está representado na Figura 39.

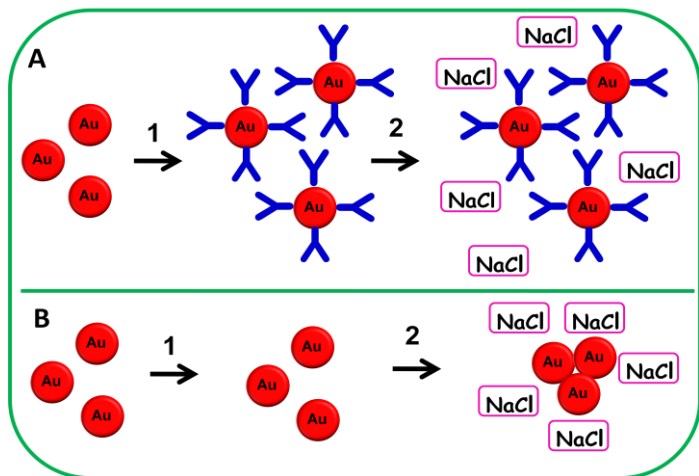


Figura 39: Teste de agregação das nanopartículas de ouro: Na presença de uma concentração suficiente de proteína no conjugado (A) e na ausência de proteína (B).

O teste de agregação ocorre em duas etapas: Na primeira etapa, representada na Figura 39 por (1) são incubadas diferentes concentrações de anticorpos com um volume constante de AuNPs em (A), e um teste de controle na ausência de anticorpo é realizado (B). Normalmente os testes são realizados em duplicata ou triplicata. Em uma próxima etapa, representada por (2), uma grande quantidade de cloreto de sódio (aproximadamente 10%) é adicionado em (A) e (B), e a

ocorrência de agregação é determinada visualmente. Neste contexto, a concentração de proteína que é considerada adequada para estabilizar as AuNPs, é correspondente a quantidade mínima de proteína que é capaz de evitar a agregação das nanopartículas [20].

O NaCl serve para deslocar as cargas superficiais sobre as AuNPs, isso conduz a agregação das nanopartículas, como representado pelo item (B) da Figura 39. No entanto, quando a superfície das AuNPs estão revestidas com uma concentração suficiente de anticorpos, como representado pelo item (A) na Figura 39, a agregação não ocorre, uma vez que o NaCl não pode quebrar a ligação Au – S [29].

A preparação do conjugado para utilização no teste imunocromatográfico pode ser realizado a partir da marcação de anticorpos com quaisquer nanopartículas que possua propriedades espectroscopicamente detectável, por exemplo, as nanopartículas coloridas ou fluorescentes. No entanto, as AuNPs são geralmente escolhidas, devido a conjugação ser facilmente obtida por uma simples mistura dos dois componentes, ademais existe um grande número de protocolos e uma ampla literatura disponível sobre este tema [20, 27, 124].

Uma desvantagem importante da interação entre AuNPs e proteínas são as rotulagens não-específicas ou indesejadas que podem ocorrer mediante a adsorção de nanopartículas sobre outros componentes do sistema. Portanto, é necessário que os conjugados também sejam estabilizados com uma macromolécula inerte, por exemplo, a albumina do soro bovino (BSA), que é uma das proteínas mais frequentemente empregadas para tal finalidade [28].

Uma solução de conjugado AuNPs/anticorpo, em que as propriedades ópticas das AuNPs e a atividade biológica da proteína são mantidas após a sua preparação e estabilização, é de grande importância para se obter um ótimo desempenho dos dispositivos baseados no LFIA [28].

3.1.4.3 AuNPs no ensaio de fluxo lateral

As nanopartículas conjugadas com anticorpos vêm sendo amplamente utilizadas como marcadores em muitos testes imunocromatográficos de fluxo lateral, para determinar uma ampla variedade de analitos [27, 140, 141]. Os marcadores são fundamentais para o teste LFIA, porque a cor visível na zona de detecção é gerada pela

acumulação desses reagentes detectores coloridos ou fluorescentes, uma vez que na ausência dos mesmos, a ligação entre o anticorpo específico e o antígeno seria difícil visualizar [20, 140]. Também é fundamental que o marcador utilizado possua dimensões adequadas com relação a estrutura que a membrana possa suportar, por exemplo, que se ajuste ao tamanho dos poros da membrana, para permitir um fluxo acessível ao longo da mesma. Além disso, é importante que o marcador seja simples de detectar, manusear e utilizar, pois os testes de fluxo lateral precisam ser ferramentas de diagnósticos rápidos e de baixo custo [26, 140]. Portanto, para o desenvolvimento bem sucedido do LFIA o tipo de detector é muito importante. Como mencionado anteriormente, o ouro coloidal é talvez um dos marcadores mais utilizado em ensaios de fluxo lateral, mas as partículas coloridas de látex [142] e partículas fluorescentes, tais como pontos quânticos (*quantum dots*) [141], também podem ser utilizadas [27, 106, 140].

As AuNPs apresentam muitas propriedades que fazem delas excelentes marcadores, pois não são tóxicas; a cor é intensa; são excelentes candidatas para funcionalização devido a fácil manipulação e o baixo custo de preparar em laboratório; possuem um longo período de conservação de suas propriedades ópticas; a distribuição de tamanho é facilmente controlável; e a excelente compatibilidade com moléculas biológicas, dentre elas: anticorpos, antígenos, proteínas, e ácidos nucleicos [20, 28, 106, 126, 140, 143]. Como resultado destas características, AuNPs são marcadores adequados para monitorar facilmente as reações anticorpo-antígeno num LFIA.

Neste contexto, ao longo dos últimos anos, as AuNPs tem proporcionado grande interesse para a preparação de biossensores baseados no LFIA para o seu uso em diagnósticos [126, 143]. Aqui nós tentamos resumir alguns exemplos do que vem sendo utilizado.

Preechakasedkit e colaboradores [143] desenvolveram um LFIA baseado em imunoensaio sanduíche com AuNPs para a detecção de *Salmonella typhi* (*S. typhi*) no soro humano. Os resultados do teste mostraram que apenas um ponto vermelho apareceu na zona de controle para teste negativo (*running buffer* sem *S. typhi*), enquanto que os teste positivos (*running buffer* com *S. typhi*) formaram pontos vermelhos, ambos na zona de teste e de controle sobre a membrana de nitrocelulose (Figura 40 (A)). A capacidade de detectar a *S. typhi* foi avaliada para concentrações entre $1,14 \times 10^3$ cfu/mL e $1,14 \times 10^8$ cfu/mL, como ilustrados Figura 40 (B)). O Limite de detecção (LOD) alcançado pelos autores foi de $1,14 \times 10^5$ ufc/mL nos primeiros 15 minutos. Este método

proposto também foi aplicado com sucesso na detecção de *S. typhi* spiked (adicionado) em soro humano e dentro de 15 minutos, utilizando uma única etapa obtiveram precisão e especificidade de 100%.

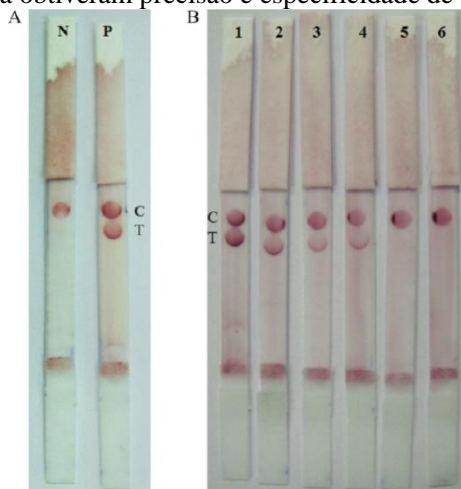


Figura 40: (A) Resultado do teste imunocromatográfico sanduíche para *S. typhi*. Onde C: ponto de controle; T: ponto de teste; N: resultado negativo (0,0 cfu/mL of *S. typhi*); P: resultado positivo ($1,14 \times 10^8$ cfu/mL de *S. typhi*). (B) Concentrações de *S. typhi* adicionadas na tira de teste [143].

Trabalhos, visando aumentar a sensibilidade do LFIA também são descritos. Um deles foi proposto por Tanaka e colaboradores [22], que relataram um ensaio imunocromatográfico do tipo sanduíche baseado em um intensificador de sinal, construído com AuNPs como reagente de marcação, com sensibilidade maior do que os testes convencionais. O LOD para o ensaio de HCG foi de 1 pg/mL em PBS e 10 pg/mL em adicionados em soro humano. Com este método a determinação da proteína pode ser concluída em menos de 15 minutos.

Um mecanismo diferente de reforço foi proposto Parolo e colaboradores [9], que utilizaram um imunoenensaio sanduíche de fluxo lateral com AuNPs funcionalizados com um anticorpo já modificado com marcadores enzimáticos HRP para a detecção, utilizando como proteína modelo, IgG humano. Neste contexto, as AuNPs são utilizadas como marcadores, bem como portadores de marcadores enzimáticos. Assim, os LFIA por eles desenvolvidos oferecem duas alternativas de detecção diferentes: uma produzida apenas pela cor vermelha das

AuNPs atingindo um LOD de 6 ng/mL de HIgG e outra, mais sensível, produzida pelo substrato da enzima HRP alcançando um LOD de 200 pg/mL.

Um outro mecanismo diferente de reforço foi proposto por Choi e colaboradores [144], combinando duas AuNPs de tamanhos diferentes, em um mesmo ensaio sanduíche, utilizando dois conjugados AuNPs-anticorpo para detectar a troponina I, em 10 minutos, com um LOD de 10 pg/mL (Figura 41 (B)) em amostras de soro de pacientes com infarto do miocárdio.

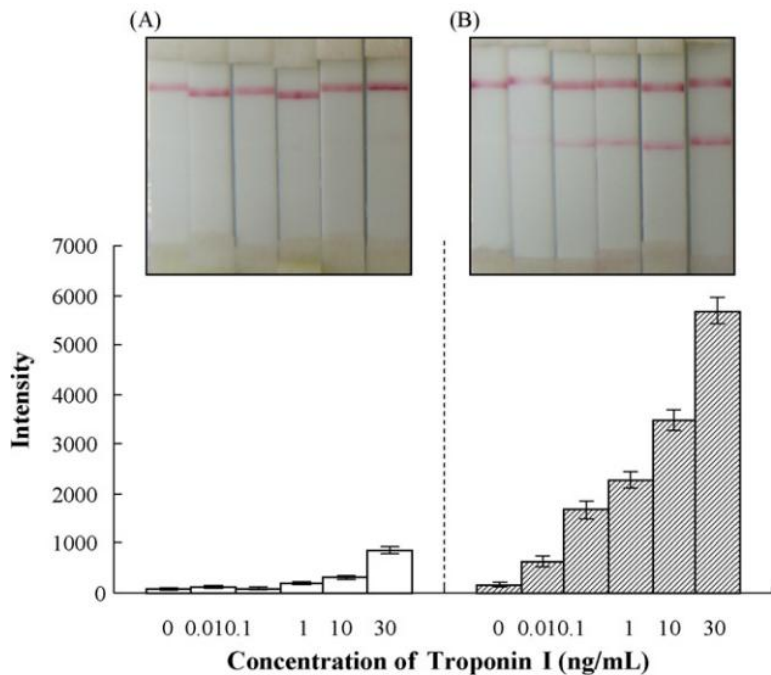


Figura 41: Detecção de a troponina I, com concentrações variáveis de LFA (A) convencional e (B) a LFA baseado no conjugado duplo de AuNP. No caso de (A), o tamanho de AuNP foi de 10 nm. No caso de (B), as dimensões da primeira e segunda AuNP foram de 10 e 40 nm, respectivamente [144].

O trabalho seguinte é baseado também no formato sanduíche, mas ao invés de utilizar anticorpos, os autores utilizam aptâmeros ou sequência de DNA. XU e colaboradores [145], detectou *Thrombin* (que desempenha um papel essencial no sistema de coagulação) em plasma

humano, alcançando LOD de 2,5 nM, utilizando um LFIA baseado no uso de aptâmeros combinados com AuNPs. Eles demonstraram que aptâmeros são equivalentes ou superiores a anticorpos em termos de especificidade e sensibilidade para detecção de *Thrombin*.

3.1.5 LIS – VFIA

Como apresentado na introdução, o LFIA apresenta muitas vantagens como dispositivos para a detecção de muitos analitos, tal como proteínas. Porém algumas desvantagens, como por exemplo, a sensibilidade dos dispositivos, ainda precisa ser melhorada. Assim, muitos esforços, bem como, novos dispositivos capazes de suprir estas limitações são necessários. Na seção 3.1.4.3 foram apresentados alguns trabalhos encontrados na literatura, em que os autores focaram no melhoramento e intensificação da sensibilidade perante o método convencional. No entanto, estes dispositivos ainda apresentam uma quantidade limitada de amostra de aproximadamente 200 μL .

Neste contexto, nós desenvolvemos um novo dispositivo que denominamos de laboratório-em-seringa (LIS) com base em um simples imunoensaio de fluxo de vertical (VFIA), em vez de fluxo lateral, utilizando nanopartículas de ouro. O LIS representa um dispositivo de diagnóstico muito simples e fácil de utilizar, com interesse especial para operar grandes volumes de amostras, aumentando deste modo a sensibilidade do ensaio. Neste dispositivo o *conjugate pad* e o *sample pad* foram confinados dentro de cartuchos de plástico, que podem ser conectados com uma seringa. O princípio básico do LIS foi baseado no ensaio sanduíche, que na presença de um antígeno, o complexo é formado entre o anticorpo de detecção conjugado com as AuNPs e o anticorpo de captura imobilizado na membrana de nitrocelulose (ver Figura 42). Como a maioria dos outros dispositivos baseados em papel, o LIS é fácil e rápido de ser utilizado, uma vez que a leitura pode ser obtida em menos de 15 minutos. O seu funcionamento eficiente para HIgG, bem como para o PSA, mostrou atingir um limite de detecção de 1,1 ng/mL e 1,9 ng/mL, respectivamente. Para outras aplicações, dependendo dos limites de detecção, este LIS pode ser utilizado no diagnóstico de campo ou em laboratórios de pesquisa.

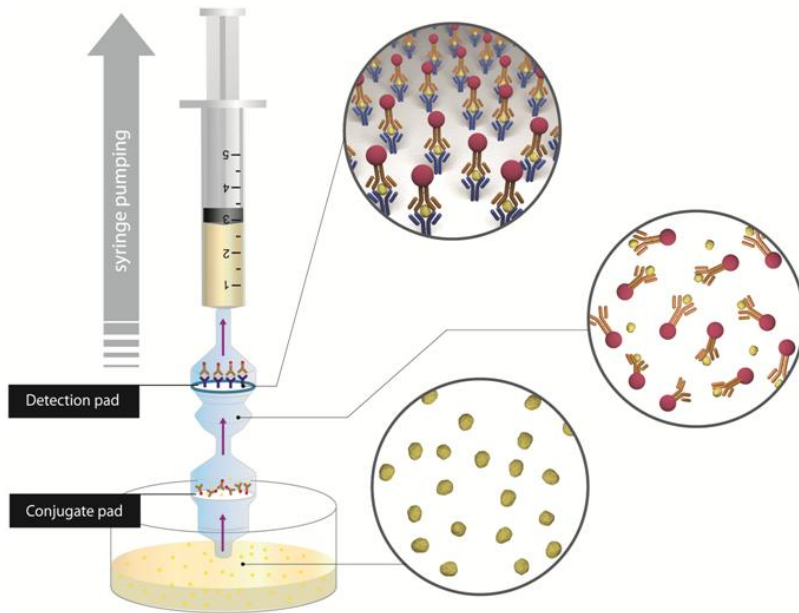


Figura 42: Princípio de funcionamento do *lab-in-a syringe* (LIS) baseado no imunoensaio de fluxo vertical (VFIA). (Esquerda) Cartuchos de conjugado e de detecção conectados em série a uma seringa padrão para aquisição de amostra e, posteriormente, succioná-lo através dos *pads*. (Direita) Esquema das reações imunológicas que ocorrem no *conjugate pad* e no *detection pad* quando a amostra é aspirada com a seringa.

3.2 Parte experimental

3.2.1 Materiais e instrumentos

Hidrogênio tetracloouroaurato (III) trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), citrato trissódico ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), albumina de soro bovino (BSA), sacarose, ácido bórico, tetraborato de sódio, cloreto de sódio (NaCl), tampão fosfato salino (PBS) em tablete, *tween* 20, Human IgG (HIgG) whole molecule (I2511), anti-HIgG whole molecule goat polyclonal antibody (I1886) and anti-HIgG γ -chain specific goat polyclonal antibody (B1140) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Espanha). Human prostate specific antigen (PSA, full length protein; ab78528), anti-PSA mouse monoclonal antibody [clone 5A6] (ab24466), anti-PSA mouse monoclonal antibody [clone 5G6] (ab10186), e anti-goat IgG chicken polyclonal antibody (ab86245) foram adquiridos da Abcam (Reino Unido).

Um agitador (Thermo shaker) TS-100 foi utilizado para a conjugação das AuNPs com anticorpos. Uma centrífuga termostática (Sigma 2-16 PK, Fisher Bioblock Scientific, França) foi utilizada para purificar os conjugados formado por AuNPs-anticorpo. Medidas espectrofotométricas também foram realizadas utilizando um Spectramax-M2e (Dispositivo Molecular, EUA) com leitor de microplacas multi-modo. Um Microscópio Eletrônico de Transmissão (TEM) Jeol JEM-2011 (Jeol Ltd., Japão) foi utilizado para caracterizar as AuNPs. Água ultra pura, produzida utilizando o sistema Milli-Q ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) adquiridos da Millipore (Suécia), foi utilizada para a preparação de todas as soluções.

Todos os materiais utilizados para a produção dos LFIA e VFIA foram adquiridos da Millipore: uma fibra de celulose utilizada como *Sample pad* e *absorbent pad*, uma fibra de vidro utilizada como membrana do *conjugate pad*, membranas de nitrocelulose HF180 (com e sem proteção de plástico) utilizadas como membrana da zona de detecção, o cartão de suporte utilizado como material de apoio para o *Sample pad*, *conjugate pad*, membrana de detecção e para o *absorbent pad* no LFIA. Porta-filtros reutilizáveis Swinnex (Millipore, Suécia) e uma seringa de 10 mL (Terumo Medical, Espanha), também foram usados. Um sistema de distribuição de reagente IsoFlow (Imagene Technology, EUA) foi utilizado para dispensar as linhas de teste e de controle na membrana de detecção; um leitor de tira (Cozart, SpinReact,

Reino Unido) foi utilizado para medições quantitativas; e uma guilhotina (Dahle 533, Alemanha) foi utilizada para cortar as tiras do LFIA. Impressora de cera e xerox ColorQube 8570 foi usado para imprimir os anéis isolantes na membrana de detecção para utilização no VFIA.

As amostras de urina foram obtidas a partir de doadores saudáveis do sexo masculino (entre 20 e 30 anos) e foram utilizadas como recebidas, sem qualquer pré-tratamento.

Software ImageJ (versão 1.47) foi utilizado para medir a intensidade da cor nas membranas de detecção.

3.2.2 Preparação dos Tampões

Para ajustar o pH das AuNPs para o conjugado AuNPs/anticorpos, uma solução tampão de borato (BB) foi preparada com 10 mM de ácido bórico misturado com 10 mM de tetraborato de sódio deca-hidratado e o pH foi ajustado para 9,2 utilizando NaOH a 1M.

A solução de bloqueio consiste de 2% de albumina de soro bovino (BSA) em meio aquoso. Resumidamente, a membrana de nitrocelulose, onde estão imobilizadas as linhas ou pontos de teste e controle, são colocadas em um recipiente junto com esta solução de bloqueio e deixamos agir por um período de 5 a 10 minutos. Posteriormente, a membrana é lavada com o tampão de lavagem que consiste de uma solução com 5 mM de PB (tampão fosfato), pH 7,5 com 0,01% de surfactante SDS (Dodecil sulfato de sódio). A solução lavagem é deixada agir por 15 minutos, sendo algumas vezes, agitado.

O *running buffer* (tampão de corrida) consiste de uma solução de tampão salina com fosfato (phosphate buffer saline - PBS, pH 7,4) contendo 0,05% de *Tween* 20, para o caso do LFIA e 0,005% de *Tween* 20 para o caso do VFIA.

3.2.3 Preparação de nanopartículas de ouro (AuNPs)

AuNPs de aproximadamente 14 nm de diâmetro foram sintetizados por redução de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ por citrato trissódico, seguindo o método desenvolvido por Turkevich e colaboradores [133]. Resumidamente, em primeiro lugar, todos os materiais de vidro utilizados para a preparação das nanopartículas foram cuidadosamente e completamente limpos com água régia (HCl/HNO_3 , razão em volume

3:1) por algumas horas e posteriormente lavado muitas vezes com água destilada para uso. Tipicamente, 50 mL de água (ultrapura) foram misturadas com 500 μL de uma solução de 25 mM de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e aquecidas a 120 °C até ferver completamente, sob agitação. Em seguida 1,25 mL de solução de citrato de sódio a 1,1% foram adicionados a esta solução, rapidamente, sob agitação constante. A solução foi fervida durante 10 minutos, quando a solução incolor tornou-se violeta e, em seguida mudou para vermelho. Depois de esfriar a temperatura ambiente com agitação, a solução foi protegida da luz e armazenada a 4 °C (Figura 43).

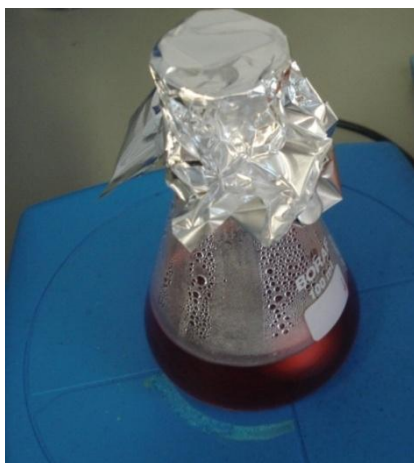


Figura 43: Dispersão coloidal de AuNPs.

3.2.3.1 Micrografia das AuNPs

Uma das formas de caracterização mais importante das AuNPs é a análise de TEM. De fato, a partir das imagens TEM é possível observar a homogeneidade do tamanho e a forma das AuNPs. Antes da análise, uma gota de 5 μL foi colocado em uma grade de cobre recoberta com um filme de carbono. A amostra foi seca à temperatura ambiente durante 2 horas, em condições essenciais, de forma a evitar que poeira as cobrisse, obtendo-se boas imagens. O diâmetro de 300 nanopartículas foi medido para obter valores suficientes e descrever toda a população na análise estatística. A distribuição dos diâmetros das AuNPs, obtida a

partir das imagens realizadas no TEM foi medida utilizando o *Software ImageJ*.

3.2.4 AuNPs modificadas com anticorpos

Em primeiro lugar, foi realizado um teste de agregação de ouro (GAT), de modo a estimar a melhor condição de pH e a quantidade mínima de anticorpos necessários para a cobertura total da superfície das AuNPs. O GAT consiste em incubar, durante 20 minutos a 650 rpm e 25 °C, em uma microplaca de 96 poços, 10 µL de anticorpos em diferentes concentrações em água ultrapura (100, 40, 20, 15, 5, 1, 0,5, e 0 µg/ml) para anti-HIgG e (250, 200, 140, 120, 100, 60, 20, e 0 µg/ml) para anti-PSA com 150 µL de solução de AuNPs, ajustadas para obter pHs 7, 8 e 9 (pH corrigido com tampão borato 10 mM pH 9,2). Após a incubação, 20 µL de NaCl a 10% em água ultrapura foram adicionados, e as soluções foram incubadas durante 5 minutos sob as mesmas condições. No final da incubação, os espectros de absorção das soluções foram medidos, a partir de 350 a 750 nm de comprimento de onda, a fim de encontrar as melhores condições de conjugação, ou seja, o pH que permite a utilização da menor quantidade de anticorpo para estabilizar as AuNPs.

O processo de conjugação foi realizado por adição de uma concentração mínima de anticorpo determinado pelo GAT. Resumidamente, 1,5 mL de solução AuNPs (ajustado para pH 9 em tampão borato) foram incubadas com 100 µL de 20 µg/mL de anti-HIgG (γ chain specific), ou com 100 µL de 200 µg/mL de anti-PSA (clone 5A6) , a 25 °C durante 20 minutos, com agitação de 600 rpm. Em seguida, os conjugados foram bloqueados por incubação destas soluções com 100 µL de 1 mg/mL e 10 mg/mL de solução aquosa de BSA para HIgG e PSA respectivamente, e a agitação continuou durante outros 20 minutos. Finalmente a solução foi centrifugada a 14000 rpm a 4 °C durante 20 minutos. O sobrenadante foi removido e o sedimento (*pellet*) de AuNPs foi re-disperso em 500 µL de 2 mM de tampão borato, pH 7,4, contendo 10% de sacarose.

3.2.5 Preparação das tiras LFIA

Primeiro o *sample pad* foi preparado pela imersão da membrana de celulose em 10 mM de PBS, pH 7,4, contendo 5% de BSA e 0,05% de Tween 20 e, em seguida, secou-se a 60 °C durante 2 horas. O *conjugate pad* foi preparado por imersão da fibra de vidro na solução contendo o conjugado AuNPs/anticorpo, preparado como descrito anteriormente, e em seguida secou-se a temperatura ambiente sob vácuo, durante 2 horas. Finalmente, os anticorpos, “anti-human IgG whole molecule” e “anti-goat IgG”, diluídos em 10 mM de tampão fosfato em pH 7,4 para obter uma concentração de 1 mg/mL, foram dispensados sobre o *detection pad*, a fim de formar as linhas de teste e de controle, respectivamente, utilizando para este, o equipamento de distribuição dos reagentes. A membrana de detecção foi seca a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente, os diferentes *pads* foram laminados sobre o cartão de apoio, na seguinte ordem: em primeiro lugar o *detection pad*, em seguida, o *absorbent pad*, na extremidade da placa de apoio e sobrepondo o *detection pad*, depois deste, o *conjugate pad* sobrepondo o *detection pad* e, finalmente, o *sample pad* no início do cartão de apoio sobrepondo *conjugate pad*. Após a laminação, as tiras foram cortadas, com 7 milímetros de largura, utilizando uma guilhotina para definir as bordas externas e, em seguida, com um cortador manual para definir as internas, e armazenado em condições secas a 4 °C até uma semana. A estabilidade em longo prazo não foi objeto deste estudo, mas considerando o teste de gravidez que pode ser estável até várias semanas, poderia esperar desempenho similar, em um caso de produção em massa para fins comerciais.

3.2.6 Procedimento do LFIA

Soluções de amostra foram preparadas diluindo diferentes quantidades de “Human IgG” (HIgG) em PBS, obtendo diferentes concentrações de analitos. PBS sem analito foi considerada como sendo o branco. O procedimento de ensaio consistiu em pipetar primeiro 200 µL de solução de amostra no *sample pad* e manter durante 10 minutos até que o fluxo fosse parado. Em seguida, 200 µL de PBS foi pipetado a fim de lavar o excesso de AuNPs/anticorpo. As tiras foram lidas com o leitor de tira para obter a curva de calibração correspondente. Para as

medições quantitativas também foram obtidos os valores para as densidades de cor nas linhas de teste utilizando o *software* ImageJ.

3.2.7 Preparação do *conjugate pad* e *detection pad* do VFIA

O *conjugate pad* consiste de um pedaço de fibra de vidro que foi mergulhado na solução com o conjugado AuNPs/anticorpo e, em seguida, seco à temperatura ambiente, sob vácuo durante 2 horas. Um pedaço seco de fibra de vidro retangular (12 x 6 mm) com a solução de *conjugate pad* é utilizada para cada ensaio de VFIA.

O *detection pad* consiste de um pedaço circular de nitrocelulose de 12 mm de diâmetro. Com o objetivo de concentrar uma maior quantidade de material na zona de detecção, uma camada hidrofóbica de cera foi impressa sobre a membrana, utilizando uma impressora de cera. Foram utilizados dois sistemas diferentes: um anel de cera foi impresso sobre a superfície exterior da membrana, possibilitando a imobilização e detecção do ponto de teste ou controle (Figura 44 (A)); e em outro caso, a cera foi impressa sobre a membrana, de forma que, dois círculos com o mesmo tamanho ficassem livres de cera, permitindo a integração entre o ponto de teste e controle (Figura 44 (B)). Após a impressão de cera a membrana é aquecida a 130 °C por 1 minuto sobre uma placa de aquecimento ou uma estufa.



Figura 44: Impressão de cera sobre a membrana de nitrocelulose: (A) um círculo sem cera e (B) dois círculos sem cera.

Os anticorpos “anti-human IgG” ou anti-PSA (para o ponto de teste) e de “anti-goat IgG” (para o ponto de controle) foram diluídos em 10 mM PBS (pH 7,4) para obter uma concentração de 1 mg/mL e foram imobilizados na zona de detecção, depositando uma gota de 0,5 µL apenas no centro da membrana e deixando secar a 37 °C por 1 hora. Os *pads* foram armazenados em condições secas a 4 °C até uma semana.

3.2.8 Configuração para o fluxo de imunoensaio vertical (VFIA) com seringa

A nossa abordagem foi baseada no uso de cartuchos de plástico reutilizáveis como suporte dos *pads*, sendo os imunorreagentes

previamente immobilizados, e uma seringa padrão (volume máximo de 10 mL) foi utilizada para pegar a amostra e succioná-la através dos *pads* (cartuchos), Figura 42. Como mostra a Figura 45 (foto da configuração), os cartuchos e a seringa são conectados em série. A amostra foi aspirada (volume típico: 5 mL) para o primeiro cartucho e deixou-se interagir durante três minutos. Depois disso, foi aspirada para o segundo cartucho, observando-se a evolução da cor vermelha na zona de detecção. Após alguns minutos, a resposta pode ser facilmente observada de forma qualitativa, a olho nu, simplesmente abrindo o cartucho. Para medições quantitativas, a densidade de cor no ponto de teste foi quantificada utilizando o programa ImageJ (o protocolo utilizado está descrito no Anexo 1). O mesmo procedimento experimental foi seguido para a análise de amostras de urina, na ausência de PSA e adicionando PSA para obter a concentração de 150 ng/mL.

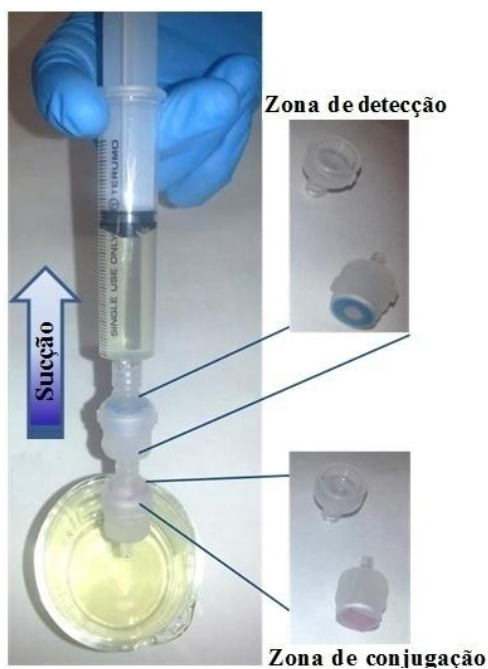


Figura 45: Foto da configuração utilizada para o VFIA. Os Cartuchos do conjugado e de detecção foram conectados em série a uma seringa padrão e

usados para coletar a amostra e, subsequentemente, o fluxo foi aspirado através dos *pads*.

3.2.9 ImageJ

A fim de determinar quantitativamente a sensibilidade ou a faixa de detecção do nosso biossensor para as diversas concentrações de proteína, o *software* ImageJ foi utilizado. O ImageJ é um programa, de domínio público, de análises e processamento de imagens, desenvolvido em linguagem JAVA, de iniciativa do *National Institute of Health* (NIH). Ele pode exibir, editar, analisar, processar, salvar e imprimir imagens de 8 bits, 16 bits e de 32 bits; consegue ler vários formatos de imagem, incluindo TIFF, GIF, JPEG, entre outros; calcula área e valor de pixel estatístico de seleções definidas pelo usuário; mede distâncias e ângulos, etc. O Guia do Usuário ImageJ fornece uma visão detalhada do *software*, o padrão em análise de imagem científica, além de um pacote com suas funções para o desenvolvimento de sistemas. Sua versão pode ser obtida a partir de <http://imagej.nih.gov/ij/docs/guide>. No nosso caso, o sistema foi utilizado com o propósito de obter a intensidade de cor emergente das AuNPs nos testes, principalmente de VFIA (o Protocolo utilizado está detalhado no Anexo 1). O ImageJ também foi utilizado para determinar a distribuição dos diâmetros das AuNPs sintetizadas e utilizadas neste trabalho.

3. 3 Resultados e discussão

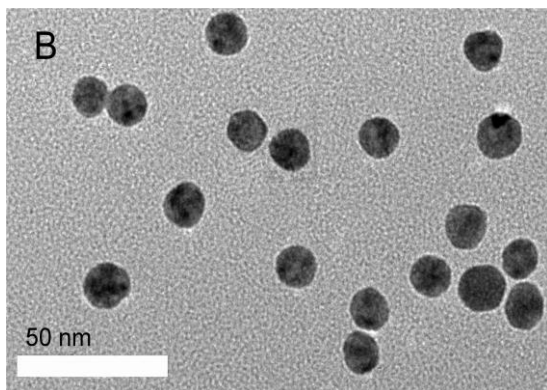
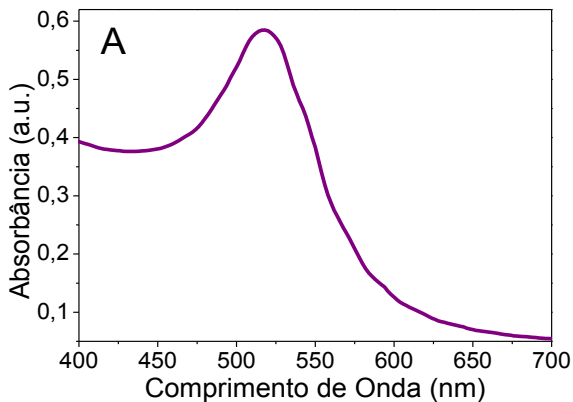
Esta seção apresenta o estudo e desenvolvimento de uma nova plataforma para aplicações em diagnósticos baseados em AuNPs. Inicialmente são apresentadas as medidas de espectroscopia UV-Vis e microscopia eletrônica de transmissão das AuNPs, com a finalidade de observar a região do espectro em que essas partículas absorvem, bem como, o tamanho e a forma das mesmas. Na sequência, são apresentados os testes de agregação das AuNPs conjugadas com os anticorpos de detecção anti-HIgG e anti-PSA. Este estudo foi importante para investigar o pH ideal e a quantidade mínima de anticorpo necessária para manter a estabilidade do conjugado formado. Em seguida, foi realizado um estudo utilizando o ensaio de fluxo lateral para detecção de HIgG como proteína modelo. Para obter a resposta de forma quantitativa, duas ferramentas distintas foram utilizadas: a primeira, através do uso do leitor de tiras do ensaio de fluxo lateral, em que a intensidade da cor foi quantificada após a secagem da tira utilizada; e a segunda, através do *software* ImageJ, em que as imagens digitalizadas das tiras foram obtidas e, então, a intensidade das zonas de teste e de controle foram quantificadas. Este estudo teve por finalidade investigar a confiabilidade proporcionada pelo *software* de processamento de imagens na quantificação do sinal. Por fim, nesta seção são apresentados os resultados dos testes realizados com o novo dispositivo VFIA, proposto durante o estágio no grupo do professor Merkoçi em Barcelona. Ele demonstrou ser uma alternativa importante para suprir algumas limitações do LFIA convencional, destacando o grande volume de amostras que este novo dispositivo pode suportar para o desenvolvimento de cada ensaio. Este dispositivo pode ser muito relevante especialmente para sistemas com concentração muito baixa de analito.

Assim, o objetivo principal deste trabalho envolveu o desenvolvimento do LIS baseado em um imunoenensaio de fluxo vertical. Um teste de aplicação na área da saúde utilizando este dispositivo possibilitou uma nova alternativa, não invasiva, para detecção do PSA em urina, que detecta a proteína relacionada com o câncer de próstata. O sistema é de baixo custo e fácil manuseio, sua detecção é rápida e não é necessária a participação de pessoal qualificado para o desenvolvimento do ensaio.

3.3.1 Caracterização das nanopartículas de ouro

Para o desenvolvimento de um dispositivo de fluxo lateral ou vertical é fundamental a escolha de um marcador de sinal adequado. A utilização de nanopartículas metálicas, especialmente de ouro, tem despertado um enorme interesse devido às suas características exclusivas que lhes conferem grande potencial em aplicações tecnológicas, como mencionado anteriormente.

As AuNPs sintetizadas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e de absorção UV-Vis. A banda de absorção típica em 520 nm é observada na Figura 46 (A), evidenciando a formação de suspensão bem dispersa.



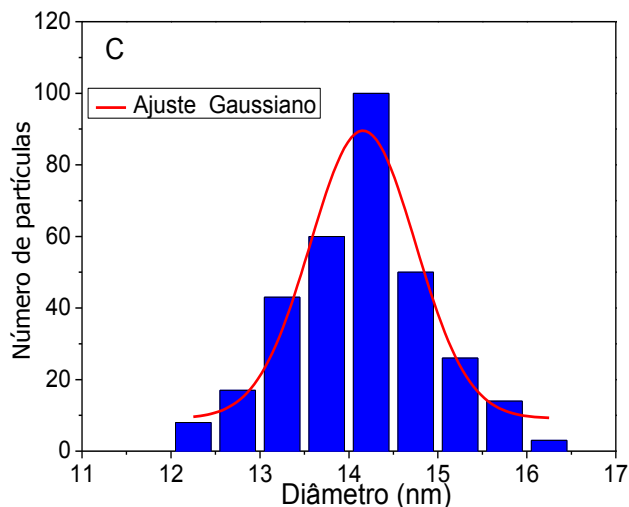


Figura 46: Caracterização das AuNPs: (A) O espectro de UV-Vis; (B) Micrografia TEM; e (C) Histograma da distribuição de diâmetro das partículas e a distribuição Gaussiana ajustada aos dados.

Como pode ser observada na imagem de TEM (Figura 46 (B)), com uma escala de 50 nm inserida, a amostra é composta por nanopartículas esféricas com relativa uniformidade de forma e tamanho. O tamanho médio das nanopartículas, foi analisado contando-se aproximadamente 300 nanopartículas utilizando o *software* ImageJ. O resultado desta análise representado pela Figura 46 (C) mostra o histograma da distribuição do diâmetro e a distribuição Gaussiana ajustada aos dados. O diâmetro médio predominante e o desvio padrão obtidos por meio do ajuste Gaussiano foram de aproximadamente $14 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$.

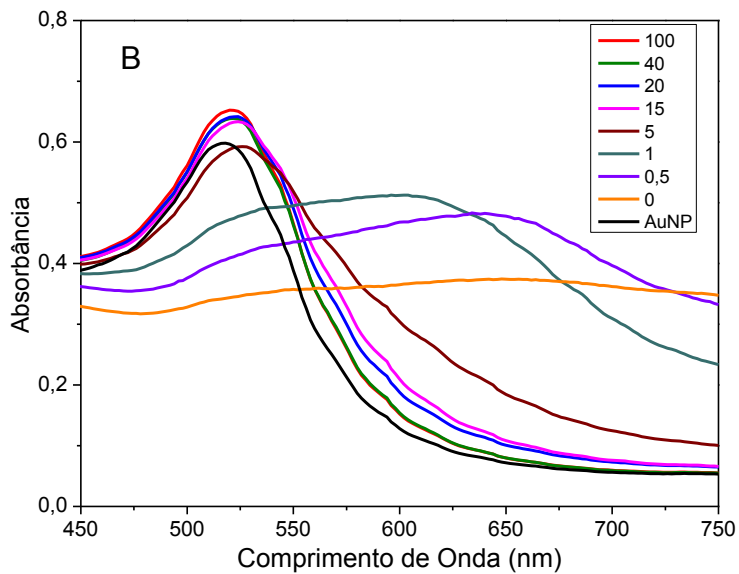
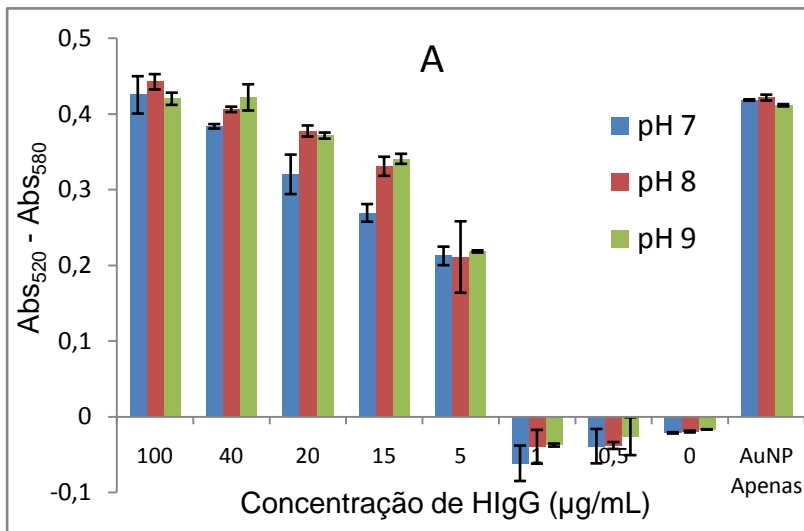
3.3.2 Caracterização dos conjugados AuNPs-anticorpo

Para a conjugação o anticorpo foi adsorvido na superfície das nanopartículas de ouro. O mecanismo por trás da conjugação de anticorpos à superfície das AuNPs, ocorre mais provavelmente devido à afinidade bem conhecida entre o ouro e o enxofre (S) do grupo tiol presente na cisteína (aminoácido que contém o grupo tiol presente na

região constante dos anticorpos) [139]. Um método importante para a determinação da concentração mínima de anticorpo a ser utilizado para a conjugação com AuNPs é o GAT, que pode ser seguido da medição da absorção das mesmas.

As Figuras 47 e 48 mostram o estudo realizado para encontrar as melhores condições de pH e a concentração mínima de anticorpo que evitam a agregação das nanopartículas quando uma grande quantidade de NaCl é adicionado ao conjugado. Os diagramas foram determinados através da medição da diferença entre a absorbância a 520 nm (AuNPs dispersas) e 580 nm (AuNPs agregadas), para os anticorpos anti-HIgG (Figura 47 (A)) e anti-PSA (Figura 48), em três valores de pH diferentes. No caso do anticorpo anti-HIgG os valores de pH apresentaram resultados similares. À medida que a quantidade de anticorpo diminuiu na solução a estabilidade também diminuiu, até uma certa quantidade de anticorpo, onde a concentração não foi suficiente para evitar a agregação, como por exemplo, para 0,5 µg/mL. Por outro lado, no caso do anti-PSA, observa-se que para pH 9,0 obteve-se uma condição mais favorável em comparação com aos outros dois valores de pHs. Apesar da concentração de 120 µg/mL de anticorpo anti-PSA ter sido suficiente para evitar a agregação das AuNPs, realizamos novas medidas com concentrações maiores, apenas para pH 9,0, afim de obter uma maior confiabilidade.

A Figura 47 (B) mostra os espectros de absorção na região do UV-Vis para os conjugados AuNPs-anticopos em pH 9,0 para as diferentes concentrações de anti-HIgG. Os conjugados exibiram máximo de absorbância no comprimento de onda de 520 nm e não houve variação significativa no espectro entre os cinco maiores valores de concentração de anticorpos anti-HIgG analisados. Ao contrário, as concentrações de 1,0 µg/mL e 0,5 µg/mL não foram suficientes para evitar a agregação das AuNPs, o que pode ser bem identificado com o deslocamento da banda plasmon para maiores comprimentos de onda, como representado na Figura 47 (B) e pela alteração na cor de vermelho para azul-violeta como ilustrado na Figura 47 (C).



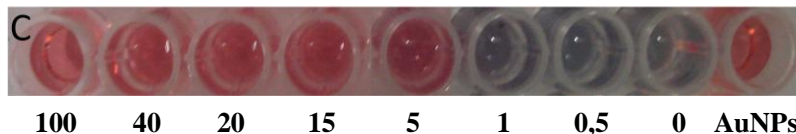


Figura 47: Resultados do GAT para a otimização da conjugação AuNPs/anti-HIgG. (A) Diagrama da diferença da absorvância entre 520 e 580 nm, para diferentes pHs e diferentes concentrações de anticorpos; (B) Espectros de absorção em pH 9,0 para as diversas concentrações de anticorpos utilizadas em (A); e (C) Fotografia das soluções de conjugado AuNPs/anticorpo para as diversas concentrações de anticorpos estudadas, após a adição de NaCl, em pH 9,0 e um poço com apenas AuNPs para controle.

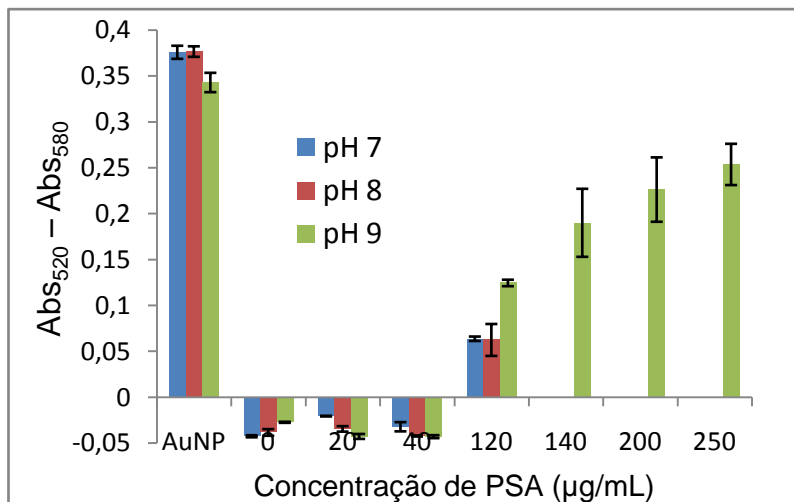
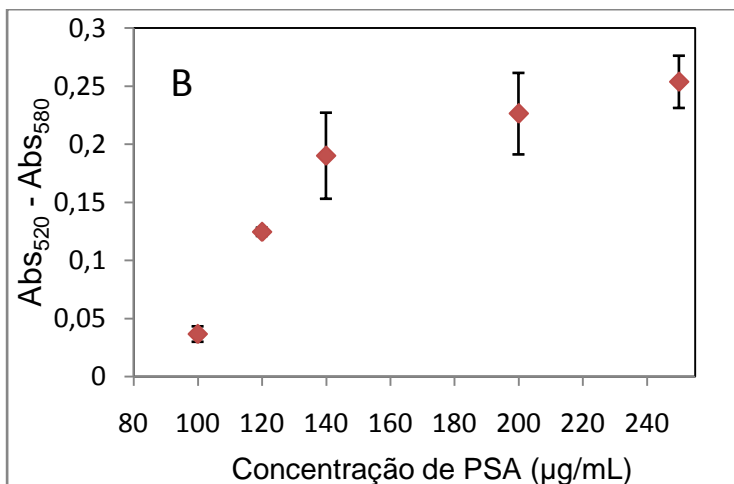
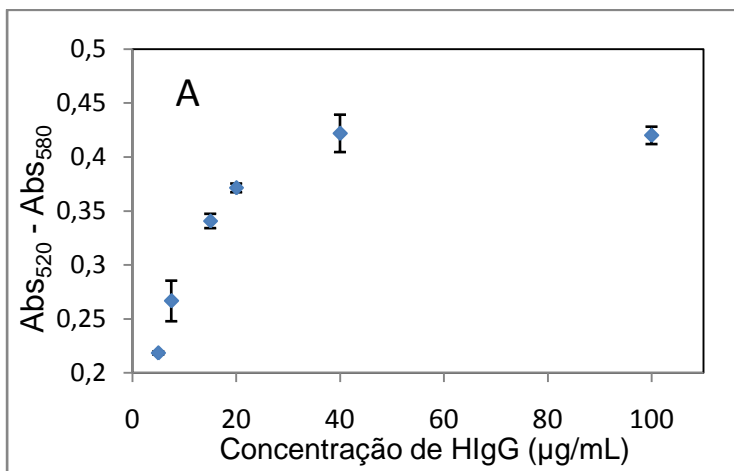


Figura 48: Resultados do GAT para AuNPs/anti-PSA. Diagrama da diferença da absorvância entre 520 e 580 nm, para diferentes pHs e diferentes concentrações de anticorpos.

A concentração mínima dos anticorpos para evitar a agregação das AuNPs, induzida por NaCl está representada na Figura 49. Os gráficos foram determinados a partir da medição da diferença de absorvância entre 520 e 580 nm em função da concentração de anti-HIgG (Figura 49 (A)), em pH 9,0; ou anti-PSA (Figura 49 (B)). A Figura 49 (C) mostra a foto do GAT para o anticorpo anti-PSA, em pH

9,0 (melhor valor de pH obtido), para as cinco diferentes concentrações de anticorpos analisadas na figura 49 (B).



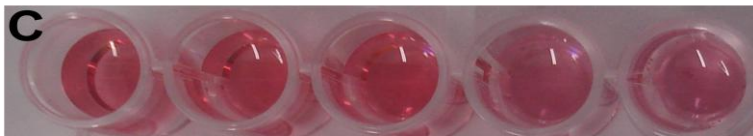


Figura 49: Caracterização dos conjugados AuNPs/anticorpos mostrando a diferença de absorvância (Abs520-Abs580) em função da concentração de anticorpos: anti-HIgG (A) ou de anti-PSA (B) a partir do teste de agregação de ouro (GAT); e as fotografias correspondentes as maiores concentrações de anticorpo anti-PSA que evitaram a agregação das AuNPs(C).

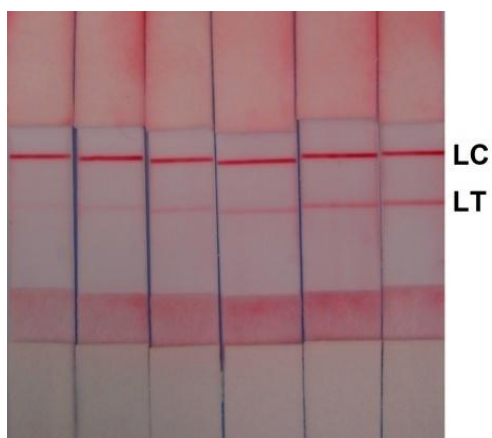
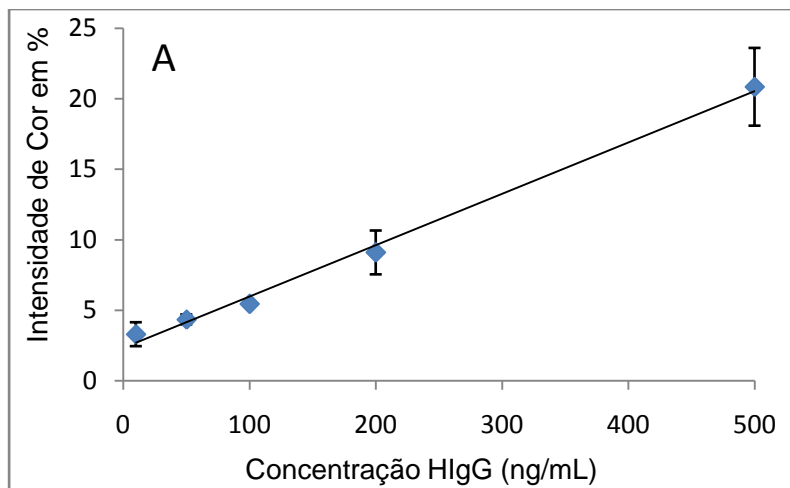
Com base nos resultados desses gráficos, utilizando as condições otimizadas para a conjugação, as concentrações ideais foram de 20 $\mu\text{g/mL}$ para anti-HIgG e 200 $\mu\text{g/mL}$ para anti-PSA. O fato de que a diferença de concentração ideal entre os dois anticorpos foi um fator de dez, destaca a importância das informações obtidas com este método.

3.3.3 Ensaio de Fluxo Lateral

O maior objetivo em realizar o estudo com as tiras de fluxo lateral foi devido ao fato de que, para analisar as imagens através do método VFIA (próxima seção) não será possível utilizar o leitor do LFIA para as medidas quantitativas. Assim, uma alternativa foi comparar as respostas quantitativas fornecidas pelo leitor do LFIA e pela utilização do *software* ImageJ para um mesmo teste. A membrana HF180 foi escolhida uma vez que possui características intermediárias quando comparadas com as membranas 075 e 240, podendo ser mais eficaz para o manuseio do dispositivo de fluxo vertical, de modo que não seja necessário aplicar uma pressão muito grande para aspirar a amostra e, com isso, diminuindo a possibilidade de rompimento da membrana durante o desenvolvimento do ensaio; em sinergia com o fato dessa membrana apresentar o tempo necessário para concluir o ensaio, com sensibilidade adequada.

A Figura 50 mostra o teste utilizando o ensaio de fluxo lateral para detecção de HIgG como proteína modelo comparando as análises quantitativas obtidas com leitor de fluxo lateral (Figura 50 (A)) e com o uso do *software* ImageJ (Figura 50 (B)). No ensaio 200 μL de amostra com HIgG foram adicionadas no *sample pad* e a amostra migrou ao longo da tira por ação capilar. Como resultado, a densidade de cor proporcional à concentração do analito permitiu uma avaliação qualitativa (a olho nu) da amostra (Figura 50 (A)). Para as medições

quantitativas, a densidade de cor foi convertida em escala de intensidade de cor em % (definido como sinal analítico) pelo equipamento de leitura do ensaio de fluxo lateral e pelo *software* ImageJ.



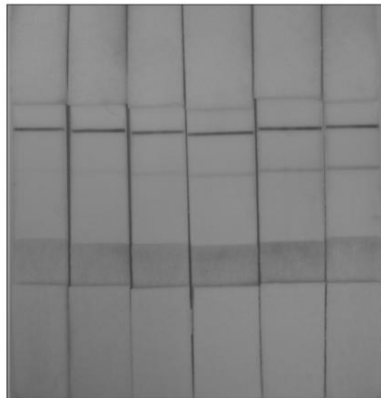
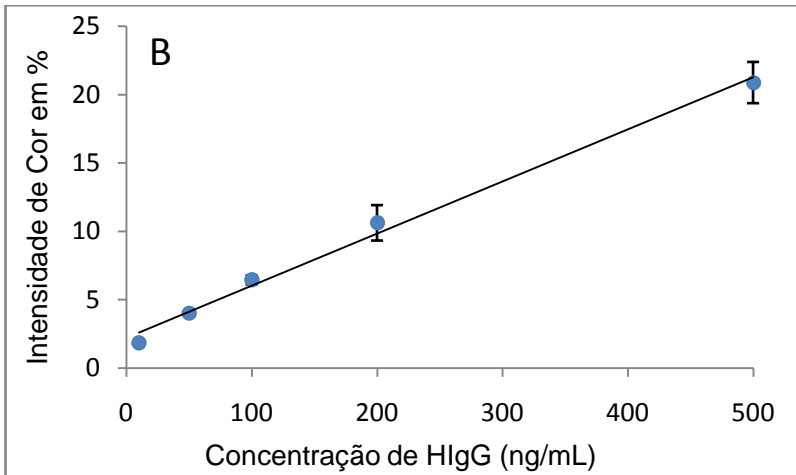


Figura 50: Teste de fluxo lateral para detecção de HIgG apresentando as curvas de calibração (medida quantitativa) e a fotografia do ensaio qualitativo (da esquerda para a direita: 0, 10, 50, 100, 200 e 500 ng/mL) utilizando: (A) Leitor de fluxo lateral; e (B) o *software* ImageJ.

Como observado na Figura 50, o resultado exibido pelo *software* apresentou um bom desempenho em comparação com a resposta quantitativa analisada com o uso do leitor de fluxo lateral. Ambas as Figuras (A) e (B) apresentaram uma curva de calibração linear no intervalo de 5 a 500 ng/mL. Como mencionada em seu protocolo (ver Anexo 1), a intensidade de cor medida com o *software*

ImageJ é medida em escala cinza de 8 *Bits*, assim, a Figura 50 (B) mostra a imagem gerada pelo *software* a partir da fotografia do ensaio ilustrada em 50 (A).

Como já mencionado anteriormente, o LFIA apresenta algumas desvantagens, e muitos esforços, bem como, novos dispositivos capazes de suprir estas limitações, são necessários. Neste contexto, desenvolvemos neste trabalho um novo dispositivo que denominamos de LIS, com base em um simples imunoenensaio de fluxo vertical, em vez de fluxo lateral, utilizando nanopartículas de ouro como marcadores do sinal resposta. O princípio de funcionamento deste novo dispositivo, bem como, os testes realizados utilizando HIgG e PSA como proteínas modelo, são apresentados na sequência.

3.3.4 Princípio do LIS

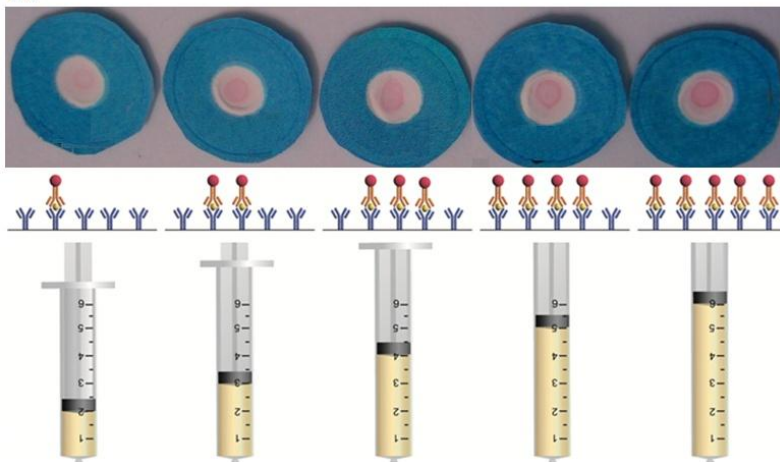
O LIS é baseado na imunorreação específica que ocorre entre os anticorpos específicos e o analito (ver Figura 42). Quando a amostra é aspirada até o preenchimento completo do primeiro cartucho (volume típico: 5 mL), ela passa através do *conjugate pad*, em que o conjugado AuNP-anticorpo (anti-HIgG ou anti-PSA) está imobilizado. O analito na amostra (HIgG ou PSA) é reconhecido pelo anticorpo específico, formando a reação AuNPs-anticorpo/analito. A reação resultante é aspirada para o segundo cartucho, que contém o *detection pad*, em que o anticorpo de captura (anti-HIgG ou anti-PSA) está imobilizado na membrana de nitrocelulose. O complexo sanduíche AuNPs-anticorpo/analito/anticorpo é então formado na zona de teste, que por sua vez faz com que um ponto de cor vermelha apareça depois de alguns minutos. A densidade de cor é proporcional à concentração do analito, possibilitando a avaliação qualitativa da amostra. Para as medições quantitativas, a densidade de cor é convertida para a escala de intensidade de cor em %, utilizando o *software* ImageJ (ver protocolo em Anexo 1).

3.3.4.1 Efeito do volume de amostra no sinal analítico: analito pré-concentrado

Uma limitação bem conhecida do LFIA convencional (padrão) é o volume de amostra: o volume máximo que pode ser normalmente analisado é cerca de 200 μL , que leva à baixa sensibilidade. Isto é

especialmente relevante para a análise de amostras altamente diluídas de fontes que não estão limitados em termos de volume, como por exemplo, amostras de urina. Neste contexto, o nosso *design* do LIS com seringa permite o processamento de grandes volumes de amostra (até 6 mL e, em alguns casos, ainda mais), facilitando assim a pré-concentração do analito, que o torna ideal para aplicações clínicas. Além disso, o ensaio é relativamente rápido, com tempo de duração de menos de 15 minutos.

O efeito do volume da amostra sobre o sinal analítico para o nosso sistema VFIA foi investigado, primeiramente, utilizando HIgG como analito modelo. A Figura 51 (A) mostra as fotografias das zonas de detecção obtidas após a realização dos ensaios para uma concentração fixa de 50 ng/mL de HIgG, mas com diferentes volumes de amostras, variando entre 2 e 6 mL. Como pode ser observado nas fotos, os pontos vermelhos na região do teste tornam-se mais intensos com o aumento do volume de amostra. Estes resultados corroboram a nossa hipótese do efeito de pré-concentração do analito: quanto maior o volume de amostra processado, maior a quantidade de analito que interage com os diferentes *pads* e, conseqüentemente, maior será o sinal analítico.

A

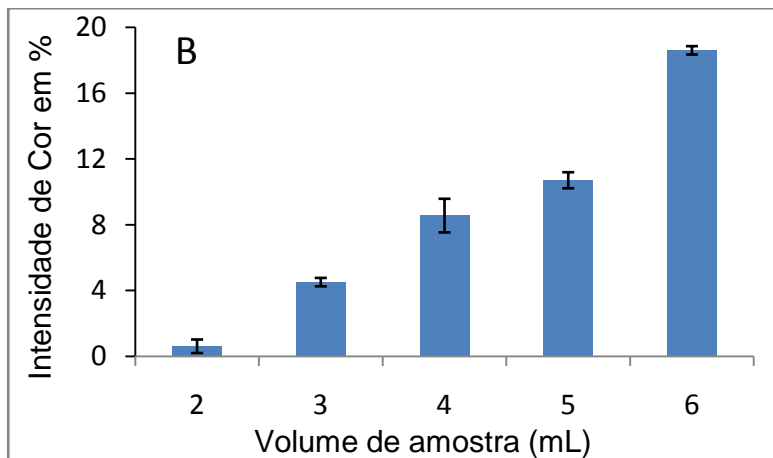


Figura 51: Efeito do volume da amostra em função do sinal analítico. (A, superior) Fotografias das zonas de detecção obtidas após os testes realizados com diferentes volumes de amostra (da esquerda para a direita: 2 mL a 6 mL) a uma concentração de HIgG de 50 ng/mL. (A, meio) Esquemas dos processos que ocorrem na linha de detecção. (A, inferior) Fotos da seringa correspondente de cada ensaio. (B) sinal analítico (expresso como % da intensidade da cor; quantificados utilizando *software* ImageJ) a partir das zonas de teste em função do volume da amostra.

Em paralelo com a análise qualitativa mencionada, a intensidade do ponto vermelho também foi quantificada através da utilização do *software* de processamento de imagem, de acordo com uma escala normalizada. Um gráfico do sinal analítico em função do volume de amostra é mostrado na Figura 51 (B). Com base nestes resultados, um volume de amostra de 5 mL foi escolhido como ideal para estudos posteriores.

Também foram avaliados os efeitos da concentração do analito (HIgG) sobre o sinal analítico para o ensaio otimizado. Como observado na Figura 52, uma relação linear foi encontrada no intervalo de 10 a 500 ng/mL.

As respostas de reprodutibilidade obtida a partir da medida de intensidade de cor para 10 regiões diferentes dentro de uma amostra para 50 ng/mL de HIgG ($n = 10$) apresentaram um desvio-padrão relativo (*relative standard deviation* - RSD) de 2%. O LOD de HIgG

(calculado como sendo: branco mais três vezes o desvio padrão do branco) foi de 1,1 ng/mL.

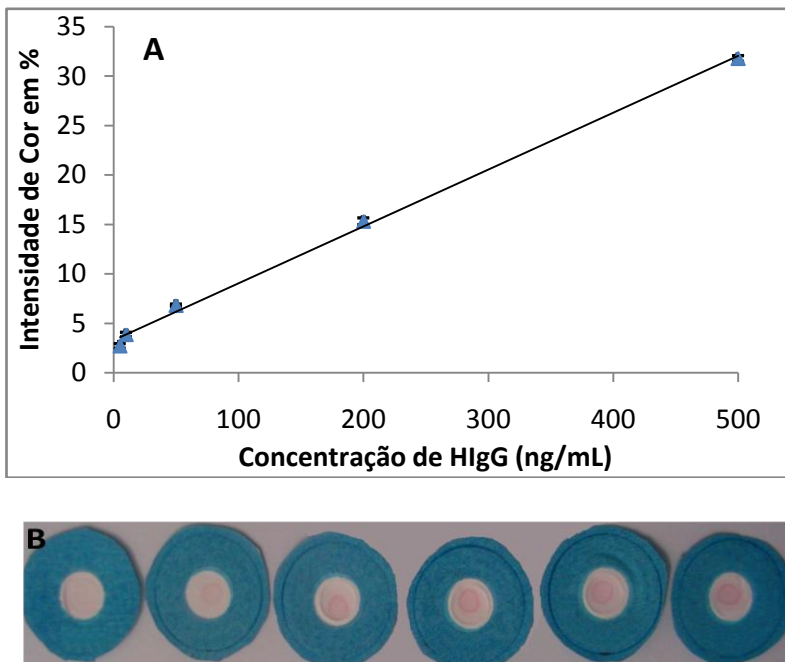


Figura 52: (A) Efeito da concentração de HIgG para a intensidade do sinal analítico (expressa como % da intensidade da cor, quantificada utilizando o *software* ImageJ) para o ensaio com o volume de amostra de 5 mL. (B) Fotos dos pontos de teste na zona de detecção (da esquerda para a direita: 0, 5, 10, 50, 200 e 500 ng/mL de HIgG).

O LOD alcançado é comparável com o obtido no LFIA utilizando diferentes abordagens de amplificação, com base no marcador duplo AuNPs/enzima [9] ou em diferentes geometrias da tira [111]. Além disso, se necessário, é possível aumentar a sensibilidade do nosso ensaio simplesmente processando um volume maior de amostra. Além da sua boa sensibilidade, o ensaio LIS desenvolvido é mais simples e mais rápido em operação (ensaio completo em 15 minutos) do que são os LFIA convencionais (ensaio completo: 20 minutos). A configuração do cartucho em conjunto com a seringa, permite uma grande versatilidade em um dispositivo de fácil utilização, que não necessita de qualquer material de laboratório adicional, como por exemplo, pipetas.

3.3.4.2 Demonstração de prova do conceito de detecção HIgG do LIS

Demonstramos também a eficácia de um projeto alternativo para o ensaio que apresenta uma zona de detecção com um ponto adicional para o controle do LIS. HIgG foi usada como proteína modelo para demonstrar a prova do conceito do biossensor baseado no VFIA. Neste sistema, a solução com ou sem HIgG foi aspirada até que cubrisse completamente o primeiro cartucho, em que o conjugado “AuNPs-Goat anti-HIgG” encontrava-se presente na forma desidratada no *conjugate pad*. Em seguida, na presença do analito na amostra, ocorre a ligação entre o conjugado e HIgG. Após três minutos o complexo “AuNPs-Goat anti-HIgG/HIgG” formado é aspirado até o segundo cartucho. Quando eles atingem o *detection pad* o complexo é capturado pelo anticorpo de captura imobilizado na membrana de nitrocelulose, através da interação entre o anticorpo anti-HIgG (anticorpo de captura) e HIgG (analito). Um ponto vermelho característico pode ser observado pela acumulação das AuNPs na zona de teste. Uma vez que a solução passa através da zona de controle, o excesso de “AuNPs-Goat anti-HIgG” é capturado por meio da ligação com o anticorpo “anti-Goat” (pré-imobilizado na zona de controle), formando assim, uma segunda banda vermelha.

A Figura 53 (A) exibe as imagens fotográficas para a detecção qualitativa baseado no VFIA para as diversas quantidades de HIgG na presença de 5 mL de volume de amostra. Nesta figura, na parte superior da zona de controle, existe uma linha preta para diferenciar as duas zonas de detecção. Duas bandas vermelhas aparecem na presença de HIgG, e apenas um ponto vermelho (controle) pode ser visto na ausência de HIgG. Neste caso, o ponto vermelho na zona de controle mostra que o biossensor está funcionando corretamente. A Figura 53 (B) mostra a curva de calibração para a detecção quantitativa, utilizando o *software* ImageJ, onde observa-se que a intensidade da cor aumenta com o aumento da concentração de HIgG.

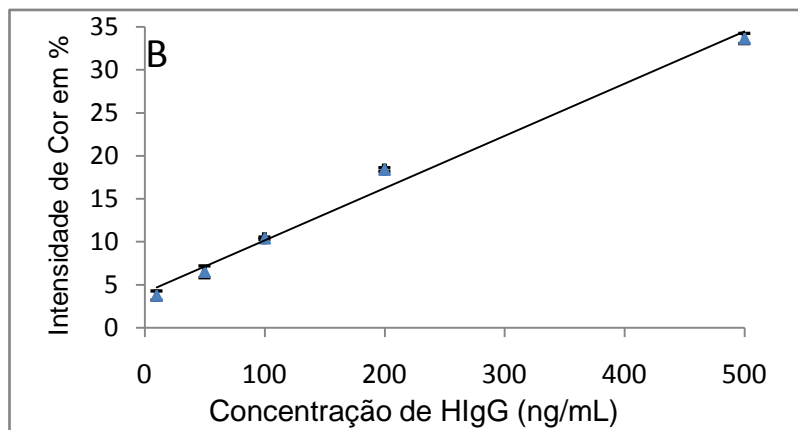
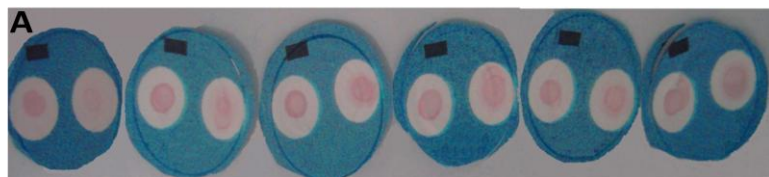


Figura 53: (A) Imagem da foto do imunoensaio de fluxo vertical em diferentes concentrações de HIgG (da esquerda para a direita: 0 , 10, 50, 100, 200 e 500 ng/mL) e (B) curva de calibração obtida a partir da análise quantitativa.

3.3.4.3 Detecção HIgG com uma solução de bloqueio

A natureza hidrofóbica da nitrocelulose pode causar problema quando as moléculas marcadas revestidas com anticorpos estão fluindo através dela. Esses anticorpos podem prender-se à membrana de forma semelhante aos anticorpos na linha de teste. Para evitar esta ligação inespecífica a membrana tem que ser bloqueada. Os reagentes comumente utilizados são a albumina do soro bovino (BSA) com alguns surfactantes, como Tween 20 [122].

Desta forma, para assegurar que nenhuma ligação não-específica seja medida, observou-se a resposta do sinal quando a região do *detection pad* foi bloqueada com uma solução de BSA a 2% em meio aquoso. Resumidamente, 1,0 mg/mL dos anticorpos de captura anti-HIgG e anti-Goat HIgG, foram imobilizados previamente na membrana

de nitrocelulose como ponto de teste e controle, respectivamente. A membrana foi seca à temperatura ambiente durante 1 hora. Seguidamente foi realizado o bloqueio com BSA, e então, lavou-se bem como descrito na seção 3.2.2. A continuidade do processo do ensaio foi o mesmo descrito acima para o caso sem bloqueio. A análise qualitativa da intensidade de cor para biossensor VFIA é mostrado na Figura 54 (A). Na ausência de HIgG apenas o ponto de controle é desenvolvido e na presença de HIgG duas bandas vermelhas apareceram devido à acumulação de AuNPs. Mais uma vez o ponto vermelho na zona de controle mostra que o biossensor está funcionando adequadamente. As análises quantitativas foram realizadas através da leitura das intensidades ópticas dos pontos vermelhos na linha de teste, utilizando o *software* ImageJ. A relação entre a concentração de HIgG e intensidade de cor correspondente é mostrada na Figura 54 (B). A curva de calibração mostra que houve aumento linear dos sinais analíticos no ponto de teste com o aumento da concentração de HIgG.

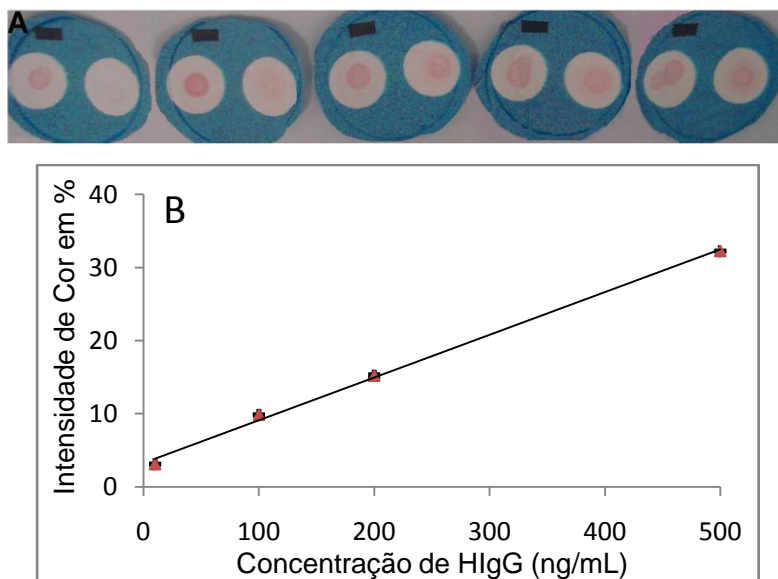


Figura 54: (A) Foto imagem do biossensor em diferentes concentrações HIgG (da esquerda para a direita: 0 , 10, 100, 200 e 500 ng/mL) bloqueada com BSA e (B) curva de calibração (análise quantitativa).

3.3.4.4 A detecção de PSA: adicionado e recuperado em amostras de urina humana

Como mencionado na introdução, para a detecção de 150 ng/mL de PSA em amostras de urina, o LIS torna-se altamente interessante para o diagnóstico de câncer de próstata, bem como, uma estratégia promissora para minimizar o número de biópsias da próstata. Neste contexto, concluímos que o LIS seria altamente favorável à análise de amostras de urina, devido ao fato da mesma não ser limitada pelo volume da amostra. Para demonstrar essa funcionalidade, testamos nosso dispositivo para a detecção de PSA: primeiro em meio tampão (0,1 M PBS), para avaliar o seu desempenho global; e, em seguida, em amostras de urina humana saudáveis que foram adicionadas PSA para simular uma amostra alterada, e com isso determinar se uma matriz biológica iria afetar o seu desempenho. As Figuras 55 (A) para análise qualitativa e 55 (B) para análise quantitativa mostram que o dispositivo funcionou muito bem para a detecção de PSA em meio de tampão. A curva de calibração apresentou uma relação linear no intervalo 2 ng/mL a 150 ng/mL. O RSD para uma concentração de PSA de 50 ng/mL ($n = 10$) foi de 3% e o LOD, 1,9 ng/mL.

As imagens inseridas na Figura 55 (B) mostram as zonas de detecção correspondentes à análise de amostras de urina sem PSA ou pela adição de PSA na urina para simular uma concentração de 150 ng/mL. Estas imagens evidenciam que a matriz complexa da amostra não interfere significativamente com a geração do ponto vermelho na zona de teste ou com o seu contraste contra o fundo branco da membrana de detecção.

Três amostras de urina foram obtidas a partir de doadores saudáveis do sexo masculino e foram adicionadas PSA (150 ng/mL). Os ensaios foram desenvolvidos e as intensidades de cor da zona de teste foram quantificadas a partir do *software* ImageJ e inseridas na Figura 54 (B), representadas pelos quadrados vermelhos. Os sinais analíticos resultantes são os valores 26,99%, 25,09% e 26,88%. Uma vez que o valor do sinal correspondente ao PSA em tampão com a mesma concentração foi de 27,62%, estimou-se os valores de *PSA-recuperado* = $\frac{\text{PSA adicionado}}{\text{PSA em tampão}} \times 100$, resultando em 97,73%, 90,83% e 97,33%, respectivamente, para as três amostras de urina. Estes resultados demonstram que o nosso método oferece altas taxas de recuperação a partir de amostras de urina humana, tornando-se uma alternativa

promissora para a rápida quantificação do PSA na urina para diagnóstico de câncer de próstata.

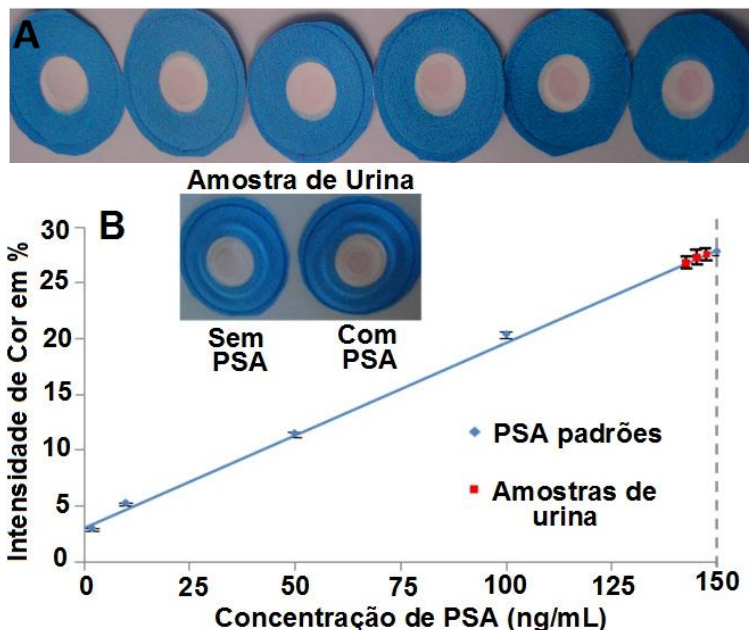


Figura 55: (A) Fotos da região de detecção (da esquerda para a direita: 0, 10, 50, 100, 200 e 500 ng/mL de PSA); e (B) Curva de calibração para os padrões de PSA em tampão PBS (0,1 M). Os quadrados vermelhos na curva correspondem aos sinais obtidos para três amostras de urina humana que foram adicionadas com PSA para obter a concentração de 150 ng/mL; Detalhe: Foto da região de detecção obtidos para o ensaio de urina, com ou sem PSA;

3.3.4.5 A detecção de PSA: *Conjugate pad* com caseína

Na tentativa de otimizar o sistema, também foi realizado um teste de detecção de PSA utilizando 0,2 mg/mL de caseína, como proteína de bloqueio na preparação do *conjugate pad*, em vez de BSA, sendo os demais parâmetros mantidos constante. O resultado qualitativo é mostrado na Figura 56 (A), representado pela fotografia produzida logo após o ensaio finalizado, onde verificou-se que a intensidade da cor em 1 ng/mL de PSA foi significativamente mais forte do que a solução

de amostra sem PSA. De acordo com a definição da detecção qualitativa, 1 ng/mL poderia ser considerado como o limite visual para detecção de PSA.

A resposta quantitativa é apresentada na Figura 56 (B) pela curva de calibração, obtida a partir dos valores das intensidades de cor medidas com auxílio do *software* ImageJ. O LOD obtido para este estudo foi de 0,8 ng/mL. Esse valor foi um pouco mais baixo que o LOD encontrado com a utilização de BSA como proteína de bloqueio.

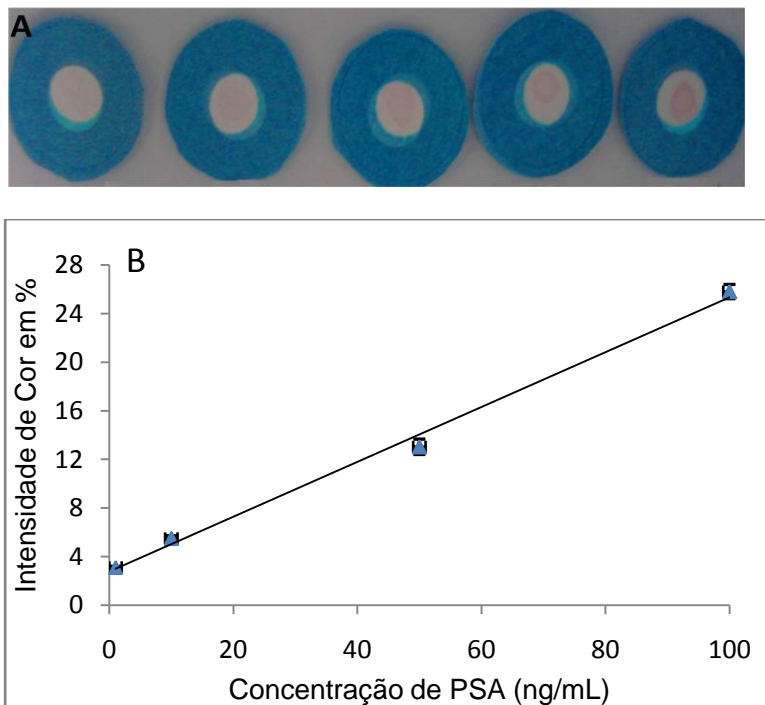


Figura 56: (A) Fotografia do imunoenensaio de fluxo vertical em diferentes concentrações de PSA (da esquerda para a direita: 0, 1, 10, 50 e 100 ng/mL) e (B) a curva de calibração da detecção quantitativa.

3.3.4.6 A detecção de PSA sem impressão de cera na membrana de detecção

Ainda foi realizado um teste sem a utilização de impressão de cera sobre a membrana de nitrocelulose, com o objetivo de simplificar

ainda mais o sistema. Para esta arquitetura, como pode ser observado na Figura 57, o dispositivo também apresentou um bom desempenho.

A Figura 57 (A) mostra as fotografias das zonas de detecção obtidas após a realização dos ensaios com diferentes concentrações de PSA, com variação de 0 a 150 ng/mL. A análise qualitativa é facilmente realizada por meio da observação da mudança de cor no ponto de teste da zona de detecção, onde verificou-se que a intensidade da cor para 10 ng/mL de PSA foi significativamente mais intensa que a amostra na ausência de PSA. A Figura 57 (B) mostra um gráfico do sinal analítico avaliado em função da concentração de PSA, em que uma relação linear foi encontrada no intervalo de 10 ng/mL a 150 ng/mL. O LOD estimado foi de 2,3 ng/mL. Esse valor foi um pouco mais alto que o LOD encontrado a partir da impressão de cera sobre a membrana de detecção.

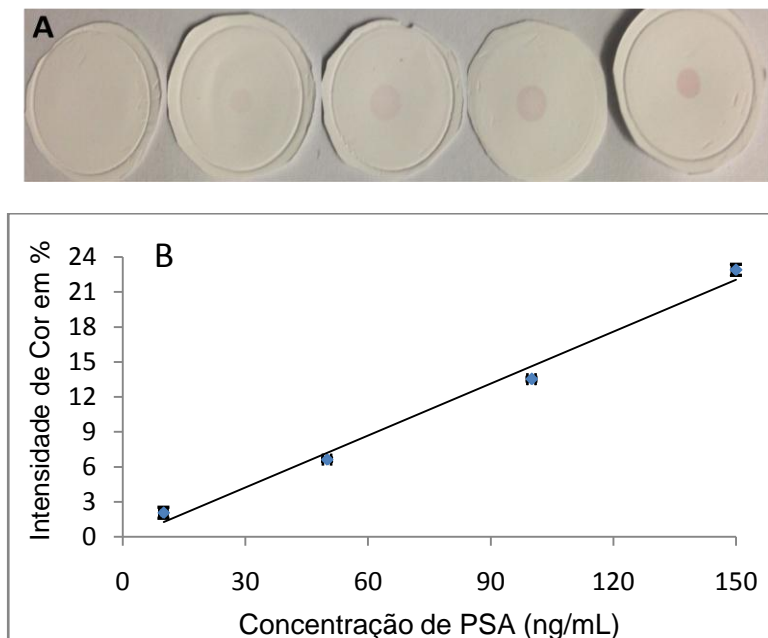


Figura 57: (A) Fotografia do imunoenensaio de fluxo vertical em diferentes concentrações de PSA (da esquerda para a direita: 0, 10, 50, 100 e 150 ng/mL); e (B) curva de calibração a partir da análise quantitativa.

CAPÍTULO 4: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

4.1: Conclusões

O estudo dos biossensores realizado nesta tese é uma contribuição bastante significativa para a pesquisa desenvolvida no país, uma vez que métodos analíticos mais rápidos para monitoramento de diversos analitos são necessários, assim como, novas aplicações e processos reais precisam ser entendidos, descritos e discutidos na literatura.

Neste trabalho produzimos com sucesso filmes contendo Feof-b, um material biológico derivado da planta *Turnera subulata* Sm., juntamente com a goma natural do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) e o polímero PAH, utilizando a técnica de automontagem, que é considerada uma técnica simples, de baixo custo e bem aceita na literatura.

O processo de adsorção do filme PAH/Feof-b é considerado autoregulado, de modo que a relação linear entre a absorbância e o número de bicamadas indicou que a mesma quantidade de material foi adsorvida a cada etapa de deposição dos filmes. A espessura encontrada para o filme de PAH/Feof-b foi de aproximadamente 5 nm por bicamada.

Os filmes exibiram um comportamento eletroquímico que variou de acordo com os polieletrólitos incorporados em conjunto com a Feof-b. Através dos estudos voltamétricos foi possível identificar o processo de oxidação da Feof-b, onde pode ser observado que o filme com três monocamadas de Feof-b apresentou a maior corrente de pico anódica e uma boa definição do pico de potencial anódico, demonstrando que este material é muito promissor. O perfil eletroquímico dos filmes formados com Feof-b foram influenciados pela sequência de deposição quando intercalados com a goma do cajueiro ou com a PAH, apresentando diferentes valores de correntes como resposta.

O desempenho dos eletrodos modificados com Feof-b foram avaliados na determinação eletroanalítica de H_2O_2 . O eletrodo de ITO modificado com o filme Goma/Feof-b exibiu a melhor resposta eletroquímica. A presença da goma natural foi muito vantajosa, uma vez que as correntes de pico catódica foram maiores para filmes contendo Goma/Feof-b, em comparação com os filmes PAH/Feof-b (em que a Feof-b é depositada na parte mais externa do filme bicamada) ou Feof-b, deste modo tornando o sensor mais eficaz para a detecção de H_2O_2 . A aplicação de um sensor amperométrico com base no filme Goma/Feof-b apresenta muitas vantagens, tais como baixo custo, fácil

manuseio e atividade electrocatalítica adequada à potencial 0,0 V. O sensor amperométrico exibiu uma resposta linear no intervalo de 3,3 mmol/L a 19,8 mmol/L, e uma rápida resposta amperométrica, estimada em 12 segundos, ao H₂O₂. Portanto, este electrodo proporciona um novo e promissor sensor para detecção de H₂O₂.

A grande contribuição deste trabalho foi a caracterização completa de um composto, a Feof-b, extraída de uma planta. A sua aplicação bem sucedida em filmes automontados com a goma do cajueiro para detecção de H₂O₂ abriu novas perspectivas para o uso desse material biológico natural em aplicações tecnológicas como sensores electroquímicos.

Além disso, foi desenvolvido um novo dispositivo, o LIS baseado em um imunoensaio fluxo de vertical (VFIA) utilizando AuNPs para a detecção de proteínas. A abordagem faz uso de cartuchos de plástico reutilizáveis, contendo um *conjugate pad* e um *detection pad*, assim como, uma seringa padrão, e não exige qualquer material adicional de laboratório. O VFIA é simples, rápido, sensível e permite a análise de volumes muito maiores do que os das amostras de imunoensaios de fluxo lateral convencionais (LFIA). As análises qualitativas são realizadas por simples abertura do cartucho de plástico observando a olho nu o aparecimento de um ponto vermelho sobre a zona de detecção. As medições quantitativas podem ser feitas usando o software de processamento de imagem padrão, em que a intensidade da cor vermelha é quantificada de acordo com uma escala normalizada.

As propriedades mencionadas tornam o LIS ideal para a análise de amostras de urina, onde o volume não é uma limitação. O LIS foi testado para detecção de Antígeno Prostático Específico (PSA) adicionado em amostras de urina humana, detectando PSA em cerca de 150 ng/mL. Este nível está dentro da gama de interesse para o diagnóstico do câncer de próstata, o que significa que este LIS pode servir como a base para uma nova geração de ferramentas de diagnóstico não invasivo que pode reduzir significativamente o número de biópsias da próstata. Além desta aplicação clínica de conceito de prova, o LIS tem um enorme potencial para aplicações em áreas como o controle de alimentos, segurança e análise ambiental.

Sendo os dois sensores apresentados de interesse público, a elaboração dos mesmos é importante para a incorporação de novas tecnologias à sociedade. Neste sentido, essa tese contribui para o

desenvolvimento de novas aplicações na área ambiental e da saúde, podendo ser testada em outros campos, como no controle de alimentos e águas contaminadas, veterinária e agricultura.

4.2 Perspectivas Futuras

Possíveis alternativas podem ser ainda exploradas para o melhoramento e continuação do desenvolvimento do sensor para detecção de peróxido de hidrogênio, como: realizar um estudo para determinar o número de bicamadas adequado para o sistema Goma/Feof-b e verificar a influência da espessura desse filme na resposta eletroquímica; investigar formas de aumentar a eficiência e sensibilidade do dispositivo; e também realizar as medidas de cronoamperometria para o eletrodo de ITO modificado com o filme multicamada de PAH/Feof-b, pois este eletrodo também exibiu excelente resposta catalítica ao peróxido de hidrogênio.

A detecção de outros analitos importantes a serem realizados utilizando o LIS baseado no ensaio de fluxo vertical, principalmente onde grande volume de amostra é necessária, torna este dispositivo favorável. Neste âmbito temos como principal perspectiva a aplicação do LIS para detecção de toxinas, em especial a saxitoxina. Essa última é uma neurotoxina que compõe a biota da Lagoa do Peri, um dos principais mananciais usado para abastecimento de água no município de Florianópolis. A sua detecção a partir do LIS apresentaria como vantagem a possibilidade de obtenção de resultados em tempo real, poucos minutos, baixo custo e além disso, permitirá o monitoramento diário da água.

CAPÍTULO 5:REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

[1] Wang, J. *Analytical electrochemistry*. Second edition, Willey-VCH, New York, 2001.

[2] Sethi, R. Transducer aspects of biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 9, p. 243- 264. 1994.

[3] Vo-Dinh, T.; Cullum, B.; Biosensors and biochips: advances in biologicaland medical diagnostics. *Fresenius J. Anal. Chem.*, v. 366, p. 540–551. 2000.

[4] Furtado, R. F.; Dutra, R. A. F.; Alves, C. R.; Pimenta, M. G. R.; Guedes, M. I. F. **Aplicações de biossensores na análise da qualidade de alimentos**, EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2008.

[5] Thévenot, D. R.; Toth, K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S.; Electrochemical biosensors: recommended definitions and Classification. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 16, p. 121–131. 2001.

[6] Hulanicki, A.; Glab, S.; Ingman, F.; Chemical sensors definition and classification. *Pure Appl. Chem.*, v. 63, p. 1247-1255, 1991.

[7] Alfaya, A. A. S.; Kubota, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. *Quim. Nova*, v. 25, p. 835-841. 2002.

[8] Pejic, B.; De Marco, R.; Parkinson, G. The role of biosensors in the detection of emerging infectious diseases. *Analyst*, v. 131, p. 1079-1090. 2006.

[9] Parolo, C.; De la Escosura-Muñiz, A.; Merkoçi, A. Enhanced lateral flow immunoassay using gold nanoparticles loaded with enzymes. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 40, p. 412-416. 2013.

[10] Laycock, M. V.; Donovan, M. A.; Easy, D.J. Sensitivity of lateral flow tests to mixtures of saxitoxins and applications to shellfish and phytoplankton monitoring. *Toxicon*, v. 55, p. 597-605. 2010.

- [11] Rodríguez-Mozaz, S.; de Alda, M.J.L.; Barceló, D. Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 386, p. 1025–1041. 2006.
- [12] Zhang, S.; Wright, G.; Yang, Y.; Materials and techniques for electrochemical biosensor design and Construction. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 15, p. 273–282. 2000.
- [13] Rumayor, V. G.; Iglesias, E. G.; Galán, O. R.; Cabezas, L. G. **Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria**. Madrid: Elecé Industria Gráfica, p. 1-113. 2005.
- [14] Faridbod, F.; Gupta, V. K.; Zamani, H. A. Electrochemical Sensors and Biosensors. *International Journal of Electrochemistry*, p. 1-2. 2011. doi:10.4061/2011/352546.
- [15] Lian, W.; Song, L. Y.; Yuan, H.; Zhao, S.; Li, P.; Chen, L. A hydrogen peroxide sensor based on electrochemically roughened silver electrodes. *Electrochimica Acta*, v. 54, p. 4334–4339. 2009.
- [16] Decher, G. Fuzzy. Nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. *Science*, v. 277, p. 1232–1237. 1997.
- [17] Crespilho, F. N.; Zucolotto, V.; Oliveira Jr.; O. N.; Nart, F. C. Electrochemistry of Layer-by-Layer Films: a review. *Int. J. Electrochem. Sci.*, v. 1, p. 194-214. 2006.
- [18] Zhao, W.; Xu, J.-J.; Chen, H.-Y. Electrochemical Biosensors Based on Layer-by-Layer Assemblies. *Electroanalysis*, v. 18, p.1737- 1748. 2006.
- [19] Nagatani, N.; Tanaka, R.; Yuhi, T.; Endo, T.; Kerman, K.; Takamura, Y.; Tamiya, E.; Gold nanoparticle-based novel enhancement method for the development of highly sensitive immunochromatographic test strips. *Sci. Technol. Adv. Mater.*, v.7, p. 270-275. 2006.

[20] Wong, R. C.; Tse, H. Y. *Lateral Flow Immunoassay*. Springer, DOI 10.1007/978-1-59745-240-3, 224 pg. 2009.

[21] Anfossi, L.; Baggiani, C.; Giovannoli, C.; D'Arco, G.; Giraudi, G. Lateral-flow immunoassays for mycotoxins and phycotoxins: a review. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 405, p. 467-480. 2013.

[22] Tanaka, R.; Yuhi, T.; Nagatani, N.; Endo, T.; Kerman, K.; Takamura, Y.; Tamiya, E. A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles. *Anal Bioanal Chem.*, v. 385, p. 1414-1420. 2006.

[23] Fernández-Sánchez, C.; McNeil, C. J.; Rawson, K.; Nilsson, O.; Leung, H. Y.; Gnanapragasam, V. One-step immunostrip test for the simultaneous detection of free and total prostate specific antigen in serum. *Journal of Immunological Methods*, v. 307, p. 1- 12. 2005.

[24] Kim, Y. M.; Oh, S. W.; Jeong, S. Y.; Pyo, D. J.; and Choi, E. Y. Development of an Ultrarapid One-Step Fluorescence Immunochromatographic Assay System for the Quantification of Microcystins. *Environ. Sci. Technol.*, v. 37, p. 1899-1904. 2003.

[25] De la Escosura-Muñiz, A.; Parolo, C.; Merkoçi, A. Immunosensing using nanoparticles. *Materials Today*, v. 13, p. 24-34. 2010.

[26] Lou, S.; Ye, J.-Y.; Li, K.-Q.; Wu, A.; A gold nanoparticle-based immunochromatographic assay: The influence of nanoparticulate size. *Analyst*, v. 137, p. 1174-1181. 2011.

[27] Posthuma-Trumpie, G. A.; Korf, J.; van Amerongen, A.; Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 393, p. 569-82. 2009.

[28] Thobhani, S.; Attree, S.; Boyd, R.; Kumarswami, N.; Noble, J.; Szymanski, M.; Porter, R.A. Bioconjugation and characterisation of gold colloid-labelled proteins. *J. Immunol. Methods*, v. 356, p. 60-69. 2010.

- [29] Parolo, C.; de la Escosura-Muniz, A.; Polo, E.; Grazu, V.; de la Fuente, J. M.; Merckoci, A. Design, preparation, and evaluation of a fixed-orientation antibody/gold-nanoparticle conjugate as an immunosensing label. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, v. 5, p. 10753–10759. 2013.
- [30] Decher, G.; Hong, J. D.; Schmitt, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films*, v. 210/211, p. 831-835. 1992.
- [32 = 31] Lvov, Y.; Haas, H.; Decher, G.; Möhwald, H. Assembly of Polyelectrolyte Molecular Films onto Plasma-Treated Glass. *J. Phys. Chem.*, v. 97, p. 12835-12841. 1993.
- [32] Lvov, Y.; Decher, G. Möhwald, H.; Assembly, Structural Characterization, and Thermal Behavior of Layer-by-Layer Deposited Ultrathin Films of Poly(vinyl sulfate) and Poly(allylamine). *Langmuir*, v. 9, p. 481-486. 1993.
- [33] Paterno, L. G.; Mattoso, L. H. C.; De Oliveira, O. N. Filmes poliméricos ultrafinos produzidos pela técnica de automontagem: Preparação, propriedades e aplicações. *Química Nova*, v. 24, p. 228-235. 2001.
- [34] Raposo, M.; Oliveira Jr., O. N. Adsorption Mechanisms in Layer-by-Layer Films. *Braz. J. Phys.*, v. 28, n. 4. 1998.
- [35] Stockton, W. B.; Rubner, M. F. Molecular-Level Processing of Conjugated Polymers. 4. Layer-by-Layer Manipulation of Polyaniline via Hydrogen-Bonding Interactions. *Macromolecules*, v. 30, p. 2717-2725. 1997.
- [36] Anzai, J.; Kobayashi, Y.; Nakamura, N.; Nishimura M.; Hoshi, T. Layer-by-Layer Construction of Multilayer Thin Films Composed of Avidin and Biotin-Labeled Poly(amine)s. *Langmuir*, v. 15, p. 221-226. 1999.

[37] Kharlampieva, E.; Kozlovskaya, V.; Sukhishvili, S. A.; Layer-by-Layer Hydrogen-Bonded Polymer Films: From Fundamentals to Applications. *Adv Mater.*, v. 21, p. 3053-3065. 2009.

[38] Zhou, L.; Chen, M.; Tian, L.; Guan, Y.; Zhang, Y. Release of Polyphenolic Drugs from Dynamically Bonded Layer-by-Layer Films. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, v. 5, p. 3541-3548. 2013.

[39] Witt, M. A.; Valenga, F.; Dotto, M. E. R.; Bechtold, I. H.; Felix, O.; Pires, A. T. N.; Decher, G. Layer-by-Layer Assembled Films Composed of 'Charge Matched' and 'Length Matched' Polysaccharides: Self-Patterning and Unexpected Effects of the Degree of Polymerization. *Biointerphases*, v. 7:64, p. 1-10. 2012.

[40] Araújo, I. M. S.; Zampa, M. F.; Moura, J. B.; dos Santos Jr., J. R.; Eaton, P.; Zucolotto, V.; Veras, L. M. C.; de Paula, R. C. M.; Feitosa, J. P. A.; Leite J. R. S. A.; Eiras, C. Contribution of the cashew gum (*Anacardium occidentale* L.) for development of layer-by-layer films with potential application in nanobiomedical devices. *Materials Science and Engineering C*, v. 32, p. 1588-1593. 2012.

[41] Barros, S. B. A.; Leite, C. M. d-S.; de Brito, A. C. F.; dos Santos Jr., J. R.; Zucolotto, V.; Eiras, C. Multilayer films electrodes consisted of cashew gum and polyaniline assembled by the layer-by-layer technique: electrochemical characterization and its use for dopamine determination. *International Journal of Analytical Chemistry*, v. 2012, p. 1-10. 2012.

[42] Torquato, D. S.; Ferreira, M. L.; Sá, G. C.; Brito, E. S.; Pinto, G. A. S.; Azevedo, E. H. F. Evaluation of antimicrobial activity of cashew tree gum. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 20, p. 505-507. 2004.

[43] Monthe, C. G.; Souza, I. A.; Calazans, G. M. T. Antitumor activity of cashew gum from *Anacardium occidentale* L. *Medical Nutrition.*, v. 19, p. 50-52. 2008.

[44] Calin, M. A.; Parasca, S. V. Photodynamic therapy in oncology. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, v. 8, p. 1173- 1179. 2006.

- [45] Li, W.-T.; Tsao, H.-W.; Chen, Y.-Y.; Cheng, S.-W.; Hsu, Y.-C. A study on the photodynamic properties of chlorophyll derivatives using human hepatocellular carcinoma cells. *Photochem. Photobiol. Sci.*, v. 6, p. 1341–1348. 2007.
- [46] Sternberg, E. D.; Dolphin, D.; Porphyrin-based Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. *Tetrahedron*, v. 54, p. 4151- 4202. 1998.
- [47] Brito Filho, S. G.; Fernandes, M. G.; Souza-Chaves, O.; Chaves, M. C. O.; Araruna, F. B.; Eiras, C.; Leite, J. R. S. A.; Agra, M. F.; Braz-Filho, R.; Souza, M. F. V. Chemical constituents isolated from *Turnera subulata* Sm. and electrochemical characterization of phaeophytin b. *Quim. Nova*, v. 37, p. 603-609. 2014.
- [48] Lvov, Y.; Ariga, K.; Ichinose, I.; Kunitake, T. Assembly of Multicomponent Protein Films by Means of Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 117, p. 6117-6123. 1995.
- [49] Ferreira, M.; Fiorito, P. A.; Oliveira Jr., O. N.; Torresi, S. I. C. Enzyme-mediated amperometric biosensors prepared with the Layer-by-Layer (LbL) adsorption technique. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 19, p. 1161-1615. 2004.
- [50] Zou, Y.; Xiang, C.; Sun, L.; Xu, F. Amperometric glucose biosensor prepared with biocompatible material and carbon nanotube by layer-by-layer self-assembly technique. *Electrochimica Acta*, v. 53, p. 4089 – 4095. 2008.
- [51] Zucolotto, V.; Ferreira, M.; Cordeiro, M. R.; Constantino, C. J. L.; Moreira, W. C.; Oliveira Jr., O. N. Nanoscale manipulation of polyaniline and phthalocyanines for sensing applications. *Sens. Actuators B*, v. 113, p. 809-815. 2006.
- [52] Siqueira Jr., J. R.; **Filmes Automontados de Auitosana/Metaloftalocianinas: Caracterização e Aplicação em**

Sensores. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

[53] Zampa, M. F.; Araújo, I. M. de S.; Dos Santos Jr., J. R.; Zucolotto, V.; Leite, J. R. S. A.; Eiras, C. Development of a novel Biosensor Using Cationic Antimicrobial Peptide and Nickel Phthalocyanine Ultrathin Films for Electrochemical Detection of Dopamine. *International Journal of Analytical Chemistry*, v. 2012, 1-7. 2012.

[54] Zucolotto, V. **Compósitos Poliméricos Nanoestruturados de Azocorantes, Ftalocianinas e Polímeros Luminescentes.** Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

[55] Armand, F.; Cabezón, B.; Martínez-Díaz M. V.; Ruau-del-Teixie, A.; Torres, T.; Organization of triazolephthalocyanines in Langmuir-Blodgett films. *J. Mater. Chem.*, v. 7, p. 1741. 1997.

[56] Blodgett, K. Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface. *J. Am. Soc.*, v. 57, p. 1007-1022. 1934.

[57] Netzer, L.; Sagiv, J. A New Approach to Construction of Artificial Monolayer Assemblies. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 105, p. 674-676. 1983.

[58] Siqueira Jr., J. R.; Caseli, L.; Crespilho, F. N.; Zucolotto, V.; Oliveira Jr., O. N. Immobilization of biomolecules on nanostructured films for biosensing. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 25, p. 1254-1263. 2010.

[59] Zucolotto, V.; Strack, P. J.; Santos, F. R.; Balogh, D. T.; Constantino, C. J. L.; Mendonça, C. R.; Oliveira Jr., O. N. Molecular engineering strategies to control photo-induced birefringence and surface-relief gratings on layer-by-layer films from an azopolymer. *Thin Solid Films*, v. 453-454, p. 110-113. 2004.

[60] Ariga, K.; Lvov, Y.; Kunitake, T. Assembling Alternate Dye-Polyion Molecular Films by Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 119, p. 2224-2231. 1997.

[61] Lvov, Y.; Ariga, K.; Onda, M.; Ichinose, I.; Kunitake, T. Alternate Assembly of Ordered Multilayers of SiO₂ and Other Nanoparticles and Polyions. *Langmuir*, v. 13, p. 6195-6203. 1997.

[62] Raposo, M. Oliveira Jr., O. N. Adsorption of Poly(*o*-methoxyaniline) in Layer-by-Layer Films. *Langmuir*, v. 18, p. 6866-6874. 2002.

[63] Pereira, A.; Alves, S.; Casanova, M.; Zucolotto, V.; Bechtold, I. H. The use of colloidal ferrofluid as building blocks for nanostructured layer-by-layer films fabrication. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 12, p. 2779-2785. 2010.

[64] Zampa, M. F.; **Caracterização físico-química e aplicação de filmes automontados contendo ftalocianinas de níquel e ferro e gomas naturais do chichá (*Sterculia striata*) e da caraia (*Sterculia urens*)**. Dissertação de Mestrado em Química, Universidade Federal do Piauí, UFPI, Brasil, 2007.

[65] Brett, C. M. A.; Oliveira-Brett, A. M.; *Electrochemistry: Principles, Methods and Applications*. Oxford University Press, Oxford, 1993.

[66] Soares, R. R. S.; **Estudo de propriedades da Clorofila a e da Feofitina-a visando a Terapia Fotodinâmica**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Maringá, Brasil, 2006.

[67] Mendes, M. C. **Estudo das propriedades das porfirinas TMPyP e ZnTPPS4 para potencial aplicação em Terapia Fotodinâmica**. Dissertação de mestrado em química, Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2008.

[68] Pereira, A. M. V. M.; **Síntese de derivados oligoméricos de porfirinas e ftalocianinas**. Universidade de Aveiro, 2009.

[69] Valente, J. M. A.; **Compostos pirrólicos para células foto-voltaica**. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade de Coimbra, 2010

[70] Moreira, L. M.; Rodrigues, M. D.; Oliveira, P, H. P. M. Influencia de diferentes sistemas de solvente água-etanol sobre as propriedades físicos-químicas e espectroscópica dos compostos macrociclos feofitina e clorofila-a. *Química Nova*, v. 33, p. 258-262. 2010.

[71] Streit, N. M.; Canterle, L. P.; Canto, M. W.; Hecktheuer, L. H. H.; As Clorofilas. *Ciência Rural*, v. 35, p. 748 – 755. 2005.

[72] Maestrin, A. P. J.; Neri, C. R.; de Oliveira, K. T.; Serra, O. A.; Yamamoto, Y. Extração e purificação de clorofila A, da alga *Spirulina maxima*: um experimento para os cursos de química. *Quim. Nova*, v. 32, n. 6, p. 1670-1672. 2009.

[73] Kobayashi, M.; Akutsu, S.; Fujinuma, D.; Furukawa, H.; Komatsu, H.; Hotota, Y.; Kato, Y.; Kuroiwa, Y.; Watanabe, T.; Ohnishi-Kameyama, M.; Ono, H.; Ohkubo, S.; Miyashita, H. *Physicochemical Properties of Chlorophylls in Oxygenic Photosynthesis - Succession of Co-Factors from Anoxygenic to Oxygenic Photosynthesis*. Intech, Editor: Z. Dubinsky, Chapter 3, p. 47-90, 2013.

[74] Maia, L. M. J. **Azeites Dop: Avaliação dos Carotenóides Maioritários (P-Caroteno e Luteína)**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 2006.

[75] Bellamy, W. D.; Gaines, G. L.Jr.; Tweet, G. A.; Preparation and Properties of Monomolecular Films of chlorophyll a and Pheophytin a. *The Journal of Chemical Physics*, v. 19, p. 2528-2538. 1963.

[76] Langmuir, I.; Schaefer, V. J. Composition of Fatty Acid Films on Water Containing Calcium or Barium Salts. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 58, p. 284-287. 1936.

[77] Da Cunha, P. L. R.; de Paula, R. C. M.; Feitosa, J. P. A. “Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: Uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico,” *Química Nova*, v. 32, p. 649–660. 2009.

[78] Eiras, C.; Passos, I. N. G.; de Brito, A. C. F.; dos Santos Jr., J. R.; Zucolotto, V.; Oliveira Jr., O. N.; Kitagawa, I. L.; Constantino, C. J. L.;

da Cunha, H. N. Nanocompósitos eletroativos de poli-*o*-metoxianilina e polissacarídeos naturais. *Quim. Nova*, v. 30, p. 1158-1162. 2007.

[79] Zampa, M. F.; de Brito, A. C. F.; Kitagawa, I. L.; Constantino, C. J. L.; Oliveira Jr., O. N.; da Cunha, H. N.; Zucolotto, V.; dos Santos Jr., J. R.; Eiras, C. Natural Gum-Assisted Phthalocyanine Immobilization in Electroactive Nanocomposites: Physicochemical Characterization and Sensing Applications. *Biomacromolecules*, v. 8, p. 3408-3413. 2007.

[80] Eiras, C.; Santos, A. C.; Zampa, M. F.; Brito, A. C. F.; Constantino, C. J. L.; Zucolotto, V.; Santos Jr., J. R. Natural Polysaccharides as Active Biomaterials in Nanostructured Films for Sensing. *J. Biomater. Sci. Polym.*, v. 21, p. 1533-1543. 2010.

[81] Silva, T. M.; Santiago, P. O.; Purcena, L. L. A.; Fernandes, K. F. Study of the cashew gum polysaccharide for the horseradish peroxidase immobilization - Structural characteristics, stability and recovery. *Materials Science and Engineering C*, v.30, p. 526-530. 2010.

[82] Sarubbo, L. A.; Campos-Takaki, G. M.; Porto, A. L. F.; Tambourgi, E. B.; Oliveira, L. A. A goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) como sistema inovador de extração líquido-líquido. *Exacta*, v. 5, p. 145-54. 2007.

[83] de Paula, R. C. M.; Rodrigues, J. F.; "Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L.," *Carbohydrate Polymers*, v. 26, p. 177-181. 1995.

[84] Mothé, C. G.; Rao, M. A. Thermal behavior of gum arabic in comparison with cashew gum. *Thermochimica Acta*, v. 357-358, p. 9-13. 2000.

[85] Silva, D. A.; Feitosa, J. P. A. Maciel, J. S.; Paula, H. C. B.; de Paula R. C. M. Characterization of crosslinked cashew gum derivatives. *Carbohydrate Polymers*, v. 66, p. 16-26. 2006.

[86] De Mattos, I. L.; Shiraishi, K. A.; Braz, A. D.; Fernandes, J. R. Peróxido de hidrogênio: importância e determinação. *Química Nova*, v. 26, p. 373-380. 2003.

[87] Strukul, G. (editor); *Catalytic oxidations with hydrogen peroxide as oxidant*, V. 9, chapter 1 (Introduction and Activation Principles), 1992.

[88] Chang, M. C. Y.; Pralle, A.; Isacoff, E. Y.; Chang, C. J. A Selective, Cell-Permeable Optical Probe for Hydrogen Peroxide in Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 126, p. 15392- 15393. 2004.

[89] Lu, X.; Zhou, J.; Lu, W.; Liu, Q.; Li, J. Carbon nanofiber-based composites for the construction of mediator-free biosensors. *Biosens. and Bioelectron.*, v. 23, p. 1236- 1243. 2008.

[90] Shu, X.; Chen, Y.; Yuan, H.; Gao, S; Xiao, D. H₂O₂ Sensor Based on the Room-Temperature Phosphorescence of Nano TiO₂/SiO₂ Composite. *Anal. Chem.*, v. 79, p. 3695-3702. 2007.

[91] King, D. W.; Cooper, W. J.; Rusak, S. A.; Peake, B. M.; Kiddle, J. J.; O'Sullivan, D. W.; Melamed, M. L.; Morgan, C. R.; Theberge, S. M. Flow Injection Analysis of H₂O₂ in Natural Waters Using Acridinium Ester Chemiluminescence: Method Development and Optimization Using a Kinetic Model. *Anal. Chem.*, v. 79, p. 4169-4176. 2007.

[92] Jia, J.; Wang, B.; Wu, A.; Cheng, G.; Li, Z.; Dong, S. A Method to Construct a Third-Generation Horseradish Peroxidase Biosensor: Self-Assembling Gold Nanoparticles to Three-Dimensional Sol-Gel Network. *Anal. Chem.*, v. 74, p. 2217-2223. 2002.

[93] Zhang, J.; Oyama, M. A hydrogen peroxide sensor based on the peroxidase activity of hemoglobin immobilized on gold nanoparticles-modified ITO electrode. *Electrochimica Acta*, v. 50, p. 85-90. 2004.

[94] Wang, L.; Wang, E. A novel hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase immobilized on colloidal Au modified ITO electrode. *Electrochemistry Communications*, v. 6, p. 225-229. 2004.

- [95] Wolfbeis, O. S.; Dürkop, A.; Wu, M.; Lin, Z. A Europium-Ion-Based Luminescent Sensing Probe for Hydrogen Peroxide *Angew. Chem. Int. Ed.*, v. 41, p. 4495-4498, (2002)
- [96] Zhang, L.; Zhai, Y.; Gao, N.; Wen, D.; Dong, S. Sensing H₂O₂ with layer-by-layer assembled Fe₃O₄-PDDA nanocomposite film. *Electrochemistry Communications*, v. 10, p. 1524–1526. 2008.
- [97] De Paula, R. C. M.; Heatley, F.; Budd, P. M.; Characterization of Anarcadium occidentale exsudate polysaccharide. *Polym. Int.*, v. 45, p. 27-35. 1998.
- [98] Lima, A. C.; Dos Santos, R. A.; Almeida, F. A. G.; Bandeira, C. T. Estimulantes químicos na extração da goma de cajueiro (Anacardium occidentale, L.). *Cienc. Rural, Santa Maria*, v. 31, p. 409-415. 2001.
- [99] Costa, S. M. O.; Rodrigues, J. F.; de Paula, R. C. M.; Polímeros: *Ciência e Tecnologia*, v. 6, p. 49-55. 1996.
- [100] De Brito Filho, S. G.; **Feofitinas e esteroides glicosilados de Turnera subulata Sm. (Turneraceae)**. Dissertação de Mestrado, João Pessoa, Paraíba, 2011.
- [101] Gerola, A. P.; Santana, A.; França, P. B.; Tsubone, T. M.; de Oliveira, H. P. M.; Caetano, W.; Kimura, E. Hioka, N.; Effects of Metal and the Phytyl Chain on Chlorophyll Derivatives: Physicochemical Evaluation for Photodynamic Inactivation of Microorganisms. *Photochemistry and Photobiology*, v. 87, p. 884-894. 2011.
- [102] Elbert, D. L.; Herbert, C. B.; Hubbell, J. A. Thin Polymer Layers Formed by Polyelectrolyte Multilayer Techniques on Biological Surfaces. *Langmuir*, v. 15, p. 5355-5362. 1999.
- [103] Lavallo, P.; Gergely, C.; Cuisinier, F. J. G.; Decher, G.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Picart, C. Comparison of the Structure of Polyelectrolyte Multilayer Films Exhibiting a Linear and an Exponential Growth Regime: An in Situ Atomic Force Microscopy Study. *Macromolecules*, v. 35, p. 4458-4465. 2002.

[104] Tezcaner, A.; Hicks, D.; Boulmedais, F.; Sahel, J.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C.; Lavalle, P. Polyelectrolyte Multilayer Films as Substrates for Photoreceptor Cells. *Biomacromolecules*, v. 7, p. 86-94. 2006.

[105] Nunes, G. E.; Sehnem, A. L.; Bechtold, I. H. Self-assembled azo-dye film as an efficient liquid crystal aligning layer. *Liquid Crystals*, v. 39, p. 205-210. 2012.

[106] Parolo, C.; Merkoci, A. Paper-based nanobiosensors for diagnostics. *Chem. Soc. Rev.*, v. 42, p. 450-457. 2013.

[107] Lu, S-Y.; Lin, C.; Li, Y-S.; Zhou, Y.; Meng, X-M.; Yu, S-Y.; Li, Z-H.; Li, L.; Ren, H-L.; Liu, Z-S. A screening lateral flow immunochromatographic assay for on-site detection of okadaic acid in shellfish products. *Analytical Biochemistry*, v. 422, p. 59-65. 2012.

[108] Lopez-Marzo, A. M.; Pons, J.; Blake, D. A. Merkoci, A.; High sensitive gold-nanoparticle based lateral flow immunodevice for Cd²⁺ detection in drinking Waters. *Biosens. and Bioelectron.*, v. 47, p. 190-198. 2013.

[109] Preechakasedkit, P.; Pinwattana, K.; Dungchai, W.; Siangproh, W.; Chaicumpa, W.; Tongtawe, P.; Chailapakul, O. Development of a one-step immunochromatographic strip test using gold nanoparticles for the rapid detection of Salmonella typhi in human serum. *Biosens. and Bioelectron.*, v. 31, p. 562-566, (2011).

[110] Martinez, A. W.; Phillips, S. T.; Butte, M. J.; Whitesides, G. M. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angew. Chem. Int. Ed.*, v. 46, p. 1318-1320. 2007.

[111] Parolo, C.; Medina-Sanchez, M.; de la Escosura-Muniz, A.; Merkoci, A. Simple paper architecture modifications lead to enhanced sensitivity in nanoparticle based lateral flow immunoassays. *Lab on a Chip*, v. 13, p. 386-390. 2013.

[112] Bolduc, S.; Lacombe L.; Naud A.; Gregoire, M.; Fradet, Y.; Tremblay, R.R. Urinary PSA: a potential useful marker when serum

PSA is between 2.5 ng/mL and 10 ng/mL. *Can. Urol. Assoc. J.*, v. 1, p. 377-3781. 2007.

[113] Irani, J.; Millet, C.; Levillain, P.; Dore', B.; Begon, F.; Aubert, J. Serum-to-urinary prostate specific antigen ratio: its impact in distinguishing prostate cancer when serum prostate specific antigen level is 4 to 10 ng/mL. *J. Urol.*, v. 157, p. 185-188. 1997.

[114] Bolduc, S.; Brant, A.; Lacombe L.; Fradet, Y.; Tremblay, R. R.; Early detection of prostate câncer local recurrence by urinary prostate-specific antigen. *Can. Urol. Assoc. J.*, v. 3, p. 213-218. 2009.

[115] Sato, I.; Sagi, M.; Ishiwari, A.; Nishijima, H.; Ito, E.; Mukai, T. Use of the "SMITEST" PSA card to identify the presence of prostate-specific antigen in semen and male urine. *Forensic Sci. Int.*, v. 127, p. 71-74. 2002.

[116] Malavaud, B.; Salama, G.; Miedouge, M.; Vincent, C.; Rischmann, P.; Sarramon, J.P.; Serre, G. Influence of digital rectal massage on urinary prostate-specific antigen: interest for the detection of local recurrence after radical prostatectomy. *The Prostate*, v. 34, p. 23-28. 1998.

[117] Heck, J.; Giombelli, L. F.; Colacite, J.; de Oliveira, C. L. Avaliação do nível sérico de antígeno prostático específico (PSA) e relação com hiperplasia benigna prostática e câncer de próstata em pacientes atendidos em um laboratório de análises clínicas. *Acta Biomedica Brasiliensia*, v. 4, p. 56-66. 2013.

[118] Ploussard, G.; de la Taille, A. Urine biomarkers in prostate câncer. *Nat Rev Urol.*, v. 7, p. 101-109. 2010.

[119] Fowler, J. M.; Wong, D. K. Y.; Halsall, H. B.; Heineman, W. R. *Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications*. Edited by Xueji Zhang; Huangxian Ju; Joseph Wang. Chapter 5, p. 115-144. 2008.

- [120] Gil, E. de S.; Kubota, L. T.; Yamamoto, Y. I. Alguns aspectos de imunoenaios aplicados à química analítica. *Quím. Nova*, v.22, p. 874-881. 1992.
- [121] Paek, S.; Lee, S.; Cho, H.; Kim, Y. Development of rapid one-step immunochromatographic assay. *Methods*, v. 22, p. 53-60. 2000.
- [122] Millipore, *Rapid Lateral Flow Test Strips. Considerations for Product Development*. Millipore corporation.
- [123] Chícharo, J. A. de N. **Spintronic Lateral Flow Biochip Platform**. Master in Biomedical Engineering, Instituto superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, 2012.
- [124] Anfossi, L.; Baggiani, C.; Giovannoli, C.; Giraudi, G. *Lateral Flow Immunoassays for Aflatoxins B and G and for Aflatoxin M1*. Edited by Mehdi Razzaghi-Abyaneh; Chapter 15, p. 315-339, 2013.
- [125] Ngom, B.; Guo, Y.; Wang, X.; Bi, D. Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review. *Anal Bioanal Chem.*, v. 397, p. 1113-1135. 2010.
- [126] Makhsin, S. R.; Razak, K. A.; Noordin, R.; Zakaria, N. D.; Chun, T. S. The effects of size and synthesis methods of gold nanoparticle-conjugated M - HlgG4 for use in an immunochromatographic strip test to detect brugian filariasis. *Nanotechnology*, v. 23, 495719, p. (13pg). 2012.
- [127] Rocha, L. B. **Desenvolvimento e padronização de testes imunomatográficos para diagnósticos de Escherichia xoli produtora da toxina Shiga (STEC) e Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC)**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- [128] Toma, H. E.; *O mundo nanométrico: a dimensão do novo século*, Ed. Oficina de Textos: São Paulo. 2004.
- [129] Hu, M.; Chen, J.; Li, Z.-Y.; Au, L.; Hartland, G. V.; Li, X.; Marquez, M.; Xia, Y.; Gold nanostructures: engineering their plasmonic

properties for applications. *Chemical Society Reviews*, v. 35, p. 1084-1094. 2006.

[130] Liz-Marzán, L. M. Nanometals: formation and color. *Materials Today*, v. p. 7, 26-31. 2004.

[131] Jain, P. K.; Huang, X.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology, and Medicine. *Accounts of Chemical Research*, v. 41, p. 1578-1586. 2008.

[132] Zhao, P.; Li, N.; Astruc, D. State of the art in gold nanoparticle synthesis. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 257, p. 638-665. 2013.

[133] Turkevich, J.; Stevenson P. C.; Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, v. 11, p. 55 -75. 1951.

[134] Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid system. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, p. 801-802. 1994.

[135] Li, C.; Li, D.; Wan, G.; Xu, J.; Hou, W.; Facile synthesis of concentrated gold nanoparticles with low size-distribution in water: temperature and pH controls. *Nanoscale Research Letters*, v. 6, 10 pg. 2011.

[136] Frens, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature: Phys Sci.*, 241, p. 20-22. 1973.

[137] Ojea-Jiménez, I.; Romero, F. M.; Bastús, N. G.; Puentes, V. Small Gold Nanoparticles Synthesized with Sodium Citrate and Heavy Water: Insights into the Reaction Mechanism. *The Journal of Physical Chemistry C.*, v. 114, p. 1800-1804. 2010.

[138] Toma, H. E.; Bonifácio, L. da S.; Anaissi, F. J.; Da cor à cor inexistente: uma reflexão sobre espectros eletrônicos e efeitos cromáticos. *Quim. Nova*, v. 28, p. 897-900. 2005.

[139] Ambrosi, A.; Airo, F.; Merkoçi, A.; Enhanced Gold Nanoparticle Based ELISA for a Breast Cancer Biomarker. *Anal. Chem.*, v. 82, p. 1151-1156. 2010.

[140] Gao, X.; Xu, L.-P.; Zhou, S.-F.; Liu, G.; Zhang, X. Recent Advances in Nanoparticles-based Lateral Flow Biosensors. *Am. J. Biomed. Sci.*, v. 6(1), p. 41-57. 2014.

[141] Wang, L.; Chen, W.; Ma, W.; Liu, L.; Ma, W.; Zhao, Y.; Zhu, Y.; Xu, L.; Kuang, H.; Xu, C. Fluorescent strip sensor for rapid determination of toxins. *Chem. Commun.*, v. 47, p. 1574-1576. 2011.

[142] Danks, C.; Barker, I. On-site detection of plant pathogens using lateral-flow devices. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, v. 30, p. 421-426. 2000.

[143] Preechakasedkit, P.; Pinwattan, K.; Dungchai, W.; Siangproh, W.; Chaicumpa, W.; Tongtawe, P.; Chailapakul, O. Development of a one-step immunochromatographic strip test using gold nanoparticles for the rapid detection of *Salmonella typhi* in human serum. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 31, p. 562-566. 2012.

[144] Choi, D. H.; Lee, S. K.; Oh, Y. K.; Bae, B. W.; Lee, S. D.; Kim, S.; Shin Y.-B.; Kim, M.-G. A dual gold nanoparticle conjugate-based lateral flow assay (LFA) method for the analysis of troponin I. *Biosens. and Bioelectron.*, v. 25, p. 1999-2002. 2010.

[145] Xu, H.; Mao, X.; Zeng, Q.; Wang, S.; Kawde, A.-N.; Liu, G. Aptamer-functionalized gold nanoparticles as probes in a dry-reagent strip biosensor for protein analysis. *Analytical Chemistry*, v. 81, p. 669-675. 2008.

Anexo 1

Procedimento para medida da intensidade de cor empregando o programa ImageJ.

O protocolo para medir intensidade de cor com a *ImageJ* está disponível on-line em um protocolo de uma universidade no Chile. Este protocolo pode ser encontrado no link:

http://docencia.med.uchile.cl/evolucion/textos2005/LAB_PIGMENTO/PROTOCOLO_PIGMENTO.doc

Este protocolo foi utilizado com uma pequena modificação.

- 1) Instale o *ImageJ* em seu computador com clique no ícone WCIF_ *ImageJ*_setup;
- 2) Abrir com clique o novo ícone (microscópio) do *ImageJ*;
- 3) Abra o menu de arquivo do *ImageJ* e clique em abrir;
- 4) Na janela que abrir, selecione a imagem que será analisada em *ImageJ*;
- 5) A análise de cor requer que a imagem esteja em uma imagem de escala cinza. O método mais simples para converter em tons de cinza é ir em *Image*> *Type*> *8-bit*;
- 6) Agora você deve configurar o *ImageJ* para medir a intensidade da cor de para uma área fixa. Para isso, abra o menu de análise, e clique para selecionar SET MEASUREMENTS. Nesta janela, selecione GRAY MEAN VALUE e a AREA (todo o resto deve ser desmarcada). Clique em OK;
- 7) Para escolher a área, clique na ferramenta de CYCLE SELECTIONS na barra de ferramentas do *ImageJ* (em arquivos). Esta ferramenta deve ficar sombreada. Agora você pode começar a medir;
- 8) Desenhe um círculo em torno do primeiro ponto de teste. A partir do menu de análise, clique em MEASURE. Uma nova janela deve aparecer com números. Um deles correspondente a área do círculo e o outro a intensidade do ciclo;
- 9) Depois, colocar o ciclo com a mesma área sobre o segundo ponto de teste da Figura. A partir do menu de análise, clique em MEASURE. Outras linhas devem aparecer com números, uma das quais é a área (que deve ser igual à área do primeiro ponto de teste) e a outra é a intensidade correspondente ao segundo ponto de teste. Repetir, para todos os pontos

de teste que existem (será exibido em ordem as novas linhas com os valores das intensidades dos pontos de testes correspondentes).