

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Programa de Pós-Graduação em Química

Paulo César Melquíades Santos

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ELETRODOS DE GRAFITE
FUNCIONALIZADOS COM FILMES DE HOMOPOLÍMEROS, COPOLÍMEROS E
BICAMADAS PARA USO EM BIOCENSORES**

Diamantina

2020

Paulo César Melquíades Santos

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ELETRODOS DE GRAFITE
FUNCIONALIZADOS COM FILMES DE HOMOPOLÍMEROS, COPOLÍMEROS E
BICAMADAS PARA USO EM BIOSSENSORES**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Franco Ferreira
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Hélen Rodrigues Martins

Diamantina

2020

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S237e

Santos, Paulo César Melquiades

Desenvolvimento e caracterização de eletrodos de grafite funcionalizados com filmes de homopolímeros, copolímeros e bicamadas para uso em biossensores / Paulo César Melquiades Santos, 2020.

98 p. il.

Orientador: Lucas Franco Ferreira

Coorientadora: Hélen Rodrigues Martins

Dissertação (Mestrado- Programa de Pós-Graduação em Química)
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri,
Diamantina, 2020.

1. Filmes poliméricos. 2. Bicamadas. 3. Copolimerização. 4. Caracterização. 5. Eletropolimerização. 6. Imunossensor. 7. Impedimétrico. I. Ferreira, Lucas Franco. II. Martins, Hélen Rodrigues III. Título. IV. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 540

Ficha Catalográfica – Sistema de Bibliotecas/UFVJM

Bibliotecária: Viviane Pedrosa – CRB6/2641



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

PAULO CÉSAR MELQUÍADES SANTOS

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ELETRODOS DE GRAFITE FUNCIONALIZADOS COM FILMES DE HOMOPOLÍMEROS, COPOLÍMEROS E BICAMADAS PARA USO EM BIOCENSORES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, nível MESTRADO, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA.

Data da aprovação: 17/07/2020

Orientador: Prof. Dr. Lucas Franco Ferreira

Coorientadora: Profa. Dra. Helen Rodrigues Martins

PROFA. DRA. DÉBORA VILELA FRANCO - UFVJM

Membro

PROF. DR. DIEGO LEONI FRANCO - UFU

Membro Externo à Instituição

PROF. DR. LUCAS FRANCO FERREIRA - UFVJM

Orientador

DIAMANTINA-MG

2020



Documento assinado eletronicamente por **Diego Leoni Franco, Usuário Externo**, em 17/07/2020, às 16:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Débora Vilela Franco, Servidor**, em 17/07/2020, às 17:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucas Franco Ferreira, Servidor**, em 17/07/2020, às 17:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0129564** e o código CRC **1EB6A4FD**.

Referência: Processo nº 23086.007865/2020-51

SEI nº 0129564

*Dedico este trabalho aos meus pais Paulo e Antônia de Fátima, minha esposa Monize,
minhas filhas Alice e Eloá, meus irmãos Gleice, Jéferson e Samuel.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, dono de toda ciência e sabedoria, pelo Dom da Vida, por me permitir concluir este trabalho e por nunca ter me desamparado.

Ao Prof. Dr. Lucas Franco Ferreira pela orientação, ensinamentos e liberdade de trabalho concedida durante a realização deste trabalho.

A minha esposa Monize Jane, pelo amor incondicional, companheirismo, incentivo, compreensão e apoio. As minhas filhas Alice e Eloá por compreenderem as várias horas em que estive ausente por causa do desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais Paulo Gomes dos Santos e Antônia de Fátima Melquíades Santos pelo amor, incentivo e apoio que me deram durante toda a minha vida.

Aos meus irmãos Gleice, Jéferson e Samuel pelo companheirismo, amizade, incentivo e apoio incondicional.

Aos meus colegas de laboratório do GENAp pela amizade e apoio.

Aos Professores do PPGQ, pelos conhecimentos transmitidos ao longo do curso.

A UFVJM, pela oportunidade de realização deste trabalho e pelos anos de formação profissional e a CAPES pela bolsa concedida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Aceitai a minha correção, e não a prata: e o conhecimento, mais do que o ouro fino escolhido. Porque melhor é a sabedoria do que os rubins; e de tudo o que se deseja nada se pode comparar com ela”.

(Bíblia Sagrada - Provérbios 8. 10-11).

RESUMO

Polímeros condutores são conhecidos por atuarem como excelentes materiais para imobilização de biomoléculas e rápida transferência de elétrons para a fabricação de biossensores eficientes, uma vez que, possuem grupos funcionais preservados que podem promover melhorias significativas na adsorção e interação da interface biomolécula/transdutor, evitando-se assim efeitos indesejados como, por exemplo, o de lixiviação do componente imobilizado. Neste sentido, foi investigada a eletropolimerização dos monômeros anilina (ANI), o-hidroxibenzamida (OHBA), o-aminobenzamida (OABA) e o-aminofenol (OAF) na forma de monocamada, bicamada e copolímeros sobre eletrodos de grafite, utilizando-se voltametria cíclica, para construção e desenvolvimento de plataformas eletroquímicas funcionalizadas. Foram avaliadas 22 plataformas eletroquímicas onde observou-se diferenças entre as respostas eletroquímicas das bicamadas e dos copolímeros, sugerindo que, a copolimerização não é apenas uma sobreposição dos homopolímeros como ocorre nas bicamadas. Realizou-se caracterização eletroquímica e morfológica das plataformas funcionalizadas por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE), Voltametria Cíclica (VC) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Observou-se que as plataformas funcionalizadas derivadas dos monômeros ANI, OAF e OABA apresentaram caráter majoritariamente catiônico, enquanto plataformas funcionalizadas derivadas do monômero OHBA apresentaram caráter majoritariamente aniônico. Análises de MEV possibilitaram observar diferenças morfológicas entre as plataformas funcionalizadas e o eletrodo de grafite (EG) não modificado, comprovando a modificação da superfície dos EG pelos polímeros formados. Os resultados obtidos por EIE comprovaram as observações feitas nas análises de VC para as plataformas funcionalizadas na presença das sondas redox. As plataformas funcionalizadas foram aplicadas em estudos iniciais do desenvolvimento de um imunossensor impedimétrico, através da imobilização dos antígenos recombinantes JL7, 1F8 e B13 para detecção de anticorpos da doença de Chagas em amostras clínicas. Os imunossensores desenvolvidos utilizando-se as plataformas POABA, POAF_sobre_POHBA, POHBA_sobre_POAF e POHBA_sobre_POABA mostraram-se promissoras, uma vez que apresentaram especificidade de 338%, 282%, 294% e 183% respectivamente e, portanto, melhores desempenhos quando comparadas às demais.

Palavras-chaves: filmes poliméricos, bicamadas, copolimerização, caracterização, eletropolimerização, imunossensor impedimétrico.

ABSTRACT

Conductive polymers are known to act as excellent materials for immobilizing biomolecules and fast electron transfer for the manufacture of efficient biosensors, since they have preserved functional groups that can promote significant improvements in adsorption and interaction of the biomolecule/transducer interface, avoiding if so unwanted effects like, for example, the leaching of the immobilized component. In this sense, the electropolymerization of the monomers aniline (ANI), o-hydroxybenzamide (OHBA), o-aminobenzamide (OABA), and o-aminophenol (OAF) in the form of monolayer, bilayer, and copolymers on graphite electrodes was investigated by cyclic voltammetry, for construction and development of functionalized electrochemical platforms. Twenty-two electrochemical platforms were evaluated where differences were observed between the electrochemical responses of the bilayers and the copolymers, suggesting that copolymerization is not just an overlap of homopolymers as occurs in bilayers. Electrochemical and morphological characterization of the platforms functionalized by electrochemical impedance spectroscopy (EIE), cyclic voltammetry (VC), and scanning electron microscopy (SEM) was performed. It was observed that the functionalized platforms derived from the monomers ANI, OAF, and OABA were mostly cationic, while functionalized platforms derived from the OHBA monomer were mostly anionic. SEM analyzes made it possible to observe morphological differences between the functionalized platforms and the unmodified EG, proving the modification of the EG surface by the polymers formed. The results obtained by EIE confirmed the observations made in the VC analysis for the functionalized platforms in the presence of the redox probes. The functionalized platforms were applied in initial studies of the development of an impedimetric immunosensor, through the immobilization of recombinant antigens JL7, 1F8, and B13 for the detection of Chagas disease antibodies in clinical samples. The immunosensors developed using the POABA, POAF_over_POHBA, POHBA_over_POAF, and POHBA_over_POABA platforms proved to be promising, since they presented 338%, 282%, 294%, and 183% specificity, respectively, and therefore better performances when compared to the others.

Keywords: polymeric films, bilayers, copolymerization, characterization, electropolymerization, impedimetric immunosensor.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação esquemática de um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) do tipo: (A) sanduíche, (B) revestimento competitivo de anticorpos e (C) revestimento competitivo de antígenos.29
- Figura 2** - Representação esquemática do conceito de imunossensores capacitivos e circuitos elétricos equivalentes usados para a simulação do comportamento capacitivo ideal (F) e não ideal (G). R_s , resistência do eletrólito, planos interno (IHP) e externo (OHP) de Helmholtz. 31
- Figura 3** - Representação esquemática de circuitos elétricos equivalentes (circuito de Randles) na (A) ausência e (B) presença de uma sonda redox junto com o (C) gráfico correspondente de Nyquist.33
- Figura 4** - Mapa de distribuição global de indivíduos infectados com *T. cruzi* baseado em estimativas oficiais da Organização Mundial da Saúde em 2018.35
- Figura 5** – Imagens registrada para: (A) os equipamentos e (B) célula eletroquímica utilizados na eletrogeração e caracterização dos filmes poliméricos.40
- Figura 6** - Desenho técnico utilizando o software SolidWorks da base e suporte de latão revestidos de Teflon® utilizados na construção do eletrodo de trabalho. Unidades em [mm].41
- Figura 7** - Voltamograma cíclico obtido para o EG em: (A) solução de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 5,0 mM contendo 0,1 M de KCl e (B) solução de $HClO_4$ 0,5 M. $v = 75$ mV/s.46
- Figura 8** - Voltamogramas cíclicos obtidos para a eletropolimerização dos monômeros: (A) OHBA, (B) OABA, (C) OAF e (D) ANI sobre os EG. Número de ciclos = 100; $v = 50$ mV/s. Eletrólito suporte $HClO_4$ 0,5 M. Concentração do monômero = 2,5 mM. (- - -) 1° ciclo de potencial. Inserido: estrutura química dos monômeros.48

Figura 9 - Voltamogramas cíclicos obtidos para o EG durante o processo de eletropolimerização dos monômeros: (A) ANI, (B) OAF, (C) OABA e (D) OHBA. Número de ciclos = 100; $v = 50$ mV/s. Eletrólito suporte: HClO₄ 0,5 M. . Concentração do monômero = 2,5 mM. 50

Figura 10 - Voltamogramas cíclicos obtidos para o EG durante o processo de eletropolimerização das bicamadas de: (A) OAF_sobre_PANI; (B) OAF_sobre_POABA e (C) OAF_sobre_POHBA. Número de ciclos = 50; $v = 50$ mV/s. Eletrólito suporte HClO₄ 0,5 M. 51

Figura 11 - Voltamogramas cíclicos obtidos para o EG durante o processo de eletropolimerização das bicamadas de: (A) OABA_sobre_PANI; (B) OABA_sobre_POAF e (C) OABA_sobre_POHBA. Número de ciclos = 50; $v = 50$ mV/s. Eletrólito suporte HClO₄ 0,5 M. 52

Figura 12 - Voltamogramas cíclicos obtidos para o EG durante o processo de eletropolimerização das bicamadas de: (A) ANI_sobre_POABA; (B) ANI_sobre_POAF e (C) ANI_sobre_POHBA. Número de ciclos = 50; $v = 50$ mV/s. Eletrólito suporte HClO₄ 0,5 M. 54

Figura 13 - Voltamogramas cíclicos obtidos para o EG durante o processo de eletropolimerização das bicamadas de: (A) OHBA_sobre_PANI; (B) OHBA_sobre_POABA e (C) OHBA_sobre_POAF. Número de ciclos = 50; $v = 50$ mV/s. Eletrólito suporte HClO₄ 0,5 M. 55

Figura 14 - Voltamogramas referentes aos sucessivos ciclos de potencial na formação dos copolímeros: (A) PANI_POABA_cop; (B) PANI_POAF_cop; (C) PANI_POHBA_cop; (D) POABA_POAF_cop; (E) POABA_POHBA_cop e (F) POAF_POHBA_cop. Número de ciclos = 100; $v = 50$ mV/s. Eletrólito suporte HClO₄ 0,5 M. 57

Figura 15 - Imagens de MEV para homopolímeros e bicamadas em ampliações de 10.000x e 30.000x para: (A e B): EG; (C e D): PANI; (E e F): PANI_sobre_POABA; (G e H): PANI_sobre_POAF; (I e J): PANI_sobre_POHBA; (K e L): POABA; (M e N): POABA_sobre_PANI; (O e P): POABA_sobre_POAF; (Q e R): POABA_sobre_POHBA; (S e T): POAF; (U e V): POAF_sobre_PANI; (W e X): POAF_sobre_POABA; (Y e Z):

POAF_sobre_POHBA; (AA e AB): POHBA; (AC e AD): POHBA_sobre_PANI; (AE e AF): POHBA_sobre_POABA; (AG e AH): POHBA_sobre_POAF..... 59

Figura 16 - Imagens de MEV para copolímeros em ampliações de 10.000x e 30.000x para: (A e B): PANI_POABA_cop; (C e D): PANI_POAF_cop; (E e F): PANI_POHBA_cop; (G e H): POABA_POAF_cop; (I e J): POABA_POHBA_cop e (K e L): POAF_POHBA_cop..... 61

Figura 17 - VC do POAF/EG após eletropolimerização com 100 ciclos de potencial em solução de HClO₄ 0,50 M. Sendo: (- - -) 1º ciclo de potencial e (—) os 4 ciclos seguintes. $v = 75 \text{ mV/s}$ 62

Figura 18 - VC dos EG e EG modificados na forma de homopolímeros, bicamadas e copolimerizações em solução de HClO₄ 0,50 M, $v = 75 \text{ mV/s}$ 64

Figura 19 - VCs do EG e PANI/EG na forma de homopolímeros e bicamadas em solução de: (A) ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mM contendo KCl 0,1 M, (B) e (D) KCl 0,1 M e (C) cloreto de hexaaminorutênio II/III 5,0 mM em KCl 0,1 M. 66

Figura 20 - VCs do EG e POABA/EG na forma de homopolímeros e bicamadas em solução de: (A): Ferro/Ferricianeto de potássio 5,0 mM em KCl 0,1 M, (B) e (D) KCl 0,1 M e (C) cloreto de hexaaminorutênio II/III 5,0 mM em KCl 0,1 M. 67

Figura 21 - VCs do EG e POAF/EG na forma de homopolímeros e bicamadas em solução de: (A): Ferro/Ferricianeto de potássio 5,0 mM em KCl 0,1 M, (B) e (D) KCl 0,1 M e (C) cloreto de hexaaminorutênio II/III 5,0 mM em KCl 0,1 M. 68

Figura 22 - VCs do EG e POHBA/EG na forma de homopolímeros e bicamadas em solução de: (A): Ferro/Ferricianeto de potássio 5,0 mM em KCl 0,1 M, (B) e (D) KCl 0,1 M e (C) cloreto de hexaaminorutênio II/III 5,0 mM em KCl 0,1 M. 69

Figura 23 - VCs do EG e EG modificados na forma de copolímeros em solução de: (A): ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mM em KCl 0,1 M; KCl 0,1 M: (B) e (D); (C): cloreto de hexaaminorutênio II/III 5,0 mM em KCl 0,1 M. 70

Figura 24 – Gráfico dos valores obtidos para a ΔI_p das plataformas funcionalizadas na presença da sonda redox: (—) ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mM em KCl 0,1 M e (—) cloreto de hexaaminorutênio II/III 5,0 mM em KCl 0,1 M.	72
Figura 25 - Diagramas de Nyquist obtidos nas análises de EIE para as plataformas funcionalizadas em solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mM contendo KCl 0,1 M. As linhas sólidas representam o ajuste dos dados experimentais ao circuito equivalente. E_{ap} = OCP. Amplitude: 10 mV. Frequência: 100 kHz a 10 mHz.	73
Figura 26 - Circuitos equivalentes propostos para simulação das análises de EIE.	74
Figura 27 – Gráfico dos valores de resistência a transferência de carga (R_{tc}) obtidos nas simulações dos dados de EIE para as plataformas funcionalizadas.	76
Figura 28 - Gráfico da porcentagem de variação dos valores de resistência a transferência de carga (ΔR_{tc}) referentes a: (—) sensibilidade e (—) seletividade do imunossensor impedimétrico na detecção de anticorpos <i>anti-T</i> . Cruzei em amostras clínicas utilizando as diferentes plataformas funcionalizadas.	82
Figura 29 - Diagramas de Nyquist referentes a detecção dos anticorpos específicos da doença de Chagas e de pacientes saudáveis usando as plataformas: (A) POABA; (B) POAF_sobre_POHBA; (C) POHBA_sobre_POABA e (D) POHBA_sobre_POABA, obtidos em solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mM contendo KCl 0,1 M. Amplitude: 10 mV. Frequência: 100 kHz a 10 mHz. As linhas sólidas representam o ajuste dos dados experimentais aos circuitos equivalentes propostos.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição dos antígenos recombinantes JL7, 1F8 e B13.	43
Tabela 2 – Descrição das plataformas funcionalizadas investigadas para o desenvolvimento do imunossensor impedimétrico.....	43
Tabela 3 - Parâmetros obtidos nas simulações dos dados de EIE para as plataformas funcionalizadas.	75
Tabela 4 - Propriedades dos antígenos 1F8, B13 e JL7.....	77
Tabela 5 - Composição relativa dos antígenos recombinantes 1F8, B13 e JL7.	78
Tabela 6 - Resultados obtidos na simulação das análises de EIE para detecção da doença de Chagas.	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OABA	o-aminobenzamida
OHBA	o-hidroxibenzamida
ANI	Anilina
OAF	o-aminofenol
Ab	Anticorpos
Ag	Antígenos
BSA	Albumina de soro bovino, no inglês, <i>Bovine serum albumin</i>
CA	Corrente alternada
Cdl	Capacitância da dupla camada
DC	Doença de Chagas
dl	Dupla camada elétrica
DL	Camada dielétrica
ECS	Eletrodo de calomelano saturado
EIE	Espectroscopia de impedância eletroquímica
EG	Eletrodo de grafite
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática, no inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Epa	Potencial de pico anódico
Epc	Potencial de pico catódico
IHA	hemoaglutinação indireta
IIF	imuno-fluorescência indireta
Ipa	Corrente de pico anódica
Ipc	Corrente de pico catódico
M	Molar
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
min	Minutos
mL	Mililitros
mV/s	Milivolts por segundo
nm	Nanômetros
OCP	Potencial de circuito aberto, do inglês <i>open circuit potencial</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PC	Polímeros condutores
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>

POABA	Polímero derivado de OABA
POHBA	Polímero derivado de OHBA
PANI	Polímero derivado de ANI
POAF	Polímero derivado de OAF
Rct	Resistência a transferência de carga
Rs	Resistência da solução
s	Segundos
T. cruzi	<i>Trypanosoma cruzi</i>
V	Volts
VC	Voltametria cíclica
W	Impedância de Warburg
Z'	Componente real de impedância
Z''	Componente imaginária de impedância
ΔE_p	Diferença entre os potenciais de pico
μ	Micro
v	Velocidade de varredura

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. REFERENCIAL TEÓRICO	22
3.1 Importância do uso de eletrodos modificados	22
3.2 Polímeros condutores.....	23
3.3 Biossensores	26
3.3.1 Aspectos gerais dos biossensores	26
3.3.2 Imunoensaios e imunossensores	28
3.3.3 Imunossensores impedimétricos	30
3.4 Doença de Chagas.....	34
3.4.1 Aspectos gerais e diagnóstico da doença de Chagas	34
4 METODOLOGIA.....	39
4.1 Reagentes.....	39
4.2 Preparação dos antígenos recombinantes e amostras de soro.....	39
4.3 Instrumentação e equipamentos.....	40
4.4 Funcionalização dos eletrodos de grafite.....	42
4.5 Caracterização morfológica das plataformas	43
4.6 Investigação das propriedades eletroquímicas das plataformas	43
4.7 Estudos preliminares da aplicação das plataformas no desenvolvimento de um imunossensor	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1 Condicionamento dos eletrodos de grafite	45
5.2 Eletropolimerizações	47
5.2.1 Eletrodos de grafite modificados com homopolímeros	49
5.2.2 Eletrodos de grafite modificados com bicamadas.....	50
5.2.3 Eletrodos de grafite modificados com copolímeros	56

5.3 Análises morfológicas	58
5.4 Comportamento eletroquímico das plataformas funcionalizadas.....	62
5.5 Propriedades de transferência de carga das plataformas funcionalizadas	65
5.6 Propriedades elétricas das plataformas funcionalizadas.....	73
5.7 Estudos dos antígenos recombinantes	77
5.8 Estudos iniciais do desenvolvimento do imunossensor.....	79
6 CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS	86

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e a otimização de materiais constituem a principal via para implementação do desenvolvimento tecnológico nos diversos setores da sociedade contemporânea. Tendo em vista o perfil das propriedades químicas, mecânicas, térmicas, elétricas e ópticas os materiais podem ser classificados em quatro categorias: metais, cerâmicas, polímeros e compósitos; sendo que, sob o ponto de vista da tecnologia da engenharia moderna os materiais poliméricos têm causado um importante impacto (SHACKELFORD, 2008; BAR-COHEN e ANDERSON, 2019).

Dentro da categoria dos materiais poliméricos, os polímeros condutores se destacam por apresentarem características e propriedades peculiares cujo interesse científico e tecnológico tem sido alvo de grande atenção. Polímeros condutores (PC) contém elétrons π desemparelhados conjugados de elevada extensão responsáveis por suas propriedades eletrônicas incomuns, como condutividade elétrica, transições ópticas de baixa energia, baixo potencial de ionização e alta afinidade eletrônica (HEINZE, URIBE e LUDWIGS, 2010).

A atração por estes materiais é consequência de suas características, tais como: elevado grau de combinação, condutividade elétrica modulável, boa resistência mecânica, baixa densidade, flexibilidade, eletrocromismo, entre outras.

Os PC têm sido utilizados em diversos campos da pesquisa eletroquímica como em células solares, baterias leves, sensores e dispositivos eletrônicos moleculares, e ainda como materiais inteligentes capazes de responder a estímulos específicos, uma vez que, por apresentarem eletroatividade são materiais capazes de detectar e atuar em tempo real, lhes conferindo a capacidade de trabalhar como sensores e atuadores nos mais diversos campos tecnológicos (PEREPICHKA *et al.*, 2005; PATRA, KUMAR e CHAND, 2014; TIAN *et al.*, 2019; POTYRAILO, 2006, BASHIR e RAJENDRAN, 2018).

Os PC são conhecidos por atuarem como excelentes materiais para imobilização de biomoléculas e rápida transferência de elétrons para a fabricação de biossensores, já que tais polímeros contendo grupos funcionais preservados podem promover melhorias significativas na adsorção e interação da interface biomolécula/transdutor, evitando efeitos indesejados como, por exemplo, o de lixiviação do componente imobilizado. Para a construção e desenvolvimento dos biossensores, a utilização dos polímeros condutores na forma de plataformas funcionalizadas, pode garantir que os eletrodos modificados adquiram sensibilidade, seletividade, reprodutibilidade, estabilidade e aplicabilidade superiores àquelas

do eletrodo convencional sem prévia modificação. (HEINZE, URIBE, LUDWIGS, 2010; SNOOK, KAO, BEST, 2011).

Reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das 13 doenças tropicais mais negligenciadas do mundo, a doença de Chagas (DC), causada pelo parasita protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), continua a ser um problema social e econômico relevante em muitos países da América Latina. A OMS também estima que aproximadamente 7 milhões de pessoas estejam infectadas com *T. cruzi* em todo o mundo, com quase 100 milhões em risco de infecção, além disso, 2.000 mortes por ano podem ser atribuídas à DC, tornando-a um sério problema de saúde pública (WHO, 2020).

De acordo com a OMS a infecção pelo *T. cruzi* é curável se o tratamento for iniciado logo após a infecção. O diagnóstico da infecção aguda é baseado na detecção microscópica de tripomastigotas no sangue e através de ensaios baseados na amplificação do DNA de *T. cruzi* por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (WHO, 2020; RUSSOMANDO *et al.*, 2005; MORA, *et al.* 2005; DIEZ *et al.*, 2008).

Durante a fase crônica, como a parasitemia é baixa, a presença de anticorpos IgG contra antígenos *T. cruzi* precisa ser detectada por pelo menos dois métodos sorológicos diferentes (geralmente ensaio imunoenzimático, imunofluorescência indireta ou hemoaglutinação indireta) para confirmar o diagnóstico. Neste contexto, a PCR torna-se útil para confirmar o diagnóstico em casos de sorologia inconclusiva, e como um método auxiliar para monitorar o tratamento, sendo útil para identificar falha do tratamento pela detecção positiva do DNA de *T. cruzi*. (MORA, *et al.* 2005; GOMES, LORENA e LUQUETTI, 2009; BRITTO, 2018).

Desta forma é nítida a necessidade de desenvolver metodologias que permitam um diagnóstico mais rápido e mais seguro em áreas endêmicas, garantindo maior controle da DC nessas áreas, e neste sentido o desenvolvimento de biossensores aplicados ao diagnóstico da DC surge como uma alternativa promissora.

Neste sentido, este trabalho investigou a eletropolimerização dos monômeros anilina, o-hidroxibenzamida, o-aminobenzamida e o-aminofenol na forma de monocamadas, bicamadas e copolimerização sobre eletrodos de grafite mediante a utilização da técnica eletroquímica de voltametria cíclica para construção e desenvolvimento de plataformas eletroquímicas funcionalizadas a serem aplicadas no desenvolvimento de um imunossensor impedimétrico para detecção de anticorpos específicos da doença de Chagas (DC) em amostras de soros humanos, baseado na imunorreação destes com antígenos recombinantes específicos da doença.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar e caracterizar a eletropolimerização dos monômeros anilina, o-hidroxibenzamida, o-aminobenzamida e o-aminofenol na forma de homopolímeros, bicamadas e copolímeros sobre eletrodos de grafite, utilizando voltametria cíclica, para a construção de plataformas eletroquímicas funcionalizadas a serem aplicadas no desenvolvimento de um imunossensor impedimétrico para detecção de anticorpos da doença de Chagas presentes em amostras clínicas.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Investigar a eletropolimerização por voltametria cíclica dos monômeros: anilina, o-hidroxibenzamida, o-aminobenzamida e o-aminofenol sobre eletrodos de grafite, na forma de monocamadas (homopolímeros), bicamadas e por copolimerização;
- ✓ Caracterizar e avaliar as propriedades eletroquímicas dos filmes poliméricos obtidos, utilizando as técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica;
- ✓ Avaliar as propriedades morfológicas dos eletrodos de grafite e eletrodos de grafite modificados com os filmes poliméricos por microscopia eletrônica de varredura;
- ✓ Avaliar, por espectroscopia de impedância eletroquímica, a eficiência das plataformas funcionalizadas na imobilização dos antígenos recombinantes JL7, 1F8 e B13;
- ✓ Avaliar o desempenho do imunossensor impedimétrico na detecção de anticorpos presentes em amostras clínicas de pacientes diagnosticados com a doença de Chagas, bem como realizar a contraprova em amostras de pacientes saudáveis e;
- ✓ Comparar a performance das diferentes plataformas no reconhecimento dos alvos específicos, avaliando o seu desempenho em comparação às características estruturais do filme polimérico formado.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Importância do uso de eletrodos modificados

Em aplicações eletroanalíticas voltadas ao desenvolvimento de sensores o uso de eletrodos não modificados para determinação/atuação em função da presença do analito resulta em baixa sensibilidade, especificidade e seletividade devido a fatores como: presença de outras moléculas eletroativas interferentes no sinal do analito ou analito em baixas concentrações que dificulta a sua detecção. Além disso, a reutilização e a reprodutibilidade do eletrodo são reduzidas pelos subprodutos redox que podem ser originados e adsorvidos na superfície do eletrodo (KIM, KIM e JEON, 2012; KHAN, 2017).

Para minimizar ou até mesmo resolver esses problemas, a abordagem mais eficaz é selecionar materiais condutores e seletivos para modificação do eletrodo de trabalho, a fim de melhorar a sensibilidade e a seletividade na determinação do analito. Eletrodos quimicamente modificados constituem uma promissora e eficaz solução, uma vez que possibilitam significativo aumento de sensibilidade e seletividade (KIM, KIM e JEON, 2012; MATUSCHEK, GOBEL e LISDAT, 2017).

Os materiais utilizados para modificação da superfície do eletrodo para aplicações eletroanalíticas, incluem uma ampla variedade de materiais como polímeros e polieletrólitos condutores, nanomateriais de carbono, nanopartículas e nanocompósitos metálicos, líquidos iônicos, entre outros.

A modificação da superfície do eletrodo de trabalho pode gerar um transdutor com propriedades novas e interessantes para a detecção de um determinado analito. O material de modificação, geralmente existe na forma de filmes finos eletroativos, monocamadas ou revestimentos espessos na superfície do eletrodo. A fabricação de eletrodos com superfície modificada constitui uma abordagem avançada que permite transformar materiais condutores em eletrodos práticos e adequados para aplicações em ambientes biológicos (USLU e OZKAN, 2007; LYDON, GERMANN e YANG, 2016).

Sendo assim, a modificação da superfície do eletrodo provoca melhorias significativas no desempenho do eletrodo, uma vez que pode proporcionar limitação ao acesso de agentes interferentes fornecendo assim melhor seletividade; bem como atuação pelo material de modificação como um mediador rápido de transferência eletrônica entre o analito e o eletrodo, melhorando a resolução do sinal eletroquímico e ainda reduzindo o efeito de incrustação.

Neste contexto, os polímeros condutores constituem uma importante metodologia de modificação da superfície de eletrodos, uma vez que podem gerar melhorias significativas na seletividade e sensibilidade dos sensores eletroquímicos. Nos polímeros condutores, as propriedades do polímero convencional e as propriedades eletrônicas dos metais ou semicondutores são combinadas. Estes polímeros consistem em extensas cadeias π conjugadas que, quando dopados possibilitam obter elevados valores de condutividade sendo, portanto, denominados de "metais sintéticos" (GERARD, CHAUBEY e MALHOTRA, 2002; SHI *et al.*, 2015).

Ainda, vale ressaltar que os polímeros condutores possuem significância tecnológica e científica substancial devido às suas características ópticas, eletrônicas, magnéticas e elétricas peculiares. Para a fabricação de sensores eletroquímicos, especialmente biossensores, a modificação da superfície do eletrodo com polímeros condutores é uma escolha adequada, pois filmes finos de polímero na superfície do eletrodo podem ser gerados por eletropolimerização, que é uma das maneiras mais fáceis de obter filmes quimicamente estáveis com espessura controlada (KALIMUTHU e JOHN, 2010; SAJID *et al.*, 2016).

3.2 Polímeros condutores

Os polímeros condutores (PC) se caracterizaram como um marco na ciência analítica moderna, onde têm sido amplamente utilizados como elementos de otimização de sinal em aplicações eletroanalíticas. Os PC consistem em um grupo de compostos orgânicos (como polianilina, polipirrol, politiofeno e seus derivados) com propriedades muito específicas, que têm sido utilizadas em diversos campos da pesquisa eletroquímica como em células solares, baterias leves, sensores e dispositivos eletrônicos moleculares (PEREPICHKA *et al.*, 2005; PATRA, KUMAR e CHAND, 2014; TIAN *et al.*, 2019; POTYRAILO, 2006). Os PC são conhecidos por atuarem como excelentes materiais para imobilização de biomoléculas e rápida transferência de elétrons para a fabricação de biossensores, uma vez que, tais polímeros contendo grupos funcionais preservados promovem melhorias significativas na adsorção e interação da interface biomolécula/transdutor, evitando efeitos indesejados como, por exemplo, o de lixiviação do componente imobilizado (GERARD, CHAUBEY e MALHOTRA, 2002).

Polímeros condutores contém elétrons π desemparelhados conjugados de elevada extensão responsáveis por suas propriedades eletrônicas incomuns, como condutividade elétrica, transições ópticas de baixa energia, baixo potencial de ionização e alta afinidade

eletrônica. Este extenso sistema π conjugado dos polímeros condutores possuem ligações simples e duplas alternadas ao longo da cadeia polimérica. Os valores mais altos da condutividade elétrica obtida nesses polímeros orgânicos levaram ao nome de "metais sintéticos".

O mecanismo de condução nesses polímeros é complexo, uma vez que esses materiais exibem condutividade próxima de quinze ordens de magnitude e muitos envolvem mecanismos diferentes dentro de distintos regimes. O conceito de sólitons, pólarons e bipólarons tem sido utilizado para explicar os fenômenos eletrônicos nesses sistemas, onde a condutividade de polímeros condutores é influenciada por diversos fatores, incluindo comprimento do pólaron, o comprimento da conjugação e a transferência de carga para moléculas adjacentes. Estes são explicados por diversos modelos baseados em transições intersóliton, transições entre estados localizados assistidos por vibrações, transições intracadeia de bipólarons, e energia de carregamento limitado por tunelamento entre domínios condutores (HEINZE, URIBE e LUDWIGS, 2010).

Para a síntese de polímeros condutores existem diversos métodos disponíveis, no entanto, a técnica mais utilizada é o acoplamento oxidativo que envolve a oxidação de monômeros para formar um cátion radical seguido por acoplamentos di-cátions, sendo que a repetição leva ao polímero. A síntese eletroquímica tem se tornado o método geralmente preferido para preparar polímeros eletricamente condutores devido à sua simplicidade e reprodutibilidade. A vantagem da polimerização eletroquímica é que as reações podem ser realizadas à temperatura ambiente, em meio aquoso, e, pela variação do potencial ou da corrente ao longo do tempo, é possível ainda controlar a espessura do filme, dentre outros parâmetros (GERARD, CHAUBEY e MALHOTRA, 2002).

A pesquisa contínua sobre o desenvolvimento de novas propriedades dos PC aplicados ao desenvolvimento dispositivos eletroeletrônicos enfatiza principalmente o *design* e a síntese de novas unidades monoméricas, para que se obtenha um polímero adequado à aplicação com todas as características desejadas e necessárias (SHAHJAD *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2012; ALAKHRAS, HOLZE, 2016). Essa abordagem está envolvida na síntese em multi-etapas; requerendo condições experimentais especiais, onerosas, de longa duração etc. Apesar disso, novas propriedades do material também podem ser obtidas pela mistura de dois ou mais monômeros ou precursores e atraíram o interesse significativo da academia e da indústria. Entre as estratégias de utilização de dois ou mais monômeros, a copolimerização e polimerização camada por camada são algumas comumente usadas para ajustar as

propriedades dos polímeros visando aplicações eletrônicas desejadas (HWANG, YOO, e IM, 2012; CHOTSUWAN *et al.*, 2017; BHARDWAJ *et al.*, 2017)

A copolimerização é um método simples para produzir um polímero com novas propriedades a partir de diferentes monômeros, enquanto a deposição camada por camada é o processo de deposição de uma camada de polímero sobre outro. A copolimerização é uma técnica bem estudada para ajustar as propriedades elétrico/eletrônicas e eletrocromáticas de polímeros conjugados de diferentes monômeros, como pirrol, tiofeno, anilina etc. (SINGHAL *et al.*, 2019; GU *et al.*, 2018; ARJOMANDI *et al.*, 2015).

Por outro lado, a polimerização camada por camada atraiu menos atenção que a copolimerização, embora seja um método potencial para adaptar as propriedades eletrônicas dos polímeros conjugados. A formação camada por camada em filmes finos multicamadas por via química é duvidosa e existem muito poucas técnicas de caracterização disponíveis para entender a formação do polímero camada por camada e diferenciar entre as duas camadas. Neste sentido, polimerização eletroquímica é um método potencial para a deposição camada por camada em filmes finos multicamadas, uma vez que, a polimerização eletroquímica oferece filmes poliméricos com propriedades controladas, como pureza química, condutividade, espessura, morfologia etc. (BOEHME, MUDIGONDA, FERRARIS, 2001; ABACI, GUNNEY, KADIROGLU, 2013).

É importante ressaltar que os polímeros condutores são alternados entre as fases reduzida e oxidada durante os procedimentos de aplicação de potencial ou corrente, onde a cinética do processo redox, que neste caso envolve também uma etapa de intercalação/desintercalação de íons para contrabalançar a carga gerada durante a oxidação/redução, deve ser estudada e otimizada, uma vez que geralmente é descrita como a etapa limitante do processo redox (HEINZE, FRONTANA-URIBE, LUDWIGS, 2010). Uma opção para otimizar esse processo é o uso de materiais que apresentam um efeito autodopante para neutralização das cargas geradas (SARKER e HONG, 2012). Em diversos casos, autodopagem é obtido através da introdução de grupos laterais SO_3^- na cadeia polimérica, sendo que, neste caso, a intercalação é de certa forma parcialmente inibida (MATTOSO, MACDIARMID e EPSTEIN, 1994). Uma alternativa para reduzir a importância da intercalação é o uso de filmes poliméricos do tipo bicamadas, uma vez que estes apresentam efeito de autodopagem no mecanismo de condução e, neste caso, o efeito de autodopagem ocorre entre as duas camadas (CONSTANTINE *et al.*, 2003; TRIVINHO-STRIXINO *et al.*, 2005).

Boufflet e colaboradores (2016), relataram a síntese polimérica em bloco e compararam a estabilidade térmica das propriedades ópticas e morfológicas com as correspondentes misturas de homopolímeros. Li e colaboradores (2011), relataram o acoplamento eletroquímico camada por camada, o que permite imobilizar unidades funcionais em filmes com espessura desejada e sequências projetáveis. DeLongchamp e colaboradores (2003), relataram uma montagem camada por camada de dois polímeros electrocrômicos catódicos para compósito electrocrômico duplo de alto contraste. Ak e colaboradores (2013), sintetizaram eletroquimicamente copolímero e polímeros de mistura de um monômero funcional de dipirrometano com unidade de 3,4-etilenodioxitiofeno, e suas propriedades espectro-eletroquímicas e electrocrômicas foram investigadas. Kuo e Lee (2017) relataram a síntese eletroquímica de um copolímero baseado em 1,3,5-tris(N-carbazolil)benzeno e 2,2-bitiofeno para dispositivo electrocrômico. Kepas e Grzeszczuk (2005) relataram filmes finos de polipirrol camada por camada por deposição eletroquímica para facilitar transporte de íons no polímero. Shah e Holze (2006), relataram a síntese de copolímeros e bicamadas de anilina (ANI) e o-aminofenol (OAF) preparados por eletropolimerização em diferentes concentrações de OAP e ANI em um eletrodo de ouro.

A modificação da superfície de eletrodos com grupos funcionais orgânicos torna-se cada vez mais relevante e tem sido utilizada de forma acentuada por muitos pesquisadores para desenvolvimento de diferentes biossensores. Nesse contexto, polímeros condutores (PC) têm despertado muito interesse no desenvolvimento científico e tecnológico mundial devido às suas diversas aplicações projetadas em células solares, baterias leves, sensores e dispositivos eletrônicos moleculares (SNOOK, KAO, BEST, 2011; WAN *et al.*, 2013; CHIKKAVEERIAIAH, *et al.*, 2012; NICOLIA, *et al.*, 2018).

3.3 Biossensores

3.3.1 Aspectos gerais dos biossensores

Um biossensor pode ser definido como um dispositivo que contém material biológico, tal como enzimas, anticorpos/antígenos, DNA, bactérias, tecidos etc. como agente de reconhecimento que permite obter informações analíticas através da manipulação do sistema *in situ*, gerando resultados que podem ser analisados e correlacionados com outros parâmetros relativos ao sistema de interesse. A obtenção de informações analíticas depende da capacidade do sensor de interagir com um analito, onde, o elemento sensor é acoplado a um

transdutor, que converte a interação analito-sensor em um sinal mensurável (LOWINSOHN e BERTOTTI, 2006).

Devido às suas propriedades peculiares os biossensores têm sido extensivamente estudados nos últimos anos. O avanço nas áreas de ciência e tecnologia dos materiais contribuiu significativamente para o desenvolvimento de aplicações eletroanalíticas nas mais diversas áreas, fornecendo, uma abordagem versátil para a síntese e desenvolvimento de materiais adequados para aplicação em sensoriamento químico, medicina, eletrônica, agricultura, biotecnologia, aplicações biomédicas e bioanalíticas.

Os biossensores podem ser divididos basicamente em duas classes: os catalíticos, que utilizam enzimas imobilizadas e os de afinidade, que utilizam anticorpos, DNA ou peptídeos, como moléculas de bio-reconhecimento. Os mecanismos de transdução mais comumente utilizados são eletroquímicos, ópticos, térmicos e piezoelétricos, sendo que, o tipo de transdução de sinal está diretamente relacionado à característica física ou química do produto gerado pelo componente biológico (MONA *et al.*, 2018).

Os biossensores eletroquímicos tornaram-se populares devido apresentarem características atraentes como, por exemplo, baixo custo de construção, procedimento de análise relativamente rápido e fácil e pequeno tamanho da unidade de medição (que geralmente é portátil). O desenvolvimento de eletrodos planares serigrafados, baratos, sensíveis e capazes de miniaturização também tem contribuído para o sucesso dos biossensores eletroquímicos (COUTO, 2016; TUDORACHE, 2007). Erdem e colaboradores (2011), demonstraram interesse considerável no desenvolvimento de sensores eletroquímicos devido às suas importantes aplicações em medicina, bioengenharia, diagnóstico clínico, diagnóstico preventivo de epidemias e proteção ambiental.

De acordo com o tipo de biomolécula imobilizada sobre o transdutor os biossensores podem receber as seguintes denominações: Genossensores contendo oligonucleotídeos, produtos de PCR ou fragmentos de DNA; Biossensores enzimáticos: componente biológico é uma enzima; Imunossensores contendo um antígeno ou anticorpo como componente biológico; Biossensores Microbiológicos onde o componente biológico é representado por fungos, bactérias organelas vegetais e animais dentre outras.

Os Imunossensores baseiam-se no uso de um anticorpo que reage especificamente com uma substância (antígeno) a ser testada. A imobilização do receptor (*i.e.*, antígeno) sobre um substrato é conveniente para aplicações de reconhecimento biomolecular para detecção da molécula alvo (*i.e.*, anticorpo) presente na solução, sendo que, a especificidade da interação antígeno-anticorpo permite o desenvolvimento de imunossensores para diagnósticos clínicos.

Assim, diversos tipos de imunossensores podem ser construídos, de acordo com o tipo de transdutor empregado (MEDETALIBEYOGLU *et al.*, 2020).

Neste sentido, o desenvolvimento de imunossensores impedimétricos tem apresentado grande potencial para criação de novas metodologias para diagnósticos clínicos, os quais apresentam inúmeras vantagens como: versatilidade, possibilidade de miniaturização, facilidade operacional e real aplicação *in situ*. As técnicas de imobilização de biomoléculas com maior utilização são as de formação de ligação covalente e adsorção. Outros processos como os de ligação cruzada (*cross-linking*) e aprisionamento (*entrapment*) também são utilizados (RAMANATHAN, *et al.*, 2004; MALHOTRA, 2000).

3.3.2 Imunoensaios e imunossensores

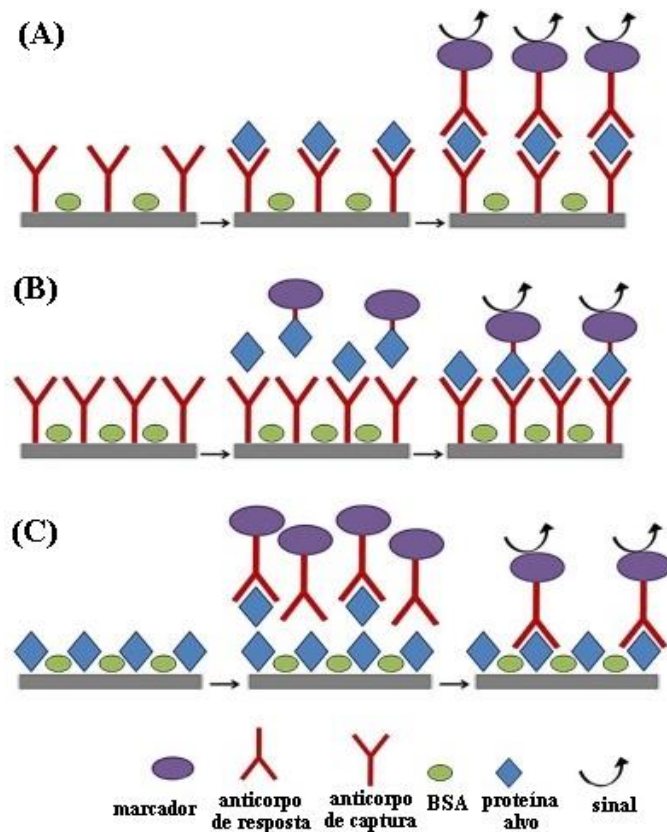
A ligação não covalente específica entre anticorpos (comumente usados como sondas específicas de analitos) e antígenos (analitos) constitui o ponto chave dos imunoensaios, uma família ampla de métodos analíticos para a detecção seletiva e sensível de substâncias de grande interesse em análises e diagnósticos clínicos, controle de segurança alimentar, rastreamento e desenvolvimento de medicamentos, monitoramento ambiental, análise forense, gerenciamento de ameaças biológicas, prevenção e controle de doenças epidêmicas, remédios personalizados, etc. (WAN *et al.*, 2013; CHIKKAVEERIAIAH, *et al.*, 2012; NICOLIA, *et al.*, 2018).

Atualmente, as abordagens de ensaio enzimático imunoabsorvente (ELISA) (que se enquadram em dois formatos principais; sanduíche (Figura 1A) e competitiva (Figura 1B e 1C), representam a tecnologia mais popular para a implementação dos imunoensaios, oferecendo baixos limites de detecção (em torno de 10^{-12} - 10^{-9} molL⁻¹). Os fatores limitantes nos ensaios ELISA incluem a complexidade do fluxo de trabalho do teste, o uso de reagentes dispendiosos, os leitores ELISA são volumosos e a operação demorada e laboriosa (ARUGULA, SIMONIAN, 2018; WALTARI, *et al.*, 2020).

Conforme apresentado na Figura 1A, o formato ELISA sanduíche é aplicável apenas aos antígenos (Ag) que possuem pelo menos dois locais de ligação (epítomos) para seu anticorpo específico (Ab). A interação entre o anticorpo de captura (imobilizado) e o antígeno não pode ser diretamente monitorada e, portanto, a quantificação do analito requer uma etapa de marcação extra e compostos apropriados (anticorpo de notificação marcado com enzima e substrato da enzima) para produzir uma resposta detectável (por exemplo, absorvância, fluorescência, corrente), cuja magnitude é proporcional à concentração do analito. Nos

formatos competitivos de ELISA, a magnitude da resposta é inversamente proporcional à concentração do analito (antígeno da amostra). No formato ilustrado na Figura 1B, as moléculas do antígeno na amostra competem com os antígenos de resposta/notificação marcados com enzimas adicionados na amostra pela ligação com os anticorpos imobilizados. No formato ELISA competitivo ilustrado na Figura 1C, os antígenos da amostra competem com os antígenos imobilizados pela ligação com os anticorpos de resposta/notificação marcados com enzima (MISTRY, *et al.*, 2014; WALTARI *et al.*, 2016).

Figura 1 - Representação esquemática de um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) do tipo: (A) sanduíche, (B) revestimento competitivo de anticorpos e (C) revestimento competitivo de antígenos.



Fonte: WALTARI *et al.*, 2016. Adaptado.

O desenvolvimento de vários campos da análise química desde o início dos anos 80 levou à integração dos transdutores bioquímicos (ou seja, a camada de detecção baseada em Ab) e físicos (transdutores de medição de propriedade para sinal) em um único dispositivo conhecido como imunossensor.

Dependendo da tecnologia do transdutor, os imunossensores podem ser classificados em três classes principais: eletroquímica, óptica e piezoelétrica. Entre eles, os eletroquímicos são de particular interesse, graças à sua simplicidade de fabricação, baixo custo de instrumentação, capacidade de fabricação em massa, curto tempo de resposta, elevada sensibilidade e facilidade de miniaturização. Para uma descrição detalhada os imunossensores ópticos podem ser colorimétricos, fluorescência, quimioluminescência, ressonância plasmônica de superfície; enquanto os piezoelétricos podem ser de microbalança de cristal de quartzo (MOHAMMED, *et al.*, 2011; HAN, LI, SEONG, 2013).

Imunossensores eletroquímicos baseados no modo competitivo (Figura 1B) ou Figura 1C), apesar de serem frequentemente menos utilizados que os imunossensores do tipo sanduíche, constituem uma classe importante de dispositivos imunológicos. Dentre os imunossensores eletroquímicos podemos destacar os voltamétricos, amperométricos, capacitivos e impedimétricos (TIMOTHY, HOLFORD e SEAMUS, 2012).

3.3.3 Imunossensores impedimétricos

O princípio de operação dos imunossensores capacitivos pode ser explicado utilizando-se o conceito de capacitor elétrico, extrapolando esta interpretação para os denominados de "capacitores bioquímicos". Na Figura 2, segue apresentado a representação esquemática do conceito de imunossensores capacitivos. Um capacitor consiste em duas placas condutoras paralelas, que são separadas por uma camada dielétrica (Figura 2A). A capacitância pode ser definida pela equação 1,

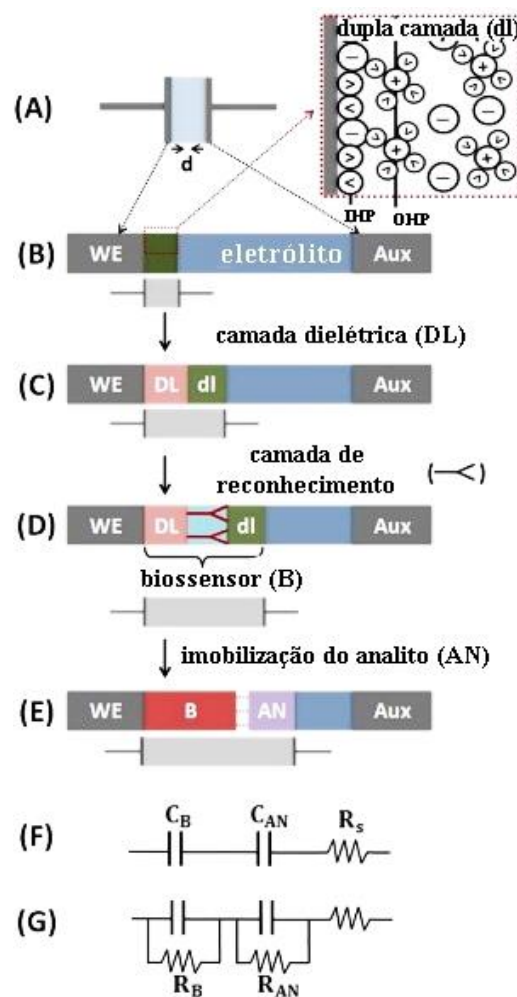
$$C = \frac{\varepsilon^* \varepsilon_0^* A}{d} \quad \text{equação (1)}$$

onde C é a capacitância, ε é a constante dielétrica do meio entre as placas, ε_0 é a permissividade do vácuo, A é a área superficial das placas e d é a espessura da camada dielétrica, onde portanto, a capacitância é inversamente proporcional à espessura da camada dielétrica.

Em uma célula eletroquímica de dois eletrodos contendo uma solução eletrolítica, se considerarmos que o eletrodo de trabalho representa uma das placas do capacitor e a solução eletrolítica (através do eletrodo auxiliar) a outra placa, então, sob uma determinada tensão de polarização, será formada na interface eletrodo de trabalho/eletrólito (Figura 2B) a

chamada dupla camada elétrica (dl). A dupla camada elétrica geralmente pode ser simulada por um capacitor devido à capacidade de armazenar carga, enquanto sua espessura é determinada pela espessura dos planos interno e externo de Helmholtz (IHP, OHP respectivamente) e da camada difusa (Figura 2B, inserção).

Figura 2 - Representação esquemática do conceito de imunossensores capacitivos e circuitos elétricos equivalentes usados para a simulação do comportamento capacitivo ideal (F) e não ideal (G). R_s , resistência do eletrólito, planos interno (IHP) e externo (OHP) de Helmholtz.



Fonte: PRODROMIDIS, 2010. Adaptado.

Conforme apresentado na Figura 2C e Figura 2D, após a modificação sucessiva da superfície do eletrodo com uma camada dielétrica (DL) e com uma camada de reconhecimento adicional, ou seja, anticorpos, a distância entre as placas é aumentada progressivamente. A distância entre as placas se torna ainda maior após a imersão do

capacitor bioquímico (ou seja, o biossensor (B)) em uma amostra contendo o analito alvo devido às interações específicas entre os anticorpos imobilizados e as moléculas de antígeno (Figura 2E).

De acordo com a equação 1, espera-se que as alterações de capacitância sejam mais significativas no caso de antígenos volumosos, tornando os imunossensores capacitivos mais adequados para a detecção de proteínas ou, melhor ainda, de células.

Também, espera-se que a interação Ab-Ag altere as propriedades dielétricas na interface eletrodo/eletrólito, pois as moléculas de água com uma constante dielétrica alta ($\varepsilon = 80$) são substituídas por proteínas ($\varepsilon \sim 20$), implicando, portanto, em alterações de capacitância no eletrodo (BERGGREN, BJARNASON, JOHANSSON, 2001).

A existência de qualquer contribuição faradáica expressa o desvio do sistema (ou de uma camada específica) do comportamento capacitivo ideal (Figura 2F) e é representado por um resistor conectado em paralelo com o capacitor dessa camada (Figura 2G). Por esse motivo, as imperfeições na estrutura da camada dielétrica, a compactação da camada de reconhecimento, o caráter dielétrico não ideal inerente às biomoléculas e o transporte de íons através ou ao redor delas exercem um papel significativo no desempenho geral de um imunossensor capacitivo tornando assim crítica a seleção da camada dielétrica, a seleção do método de imobilização e, em geral, qualquer etapa específica no desenvolvimento do biossensor.

Pelas razões explícitas acima, a impedância pode ser considerada uma propriedade alternativa para sondar interações de biomoléculas (LISDAT, SCHAFER, 2008; PRODROMIDIS, 2010; DANIELS, POURMAND, 2007). A impedância é definida como a razão das funções tensão-tempo e corrente-tempo, sendo matematicamente modelada de acordo com a equação 2:

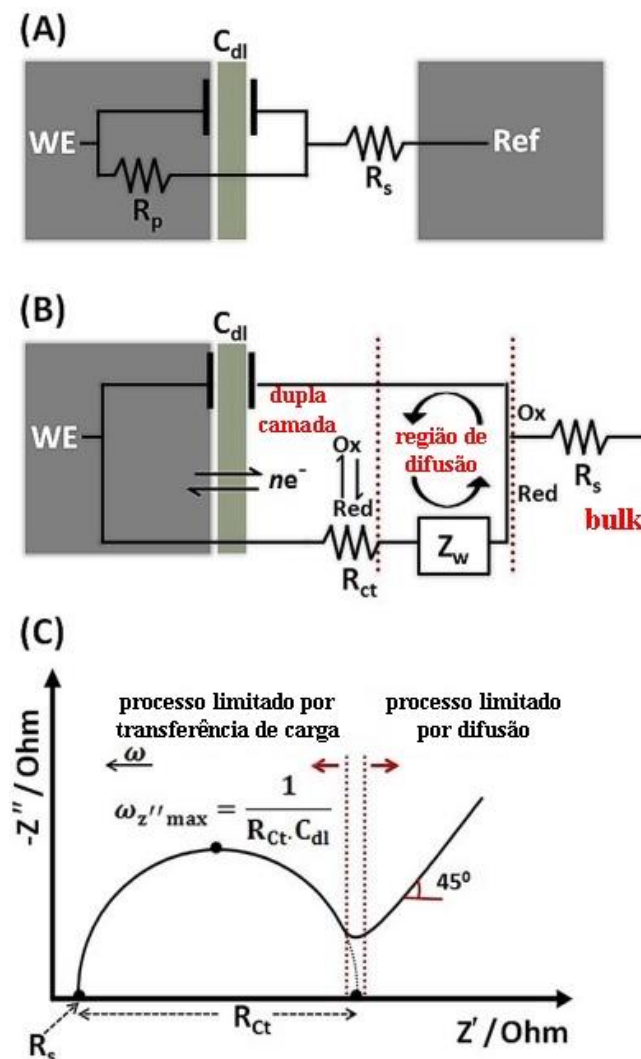
$$Z = \frac{V_{(t)}}{I_{(t)}} = \frac{V_0 \text{sen}(\omega t)}{I_0 \text{sen}(\omega t + \varphi)} \quad \text{equação (2)}$$

onde V_0 e I_0 são a amplitude de tensão e corrente, ω a frequência angular aplicada ($\omega = 2\pi f$, f é a frequência), t o tempo, φ a mudança de fase entre as funções tensão-tempo e corrente-tempo, e responsável pela oposição combinada de todos os componentes (resistores, capacitores) dentro da célula eletroquímica ao fluxo de elétrons e íons.

A impedância pode ser medida empregando-se a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), uma técnica de corrente alternada (CA) que descreve a resposta da célula a um sinal de excitação de tensão senoidal de pequena amplitude em função da frequência.

A impedância é expressa como um número complexo, enquanto os diagramas mais populares para avaliar dados de EIS são os gráficos Nyquist (impedância real (Z') versus a imaginária (Z'')) e o de Bode (onde a impedância ou o ângulo de fase são plotados em função da frequência). Os dados de EIS geralmente são simulados em um circuito elétrico equivalente (conforme mostrado na Figura 3), que ajuda a entender a origem física da resposta observada e a extrair valores numéricos dos componentes individuais (LISDAT, SCHAFER, 2008; LABIB *et al.*, 2009).

Figura 3 - Representação esquemática de circuitos elétricos equivalentes (circuito de Randles) na (A) ausência e (B) presença de uma sonda redox junto com o (C) gráfico correspondente de Nyquist.



Fonte: PRODROMIDIS, 2010. Adaptado.

Um circuito equivalente elétrico geral que é comumente utilizado para modelar fenômenos interfaciais é o denominado circuito de Randles (Figura 3A), que compreende a resistência da solução (eletrólito) (R_s), C_{dl} e a resistência de polarização (R_p). Na presença de uma sonda redox na solução eletrolítica, o termo resistência de transferência de carga (R_{tc}) é comumente utilizado em vez de R_p e, há a inclusão de um componente extra, a impedância de Warburg (Z_w) (Figura 3B).

Z_w representa os fenômenos de difusão da sonda redox em solução. Em um processo controlado por difusão, uma linha reta ($\varphi = 45^\circ$) geralmente é observada na faixa de baixa frequência do diagrama de Nyquist (Figura 3C), enquanto a evolução de um semicírculo ao longo da faixa de alta frequência, implica em um processo controlado por transferência de carga (PRODRONIDIS, 2010).

Neste sentido, a EIE tem sido amplamente utilizada para o desenvolvimento de imunossensores, principalmente pela sensibilidade e possibilidade de aplicação em sistemas de reconhecimento da interação antígeno/anticorpo sem o uso de marcadores. Devido a estas particularidades, a técnica é uma das mais utilizadas para imunossensores impedimétricos aplicados ao diagnóstico de clínico.

3.4 Doença de Chagas

3.4.1 Aspectos gerais e diagnóstico da doença de Chagas

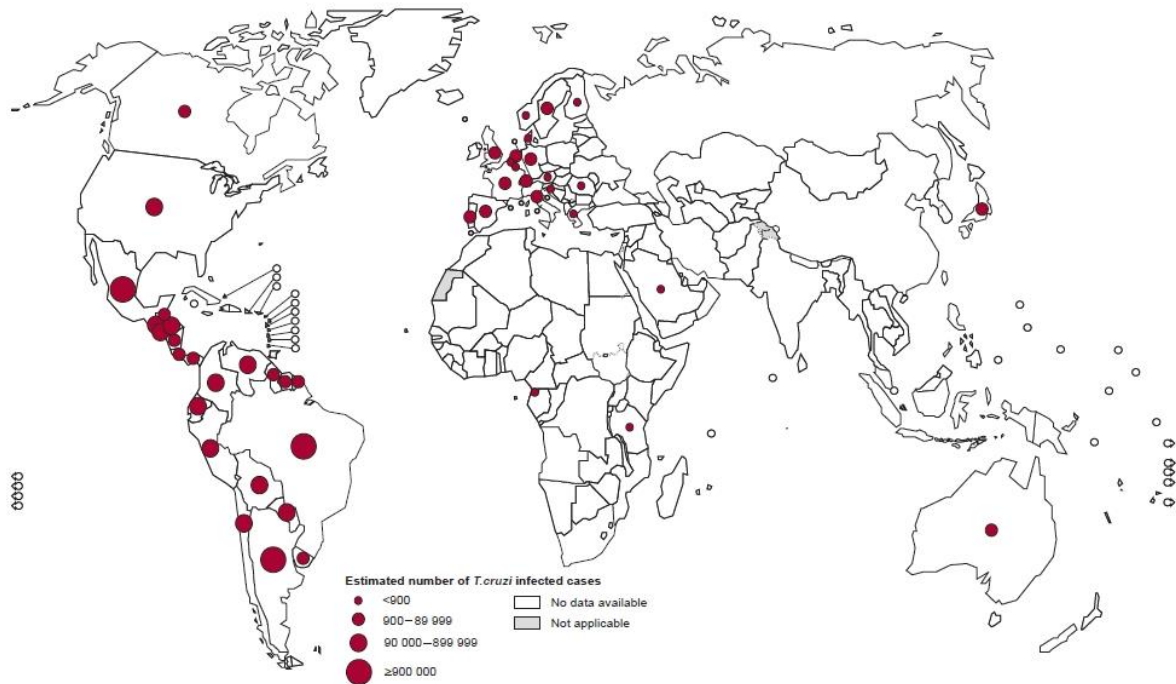
Causada pelo protozoário *T. cruzi*, encontrado nas Américas em uma variedade de reservatórios de mamíferos domésticos e selvagens, e geralmente transmitida por insetos triatomíneos sugadores de sangue infectados, a doença de Chagas (DC), é um grande problema econômico e de saúde na América Latina e uma ameaça emergente à saúde pública global, para o qual ainda não estão disponíveis vacinas ou medicamentos apropriados para intervenções no que diz respeito à saúde pública em larga escala (JrRASSI, RASSI e MARINETO, 2010; BIVONA, ALBERTI, CERNY *et al.*, 2020).

A Figura 4 apresenta a distribuição mundial de pacientes com infecção por *T. cruzi* com base nas últimas estimativas oficiais, onde observa-se que é endêmica em todos os países latino-americanos continentais.

Estima-se que aproximadamente 7 milhões de pessoas estão atualmente infectadas com *T. cruzi* e que até 120 milhões de pessoas que vivem em áreas endêmicas da América Latina estão em risco de infecção (WHO, 2020). A DC permanece sendo a doença parasitária

mais importante no hemisfério ocidental, com uma carga estimada de doença, medida pelos anos de vida ajustados pela incapacidade que é 7,5 vezes maior que a da malária (BERN, 2015).

Figura 4 - Mapa de distribuição global de indivíduos infectados com *T. cruzi* baseado em estimativas oficiais da Organização Mundial da Saúde em 2018.



Fonte: WHO, 2020.

O aumento de translações e viagens internacionais e imigração também propiciou o risco de infecção por *T. cruzi* em países não endêmicos (GASCON e PINAZO, 2010). Vários esforços foram realizados com sucesso para controlar a transmissão na América Latina, com uma redução concomitante no número de infecções agudas transmitidas por vetores. No entanto, os seres humanos também podem ser infectados com *T. cruzi* através da ingestão de alimentos e líquidos contaminados, transfusão de sangue contaminado ou transplante de órgãos, acidentes de laboratório e de mãe para filho durante a gravidez ou parto (JrRASSI, RASSI e MARIN-NETO, 2010; MUÑOZ-CALDERÓN, DÍAZ-BELLO, NOYA *et al.* 2013).

Os testes de diagnóstico são ferramentas essenciais para apoiar a vigilância de doenças e, paralelamente, ajudar a interromper a transmissão do parasita. O diagnóstico da DC é particularmente desafiador, uma vez que em diversos casos é assintomático em sua fase aguda e evolui para um estágio crônico no qual a doença apresenta diversas formas clínicas

(JrRASSI, RASSI e MARIN-NETO, 2010). Além disso, e devido a uma importante redução da parasitemia durante a fase crônica, a detecção de *T. cruzi* em amostras de sangue por exame direto, hemocultura ou xenodiagnóstico é difícil e demorado. Tem sido relatado que vários procedimentos baseados em PCR, embora sejam altamente específicos, apresentam sensibilidade abaixo do ideal e requerem conhecimento tecnológico e equipamentos de laboratório caros e especializados (BRASIL, DE CASTRO, HASSLOCHER-MORENO *et al.*, 2010). Nesta estrutura, detecção de anticorpos anti- *T. cruzi* consiste no método mais eficaz para demonstrar a exposição direta ao parasita (GOMES, LORENA e LUQUETTI, 2009).

Atualmente, os métodos sorológicos mais amplamente utilizados são o ensaio de hemoaglutinação indireta (IHA), ensaio de imuno-fluorescência indireta (IIF) e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), usando homogenatos totais de parasitas ou frações antigênicas semipurificadas (BIVONA, ALBERTI, CERNY *et al.*, 2020; BALOUZ, AGÜERO e BUSCAGLIA, 2017). Apesar de apresentarem desempenho satisfatório, esses testes mostram variações em sua reprodutibilidade e confiabilidade que podem ser atribuídas à baixa padronização dos reagentes ou à variabilidade intrínseca das respostas imunes nas populações de pacientes. Além disso, os testes sorológicos podem apresentar reatividade cruzada com outros parasitas protozoários, especialmente espécies de *Leishmania*, embora a apresentação clínica da leishmaniose seja muito diferente da apresentada pela DC (AFONSO, EBELL, TARLETON, 2012; MOURE, ANGHEBEN, MOLINA *et al.*, 2016; BUSCAGLIA, KISSINGER e AGUERO, 2015).

A detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* por métodos sorológicos ainda é o principal método para o diagnóstico da doença de Chagas. Os testes de diagnóstico disponíveis no mercado baseiam-se no uso de extratos inteiros ou frações semipurificadas das epimastigotas de *T. cruzi* (a forma não infecciosa do parasita), com uma variação considerável na reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados obtidos com diferentes métodos. A reatividade cruzada ao *T. cruzi* tem sido observada principalmente em pacientes com leishmaniose ou infecção por *Trypanosoma rangeli*, e alguns pacientes chagásicos podem apresentar resultados negativos pela sorologia clássica.

Para contornar esse cenário, nos últimos anos, a tecnologia de DNA recombinante tem sido usada para isolar e caracterizar antígenos recombinantes de *T. cruzi* que são imunodominantes em infecções humanas, os quais mostram resultados de seletividade e sensibilidade superiores na detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* quando comparado aos antígenos não recombinantes. No desenvolvimento deste trabalho foi utilizado os antígenos

recombinantes JL7, 1F8 e B13 e suas sequências de aminoácidos seguem apresentadas na Tabela 1 (EL-SAYED, MYLER, BARTHOLOMEU, *et al.*, 2005; EL-SAYED, MYLER, BLANDIN, *et al.*, 2005; GRUBER e ZINGALES, 1993; CUNHA-NETO, DURANTI, GRUBER, *et al.*, 1995; LAFAILLE, LINSS, KRIEGER, *et al.*, 1989; COTRIM, PARANHOS, MORTARA, *et al.*, 1990; COTRIM, PARANHOS-BACCALA, SANTOS, *et al.*, 1995).

Tabela 1 - Composição dos antígenos recombinantes JL7, 1F8 e B13.

Antígeno Recombinante	Sequência de aminoácidos
JL7	PRRNAREIAALEESMNARAQELAREKKLADREFLDQKPEGVPLREL PLDDDSDFVAMEQERRQLLEKDPRRNAKEIAALEESMNARAQELA REKKLADRAFLDQKPEGVSLRELPLDDDSDFVAMEQERRQLLEKD PRRNAKEIAALEESMNARAQELAREKKLADRAFLDQKPEGVPLREL PLDDDSDFVAMEQERRQLLEKDPRRNAKEIAALEESMNARAQELA REKKFADRAFLDQKPEGVPLRG
1F8	MGACGSKGSTSDKGLASDKDGKNAKDRKEAWERIRQAIPREKTAE AKQRRIELFKKFDKNETGKLCYDEVHSGCLEVLKLDEFTPRVRDIT KRAFDKARALGSKLENKGSSEDFVEFLEFRLMLCYIYDFFELTVMFD EIDASGNMLVDEEELKRAVPKLEAWGAKVEDPAALFKELDKNGTG SVTFDDFAAWASAVKLDADGDPDNVPESA
B13	GSGSAWIPGIPIFGQAAAGDKPSPFGQAAAGDKPPPFGQAAAGDK PSPFGQAAAGDKPPPFGQAAAGDKPSPFGQAAAGGKPPPFGQAAA GDKPSPFGQAAAGDKPPPFGQAAAGDKPSPFGQAAAGDKPPPFGQ AAAGDKPPPFGQAAEGDKPPPFGQAAAGDKPAPFGQAAEGDKPPP FGQAAAADKPSLFGQAAAGDKLSLFGQAAAGDK

Fonte: (EL-SAYED, MYLER, BARTHOLOMEU, *et al.*, 2005; EL-SAYED, MYLER, BLANDIN, *et al.*, 2005; GRUBER e ZINGALES, 1993; CUNHA-NETO, DURANTI, GRUBER, *et al.*, 1995; LAFAILLE, LINSS, KRIEGER, *et al.*, 1989; COTRIM, PARANHOS, MORTARA, *et al.*, 1990; COTRIM, PARANHOS-BACCALA, SANTOS, *et al.*, 1995).

UMEZAWA e colaboradores, (1999) realizou a determinação da eficiência diagnóstica via ELISA para seis antígenos recombinantes dentre eles JL7, 1F8 e B13, onde, realizou-se o imunoensaioenzimático com 541 amostras de soro de nove países da América do Sul e Central (Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Colômbia, El Salvador, Guatemala, Honduras

e Venezuela), sendo 304 pacientes chagásicos e 237 não chagásicos. Em seus estudos amostras de soro de pacientes chagásicos reagiram com pelo menos um antígeno recombinante, sugerindo que uma mistura de antígenos recombinantes poderia detectar anticorpos anti-*T. cruzi* em todas as amostras de soro. Propuseram ainda que a positividade de uma mistura antigênica hipotética composta pelos antígenos recombinantes H49 ou JL7, B13 e 1F8 é estimada como 100%.

Na ausência de um único teste de referência que mostre 100% de especificidade e sensibilidade, as diretrizes atuais desenvolvidas pela Organização Mundial da Saúde aconselham o uso de dois testes sorológicos para alcançar um diagnóstico conclusivo. No caso de resultados ambíguos ou discordantes, o diagnóstico usando uma terceira técnica deve ser realizado.

Adicionalmente, há outras necessidades e lacunas ainda não atendidas, como acesso à diagnóstico em locais de atendimento para populações negligenciadas, bem como a necessidade de desenvolvimento de testes para detecção precoce da transmissão congênita; avaliação rápida da eficácia do tratamento medicamentoso ou testes prognósticos para progressão da doença (BUSCAGLIA, KISSINGER e AGUERO, 2015; PEELING, 2015; PEELING, 2015; PECOUL, BATISTA, STOBBAERTS *et al.*, 2016; BIVONA, ALBERTI, CERNY *et al.*, 2020).

Dessa forma, fica nítido que o diagnóstico preciso é essencial para a identificação e acompanhamento precoces de casos transmitidos por vetores e para impedir a transmissão da doença por meio de transfusões de sangue e transplante de órgãos.

Neste sentido, após desenvolvimento e caracterização dos eletrodos modificados com os filmes poliméricos propostos, tais plataformas eletroquímicas foram aplicadas no desenvolvimento de um imunossensor impedimétrico para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* em amostras clínicas, utilizando-se a estratégia de imobilização dos antígenos recombinantes JL7, 1F8 e B13 sobre esses materiais.

4 METODOLOGIA

4.1 Reagentes

Ferricianeto de potássio [$K_3Fe(CN)_6$] (99%), ferrocianeto de potássio triidratado [$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$] (99%), 2-aminobenzamida (98%) OABA, 2-hidroxibenzamida (99%) OHBA, 2-aminofenol (99%) OAF, cloreto de hexaaminorutênio (II) [$Ru(NH_3)_6Cl_2$] (99,9%), cloreto de hexaaminorutênio (III) [$Ru(NH_3)_6Cl_3$] (98%), cloreto de potássio (99%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Ácido Perclórico 70 %, bastão de grafite (99,9995%) e anilina (ANI) foram obtidos da Alfa Aesar. Fosfato de potássio monobásico (99%) e fosfato de potássio dibásico (98%) foram obtidos da Labsynth. Albumina bovina fração V. segundo Cohn (BSA) foi obtida da INLAB Confiança.

Estes reagentes foram utilizados conforme recebidos e sem etapas de purificação, preparados em água ultra pura (18,2 M Ω .cm) obtida pelo sistema de purificação GEHAKA MS 2000 ALL. Todas soluções foram preparadas imediatamente antes do uso e desoxigenadas com $N_{2(g)}$ durante 10 minutos.

4.2 Preparação dos antígenos recombinantes e amostras de soro

As sequências que codificam os antígenos JL7, 1F8 e B13 de *T. cruzi* foram isoladas de diferentes vetores, subclonadas em sítio EcoRI do plasmídeo pGEX-A e expressas como polipeptídeos de fusão com o *Schistosoma japonicum* GST (EC 2.5.1.18). As proteínas de fusão foram purificadas por cromatografia de afinidade em esferas de glutathione-agarose. A pureza e especificidade das proteínas recombinantes foram analisadas por eletroforese em gel de dodecil-sulfato de sódio-poliacrilamida e *Western blotting* com um conjunto de soros chagásicos. Os teores de proteínas foram quantificados na preparação antigênica usando o kit de reagentes de proteínas Macro-BCA (Pierce). De acordo com a concentração rotulada no frasco, o volume foi ajustado com solução tampão fosfato 0,10 M, pH 7,40 até a concentração desejada (UMEZAWA, BASTOS, CAMARGO, *et al.* 1999).

Amostras de soros positivos humanos foram obtidas de pacientes de áreas endêmicas infectados pelo *T. cruzi*. Estas amostras possuem diagnóstico confirmado pelo laboratório de Imunopatologia da Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP, MG-Brasil. Em adição, soros de pacientes saudáveis foram usados como controles negativos. As amostras de soro humano e antígenos recombinantes foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de

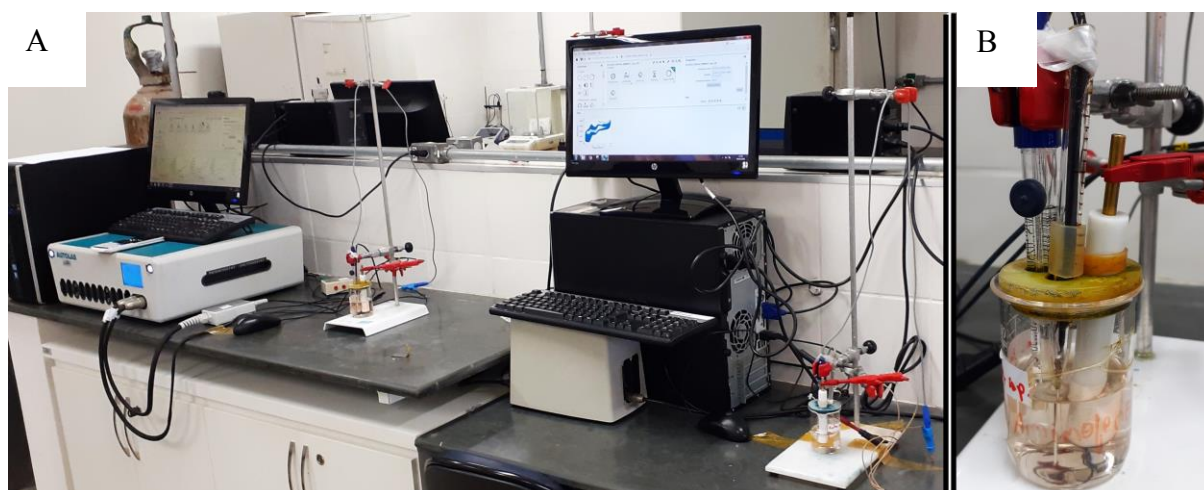
Doenças Infecciosas e Parasitárias, coordenado pela professora Hélen Rodrigues Martins, lotada no Departamento de Farmácia da UFVJM. Para obtenção da diluição desejada o volume de amostra foi ajustado com solução tampão Fosfato 0,10 M, pH 7,40.

4.3 Instrumentação e equipamentos

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando-se Potenciostato/Galvanostato da Autolab modelos PGSTAT128N e PGSTAT204, contendo módulo FRA32M, acoplado a um computador contendo o software NOVA 2.1.3.

Os experimentos eletroquímicos para geração e caracterização dos filmes poliméricos, foram conduzidos em célula eletroquímica de um compartimento com capacidade de 100,0 mL que segue apresentada na Figura 5(B). Os eletrodos foram inseridos na célula por aberturas presentes em uma cobertura de Teflon®. Os potenciais foram referidos a Eletrodo de Calomelano Saturado (ECS). Como eletrodos de trabalho (WE) foram utilizados discos de grafite com área geométrica de 29,7 mm² e como eletrodo auxiliar foi utilizado fio de platina.

Figura 5 – Imagens registrada para: (A) os equipamentos e (B) célula eletroquímica utilizados na eletrogeração e caracterização dos filmes poliméricos.

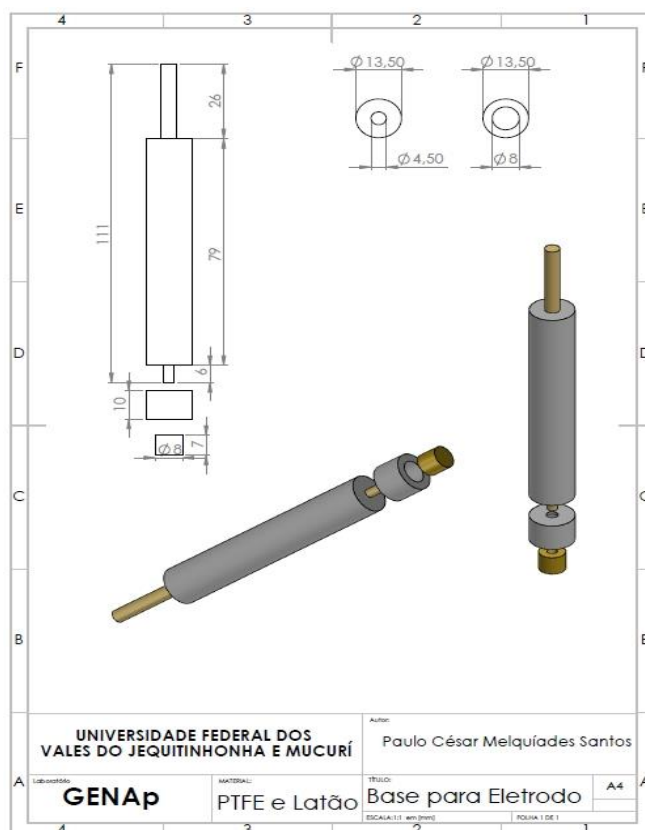


A preparação dos eletrodos de trabalho a base de grafite (EG) utilizados para o desenvolvimento das plataformas funcionalizadas seguiram a seguinte sequência: inicialmente, com o auxílio de uma micro retífica as barras de grafite, obtidas da Alfa Aesar (99,9999%), foram cortadas em tamanhos menores para obtenção de discos de grafite com espessura \pm 3-4 mm. Posteriormente, os discos de grafite foram colados sobre bases de latão

revestidas de Teflon® utilizando-se cola epóxi condutiva de prata (Chemtronics CW2460). Após um período de 10 minutos a 80 °C, estes eletrodos foram revestidos com cola epóxi Araldite® 90 minutos a fim de preencher as vacâncias entre o grafite e o latão, isolando assim o latão e a cola de prata para evitar possíveis interferências. Posteriormente, os eletrodos foram lixados em lixa d'água 3M números 200, 600, 1500 e 2000 respectivamente, para a remoção do excesso de cola Araldite®, bem como garantir polimento da superfície do eletrodo de grafite. Após este procedimento, os eletrodos de grafite foram polidos em suspensão aquosa de alumina 0,30 µm (Micropolish A, Buehler), limpos em água deionizada sob banho de ultrassom (SoniClean 2PS, Sanders) por 10 minutos, e posteriormente secos sob fluxo de N₂(g).

Para execução das medidas eletroquímicas e procedimentos experimentais estes eletrodos foram conectados ao suporte de base condutor. Após utilização, os EG eram desmontados da base de Teflon®, e o processo de preparo dos mesmos era reiniciado para o preparo de novos eletrodos. A Figura 6 apresenta o desenho técnico das respectivas base e suporte de latão revestidos de Teflon® com dimensões em [mm] confeccionado utilizando-se o *software SolidWorks*.

Figura 6 - Desenho técnico utilizando o software SolidWorks da base e suporte de latão revestidos de Teflon® utilizados na construção do eletrodo de trabalho. Unidades em [mm].



4.4 Funcionalização dos eletrodos de grafite

Antes do procedimento de eletropolimerização, os EG foram analisados e avaliados em solução aquosa de ácido perclórico 0,50 M e solução aquosa de ferrocianeto/ferricianeto de potássio 5,0 mM contendo KCl 0,1 M, Sendo assim, os eletrodos de grafite foram analisados em solução de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$, numa faixa de potencial de $-0,30$ a $+0,70$ V. Posteriormente, os eletrodos foram lavados com água deionizada, secos sob fluxo de N_2 e ciclados, sucessivamente com 3 ciclos de potencial, na faixa de potencial de $+0,00$ a $+1,20$ V em solução de $HClO_4$. Foram considerados aptos para eletropolimerização os eletrodos que apresentaram diferença de potencial entre os picos anódico e catódico (ΔE_p) de até 120 mV em solução de ferrocianeto/ferricianeto de potássio e corrente inferior a $70 \mu A$ em solução de $HClO_4$.

Após este procedimento, realizou-se a eletropolimerização dos monômeros OAF, OABA, OHBZ e ANI utilizando-se a técnica eletroquímica de voltametria cíclica (VC). Onde, inicialmente, os EG foram ciclados na faixa de potencial de $+0,00$ a $+1,20$ V a 50 mV/s para fins de investigação da seleção da faixa de potencial a ser utilizada na eletropolimerização. Os estudos de otimização da faixa de potencial foram realizados e serão detalhados na seção de resultados e discussões.

Para os estudos de formação das bicamadas, inicialmente foi selecionado um dos quatro monômeros investigados neste trabalho para eletrodeposição, e posteriormente outro monômero foi eletrossintetizado sobre a mesma superfície. Para os estudos de formação dos copolímeros, dois monômeros foram eletropolimerizados simultaneamente a partir de solução aquosa contendo os dois monômeros em concentração equimolar, a faixa de potencial de acordo com o monômero que apresenta maior potencial de oxidação. A Tabela 2 apresenta a combinação das 22 plataformas investigadas. Após a eletropolimerização, os eletrodos contendo os filmes poliméricos foram lavados com água ultra pura em abundância e secos sob fluxo de N_2 .

Posteriormente, os eletrodos modificados foram analisados em solução contendo somente o eletrólito suporte ($HClO_4$ 0,50 M) para verificação da adsorção do polímero, bem como sua atividade eletroquímica, e adicionalmente 3 ciclos de potencial foram realizados na solução do eletrólito suporte $HClO_4$ mesma faixa de eletropolimerização, para a remoção de possíveis moléculas não oxidadas do monômero, as quais podem ter sido adsorvidas durante a realização do procedimento de eletropolimerização.

Tabela 2 – Descrição das plataformas funcionalizadas investigadas para o desenvolvimento do imunossensor impedimétrico.

Homopolímeros	Bicamadas	Copolímeros
POAF	POAF_sobre_POABA	POABA_POAF_cop
POABA	POAF_sobre_POHBA	POABA_POHBA_cop
POHBA	POAF_sobre_PANI	POHBA_POAF_cop
PANI	POABA_sobre_POAF	PANI_POAF_cop
---	POABA_sobre_POHBA	PANI_POABA_cop
---	POABA_sobre_PANI	PANI_POHBA_cop
---	POHBA_sobre_POAF	---
---	POHBA_sobre_POABA	---
---	POHBA_sobre_PANI	---
---	PANI_sobre_POAF	---
---	PANI_sobre_POABA	---
---	PANI_sobre_POHBA	---

POAF = poli(o-aminofenol); POABA = poli(o-aminobenzamida); POHBA = poli(o-hidroxibenzamida) e PANI = polianilina.

4.5 Caracterização morfológica das plataformas

Análises morfológicas das plataformas funcionalizadas foram realizadas a partir de imagens obtidas pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) utilizando-se um Microscópio de Bancada da TESCAN, modelo VEGA3 LMH. As amostras foram submetidas ao preparo de amostra por metalização a fim de se evitar efeitos de carregamento durante as análises de MEV. As imagens foram obtidas a 30 kV utilizando detector de elétrons secundários em ampliações de 10.000x e 30.000x.

4.6 Investigação das propriedades eletroquímicas das plataformas

As propriedades eletroquímicas dos EG e para os eletrodos de grafite modificados (plataformas funcionalizadas) foram avaliadas pelo estudo da reação de transferência eletrônica na superfície dos eletrodos modificados, utilizando-se os pares redox ferrocianeto/ferricianeto de potássio e cloreto de hexaaminorutênio II/III. Desta forma, medidas por voltametria cíclica foram conduzidas em solução aquosa de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 5,00 mM contendo KCl 0,10 M, na faixa de potencial de -0,30 a

+0,70 V, e também em solução aquosa de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3/[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$ 5,00 mM contendo KCl 0,10 M. Estudos também foram conduzidos somente em solução do eletrólito suporte (KCl 0,10 M), na mesma região de potencial utilizada na investigação dos pares redox, a fim de verificar a contribuição da eletroatividade do filme polimérico no processo de transferência eletrônica.

Análises por espectroscopia de impedância eletroquímica dos eletrodos de grafite modificados foram conduzidos em solução de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5,00 mM contendo KCl 0,1 M. Neste caso, a solução de análise foi desoxigenada com nitrogênio ultra puro por cerca de 10 minutos antes da realização das medidas. O intervalo de frequência investigado foi de 100 kHz a 10 mHz. A amplitude de excitação senoidal foi de 10 mV a potencial de circuito aberto (OCP). Para análise dos espectros, foi realizado um ajuste dos dados experimentais a um circuito equivalente adequado utilizando o *software* NOVA versão 2.1.3.

4.7 Estudos preliminares da aplicação das plataformas no desenvolvimento de um imunossensor

Após a síntese e caracterização as plataformas funcionalizadas foram aplicadas para o desenvolvimento de imunossensores para diagnóstico da doença de Chagas, onde, após a etapa de modificação dos EG, procedeu-se com a imobilização, via adsorção física, do antígeno sobre a superfície funcionalizada.

Um volume de 70 μL da solução antigênica foi ejetado sobre a superfície de cada uma das plataformas, mantendo-se o dispositivo na estufa a 25 °C por 30 minutos. Em seguida, os eletrodos foram lavados em tampão fosfato pH 7,40 por 6 s, e secos com $\text{N}_{2(\text{g})}$. Após este procedimento, um volume de 70 μL de solução de BSA 0,1% foi colocado sobre a superfície dos imunossensores durante 10 minutos e mantidos em estufa a temperatura de 25 °C, os eletrodos foram então novamente lavados em solução tampão fosfato pH 7,40 por 6 s e secos com $\text{N}_{2(\text{g})}$.

Posteriormente a essa etapa, avaliou a interação do imunossensor com amostras clínicas contendo anticorpos positivos para a doença de Chagas (Ab+) e amostras de pacientes saudáveis (Ab-, contraprova), onde um volume de 70 μL da amostra diluídas em 1/320 foi adicionado sobre a superfície dos eletrodos (estufa a 37 °C por 30 minutos). Os imunossensores foram então, novamente lavados por 6 s em solução tampão fosfato pH 7,4 e secos com $\text{N}_{2(\text{g})}$. Medidas de EIE, conforme descrito na seção 4.6, foram realizadas para avaliar as superfícies dos eletrodos contendo o Ag e Ag-Ac.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Condicionamento dos eletrodos de grafite

Sob a óptica analítica do desenvolvimento de métodos e sistemas de detecção aplicados ao diagnóstico de doenças, a confiabilidade é uma variável extremamente importante. É notório que a confiabilidade é função da reprodutibilidade, dessa forma, a fim de se alcançar boa confiabilidade, o condicionamento dos EG é uma importante etapa para o processo de eletropolimerização. Considerando que os eletrodos de trabalho são construídos de forma manual em nosso laboratório, eles devem apresentar respostas semelhantes para serem utilizados nos experimentos, para que, qualquer variação observada após o procedimento de modificação possa ser atribuída, exclusivamente, às variações dos parâmetros analisados.

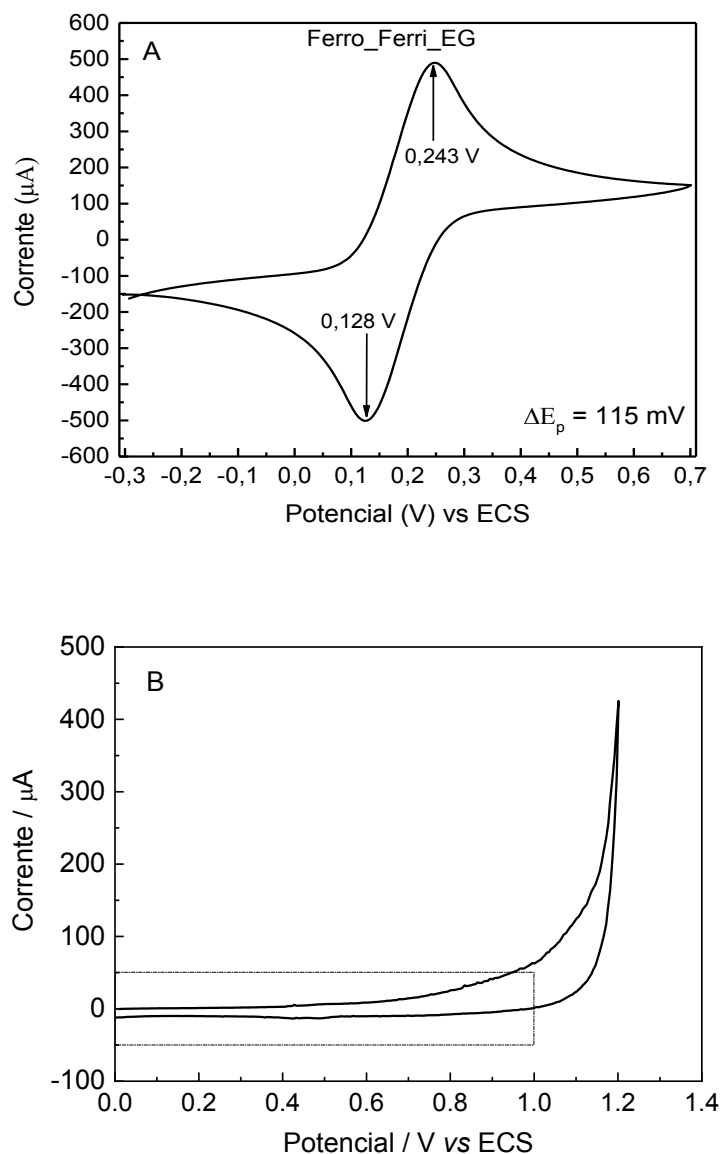
Desta forma, antes de realizar a eletropolimerização, os EG foram selecionados e condicionados eletroquimicamente em solução de ácido perclórico e solução de ferro/ferricianeto potássio. O par redox apresenta comportamento eletroquímico bem conhecido e definido, sendo considerado um padrão eletroquímico para esse tipo de análise. Assim, uma solução aquosa de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 5,0 mM contendo KCl 0,1 M foi utilizada como parâmetro de seleção dos eletrodos de grafite. O perfil do voltamograma cíclico obtido para eletrodos de grafite não modificados é apresentado na Figura 7A.

As análises realizadas em solução contendo o par redox $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ foram utilizadas como parâmetro indicativo da qualidade de resposta eletroquímica do EG. Sabe-se que, para uma reação reversível, espera-se que valores da corrente de pico catódica (I_{pc}) e da corrente de pico anódica (I_{pa}) sejam aproximadamente iguais em valores absolutos, porém com sinais opostos ($|I_{pa}/I_{pc}| = 1$). Além disso, em tese, para uma reação reversível envolvendo apenas um elétron, uma diferença de potencial entre os picos anódicos e catódicos (ΔE_p) de 60 mV ($\Delta E_p = 60$ mV) é esperada. Porém, na prática, valores de ΔE_p de até 100 mV são considerados aceitáveis para reações reversíveis em eletrodos porosos (BARD, FAULKNER, 1980).

Na Figura 7A observa-se que o eletrodo de grafite apresentou $\Delta E_p = 115$ mV e relação de $I_{pa}/I_{pc} = 0,99$ para o par redox estudado. Uma vez que estes EG apresentam elevada porosidade, a área eletroquimicamente ativa é um dos parâmetros analisados mais relevantes, pois a concentração das espécies em solução, coeficientes de difusão e velocidade de varredura não se alteram ao se comparar distintos eletrodos de grafite. A obtenção de ΔE_p

superior a 100 mV nestes eletrodos é efeito da elevada porosidade, que afeta o fenômeno de difusão da espécie eletroativa no interior dos poros quando comparada à superfície não porosa.

Figura 7 - Voltamograma cíclico obtido para o EG em: (A) solução de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 5,0 mM contendo 0,1 M de KCl e (B) solução de $HClO_4$ 0,5 M. $v = 75$ mV/s.



Após a análise em solução do par redox, os eletrodos foram avaliados em solução do eletrólito suporte $HClO_4$. A análise realizada em ácido perclórico permite avaliar a presença ou ausência de possíveis interferentes eletroativos na superfície do eletrodo, na faixa de estudo utilizada para a eletropolimerização. Dessa forma, os eletrodos foram submetidos a três ciclos consecutivos de varredura de potencial na região de 0,00 a +1,20 V em solução de $HClO_4$ 0,5 M, o que também pode garantir uma limpeza eletroquímica na superfície do

mesmo. Na Figura 7B é apresentado o perfil obtido para os EG utilizados no desenvolvimento deste trabalho, onde adotou-se como referência, a utilização de eletrodos que apresentavam valores de correntes capacitivas inferiores a $70 \mu\text{A}$ na faixa de potencial de $+0,00$ a $+1,00$ V, e valores máximos de correntes capacitivas em aproximadamente $500 \mu\text{A}$ para potenciais acima de $+1,00$ V. Observa-se ainda que os EG não apresentaram correntes faradáicas na região de potencial investigada na Figura 7B, apresentando, portanto, comportamento de eletrodos idealmente polarizáveis, sendo, então, adequados aos estudos de plataformas funcionalizadas deste trabalho.

5.2 Eletropolimerizações

Nos estudos de modificação dos EG e, conseqüentemente formação das plataformas funcionalizadas, realizou-se a eletropolimerização na forma de homopolímeros, bicamadas e copolimerização, conforme descrito na Tabela 2. Investigações a respeito do comportamento eletroquímico das plataformas poli-o-aminofenol (POAF) e polianilina (PANI) estão reportadas na literatura por diversos autores (SRINIVASAN, ELAIYAPPILLAI, ANANDARAJ, *et al.*, 2020; DAIKH, ZEGGAI, BELLIL, *et al.*, 2018; WANG, LINC, SHEN, 2016; SIMOTWO e KALRA, 2016; CIRIELLO, CARBONE, COVIELLO, *et al.*, 2020; ZOROMBA, TASHKANDI, ALSHEHRI, *et al.*, 2020; LI, ZHAO e WEI, 2009), enquanto que para a poli(o-aminobenzamida) (POABA) não há registro e para poli(o-hidroxibenzamida) (POHBA) há pouco de estudo a respeito do comportamento eletroquímico (ALVES, CORRÊA, da CRUZ, *et al.*, 2018).

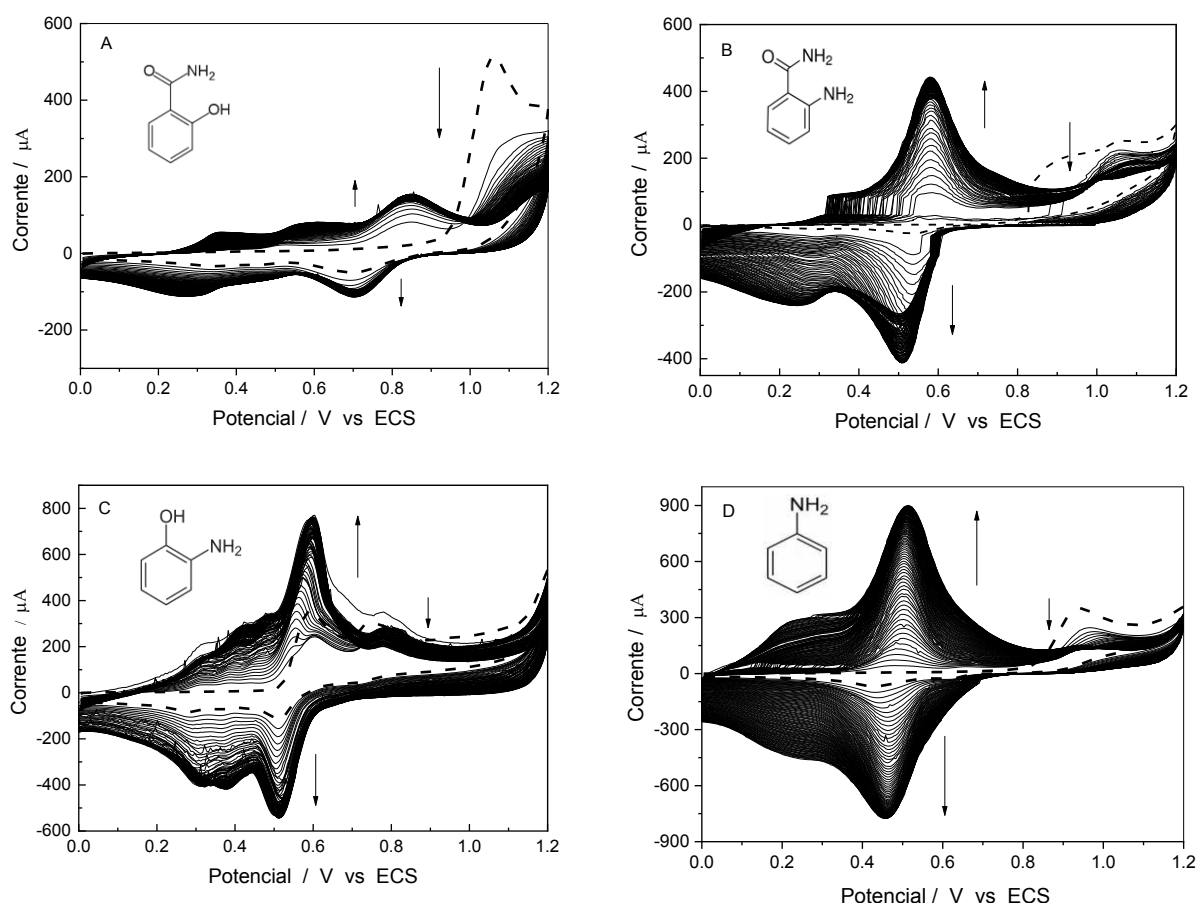
É reportado na literatura que a eletropolimerização de monômeros que possuem grupos aromáticos ligados diretamente ao oxigênio ou nitrogênio é mais fácil de ser realizada devido ao fato de produzir filmes poliméricos eletroativos e condutores, além de apresentarem alta reprodutibilidade e possuírem maior estabilidade (HEINZE, 1990; SYED e DINESAN, 1991). Cabe ressaltar ainda, que plataformas funcionalizadas contendo grupos amina, carboxila ou aldeído podem favorecer a formação de ligações covalentes com biomoléculas, uma vez que esses grupos podem constituir locais reativos para a incorporação de biomoléculas, com aplicações em sensores eletroquímicos, catálise e outros (LI e LIN, 2007; GERARD, CHAUBEY e MALHOTRA, 2002; SANTOS, PIMENTA, THOMASINI, *et al.* 2019).

Os monômeros utilizados no desenvolvimento deste trabalho pertencem a classe de anilina e anilinas substituídas e fenol substituído sendo, portanto, muito semelhantes entre

si, pois possuem grupos funcionais oxidáveis (-NH₂ e -OH). A oxidação eletroquímica e a formação de cátions radicais da ANI e OABA ocorrem através dos grupos amina, enquanto para o OAF e OHBA ocorre através dos grupos hidroxila.

A Figura 8 apresenta os VCs obtidos para o EG na eletropolimerização de cada um dos monômeros investigados neste trabalho, onde observa-se que no primeiro ciclo de potencial ocorre a oxidação irreversível da OHBA (Figura 8A) em +1,05 V, a do OABA (Figura 8B) em +0,80 V, a do OAF (Figura 8C) em +0,60 V e +0,75 V e a da ANI (Figura 8D) em +0,90 V, sem processos catódicos correspondentes na varredura reversa.

Figura 8 - Voltamogramas cíclicos obtidos para a eletropolimerização dos monômeros: (A) OHBA, (B) OABA, (C) OAF e (D) ANI sobre os EG. Número de ciclos = 100; ν = 50 mV/s. Eletrólito suporte HClO₄ 0,5 M. Concentração do monômero = 2,5 mM. (- - -) 1º ciclo de potencial. Inserido: estrutura química dos monômeros.



Para todos os monômeros nota-se que durante as varreduras de potencial subsequentes, a corrente de pico de oxidação do monômero diminui, indicando um possível consumo das espécies na interface eletrodo/solução. Contudo, já no segundo ciclo de potencial, um par redox que inclui a faixa de potencial +0,3 e +1,0 V é observado para o

POHBA, de +0,3 e +0,8 V para a POABA, de +0,3 e +0,9 V para o POAF e de +0,3 e +0,65 V para a PANI. Tais processos, podem estar relacionados a formação e deposição de um material eletroativo na superfície do EG. Conseqüentemente, aumentando-se o número de varreduras de potencial, há um aumento nos valores de corrente que pode estar relacionado a quantidade de polímero eletrodepositado na superfície do eletrodo.

5.2.1 Eletrodos de grafite modificados com homopolímeros

Para os estudos utilizando a eletropolimerização dos monômeros na forma de homopolímeros sobre a superfície dos EG as seguintes faixas de potencial foram utilizadas: +0,15 a +0,7 V (OAF); +0,55 a +1,2 V (OHBA); +0,1 a +1,1 V (ANI) e de +0,37 a +1,0 V (OABA), com 100 ciclos de varredura de potencial a 50 mV/s.

Na formação dos polímeros derivados de OAF, OHBA e OABA, em faixas de potencial maiores que as utilizadas para os estudos em monocamadas há formação de mais de um par redox resultando na possibilidade de reações paralelas com o filme em crescimento, que podem interferir na estrutura do polímero em formação, influenciando portanto a caracterização do filme, conforme voltamogramas apresentados na Figura 8.

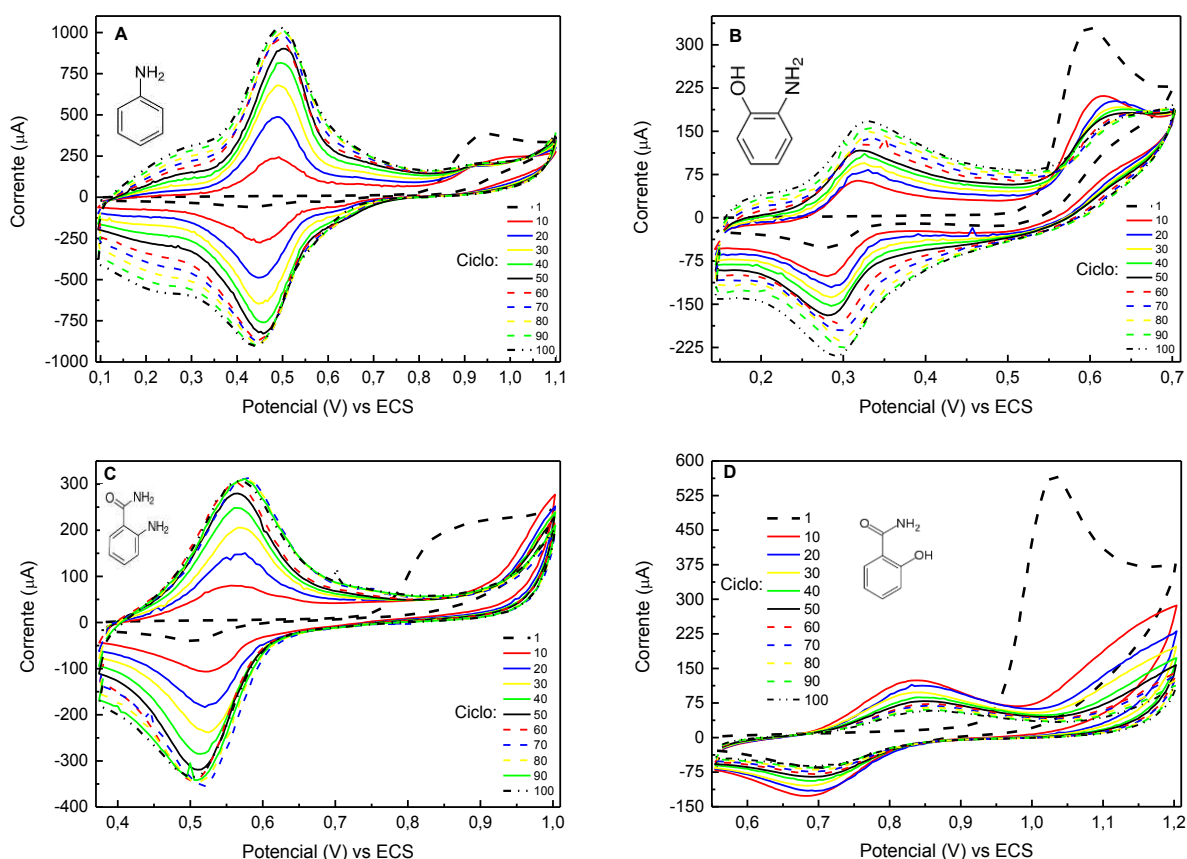
A Figura 9 apresenta os VCs referentes aos sucessivos ciclos de potencial para OAF, OHBA, OABA e ANI para o eletrodo modificado com 100 ciclos de varredura, considerando as faixas de potencial selecionadas.

Pode-se notar na Figura 9 que na primeira varredura de potencial a oxidação irreversível dos monômeros, ANI, OAF, OABA e OHBA próximo de +0,90 V; +0,60 V; +0,80 V; +1,05 V, respectivamente. Nesta etapa há a formação do cátion-radical, necessário para iniciar a polimerização dos monômeros. Observa-se, ainda, que para varreduras de potencial subsequentes há um decréscimo nos valores da corrente de pico anódica (I_{pa}) dos monômeros, associado à um deslocamento de potencial para potenciais mais anódicos, ocasionando dificuldade de oxidação de mais monômero, sugerindo um possível bloqueio da superfície do EG pela adsorção do filme polimérico.

Analisando-se a Figura 9, o aparecimento no primeiro ciclo de potencial de uma onda de redução por volta de +0,43 V; +0,30 V; +0,52 V e +0,70 para os filmes poliméricos oriundos de ANI, OAF, OABA e OHBA respectivamente, pode ser atribuído à redução do material adsorvido na superfície do eletrodo. Contudo, à medida que se realiza os sucessivos ciclos de potencial o respectivo processo de oxidação correspondente aparece na região próxima de +0,50 V; +0,33 V; +0,57 V e +0,83 V para POAF, POABA e POHBA

respectivamente. O processo redox mostra aumento nos valores de corrente com os sucessivos ciclos de potencial, indicando a formação/adsorção de um material eletroativo sobre o eletrodo de grafite.

Figura 9 - Voltamogramas cíclicos obtidos para o EG durante o processo de eletropolimerização dos monômeros: (A) ANI, (B) OAF, (C) OABA e (D) OHBA. Número de ciclos = 100; $v = 50$ mV/s. Eletrólito suporte: HClO_4 0,5 M. . Concentração do monômero = 2,5 mM.

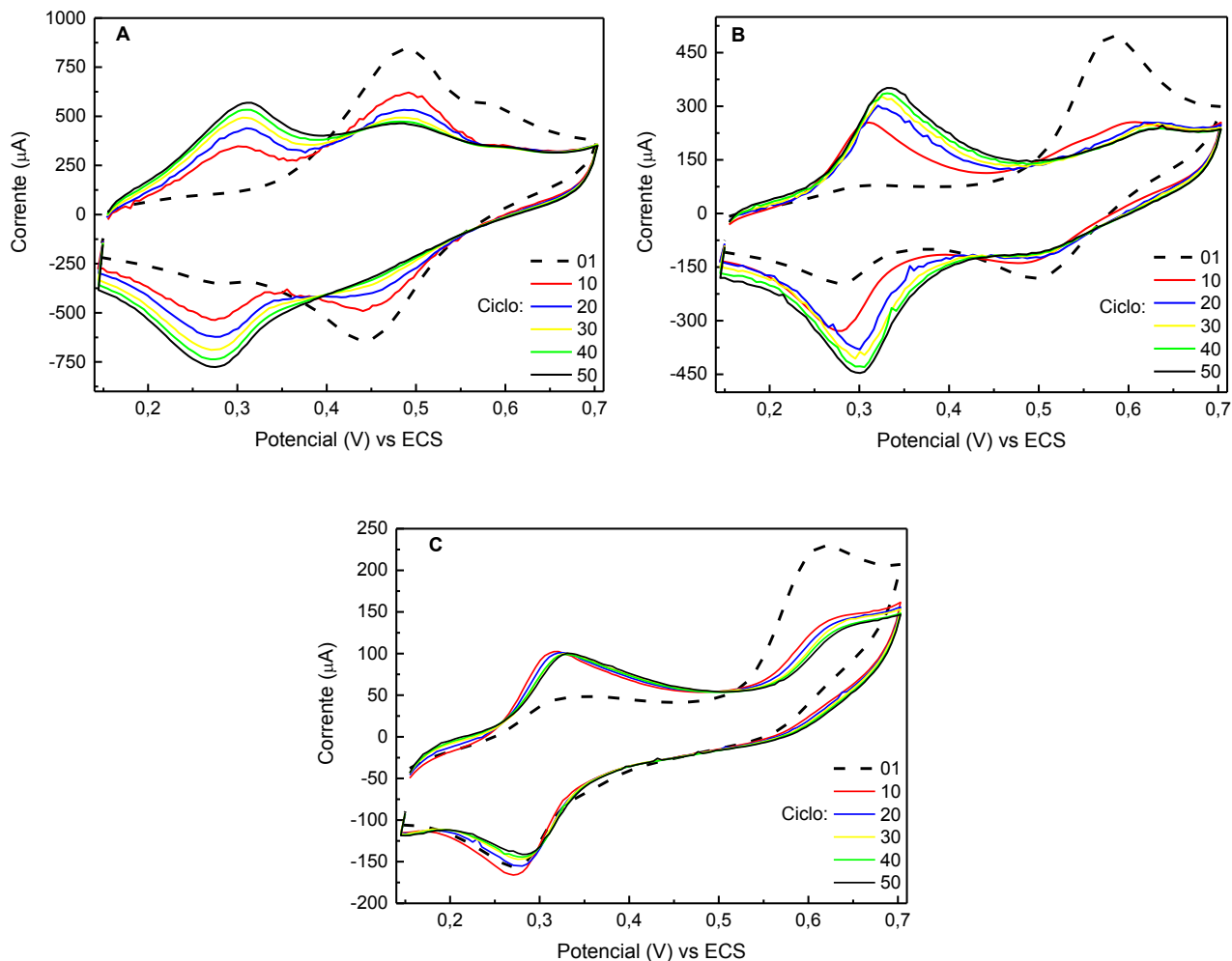


5.2.2 Eletrodos de grafite modificados com bicamadas

Os estudos conduzidos para os monômeros OAF, OHBA, ANI e OABA para o modo bicamada foram avaliados considerando as seguintes faixas de potencial de +0,15 a +0,7 V; +0,55 a +1,2 V; +0,1 a +1,1 V e +0,37 a +1,0 V, respectivamente, com 50 ciclos de varredura de potencial para cada camada.

Na Figura 10 é apresentado os perfis eletroquímicos para a formação de bicamadas de POAF sobre filmes de PANI, POABA e POHBA.

Figura 10 - Voltamogramas cíclicos obtidos para o EG durante o processo de eletropolimerização das bicamadas de: (A) OAF_sobre_PANI; (B) OAF_sobre_POABA e (C) OAF_sobre_POHBA. Número de ciclos = 50; $\nu = 50$ mV/s. Eletrólito suporte HClO_4 0,5 M.



Observa-se a oxidação irreversível do monômero OAF próximo de +0,60 V referente a formação do cátion-radical, que, à medida que se aumenta o número de ciclos de potencial decresce nos valores da I_{pa} do monômero, associado à um deslocamento de potencial para potenciais mais anódicos, dificultando a oxidação de mais monômero; sugerindo um consumo de monômero próximo a superfície do eletrodo, para a formação e deposição do filme de POAF sobre a camada polimérica já existente.

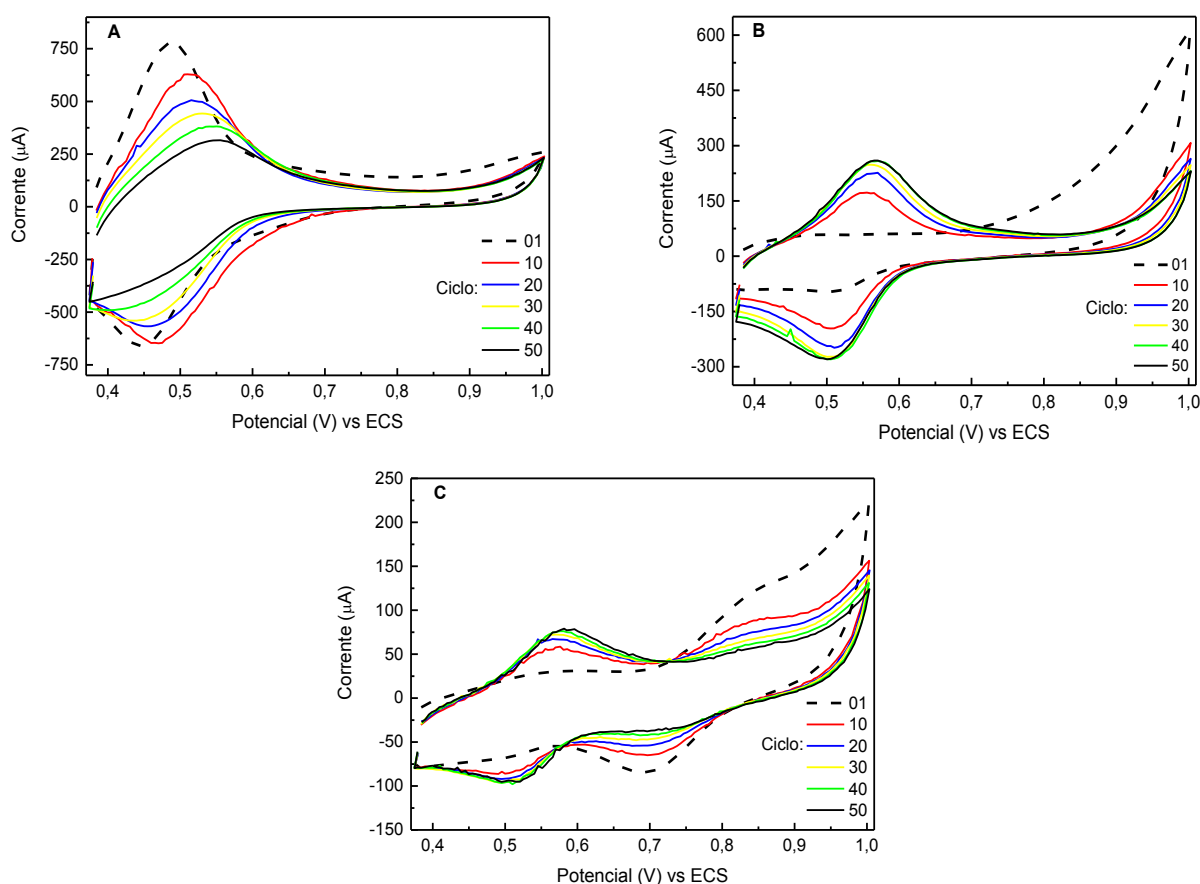
Na Figura 10 é possível observar, ainda, que os voltamogramas correspondentes a formação do filme de POAF sobre os filmes de PANI (Figura 10A), POABA (Figura 10B) e POHBA (Figura 10C) apresentam nos ciclos iniciais os picos redox característicos da resposta dos filmes da primeira camada, correspondentes à interconversão entre seus estados de oxidação, sendo que, conforme aumenta o número de ciclos ocorre a redução da intensidade destes processos redox. Estes resultados demonstram que à medida que ocorre a formação do

filme de POAF sobre os filmes de PANI, POABA e POHBA a resposta voltamétrica característica da primeira camada vai se perdendo e tende àquela observada para um filme de POAF sobre EG e, portanto, pode-se concluir que o filme de POAF recobre o polímero que foi depositado primeiro.

A eletrodeposição de POAF sobre PANI e POABA apresenta valores crescentes de corrente na região de eletroatividade do filme de POAF até o último ciclo de potencial enquanto a deposição de POAF sobre POHBA decresce nos valores de corrente na região supracitada para varreduras superiores a 10 ciclos. Isto torna evidente que, a eletrodeposição do filme de POAF sobre as plataformas de PANI (Figura 10A) e POABA (Figura 10B) é favorecida, uma vez que para estes observa-se maiores valores de corrente quando comparados ao filme de POAF eletrodepositado sobre POHBA (Figura 10C), sendo que, está associado ao efeito de autodopagem da bicamada em formação, e que neste caso, sugere ser desfavorecida pela presença do grupo funcional hidroxila presente nos filmes de POHBA.

A Figura 11 apresenta os perfis de formação de bicamadas do filme de POABA sobre os filmes de PANI, POAF e POHBA.

Figura 11 - Voltamogramas cíclicos obtidos para o EG durante o processo de eletropolimerização das bicamadas de: (A) OABA_sobre_PANI; (B) OABA_sobre_POAF e (C) OABA_sobre_POHBA. Número de ciclos = 50; $v = 50$ mV/s. Eletrólito suporte HClO_4 0,5 M.



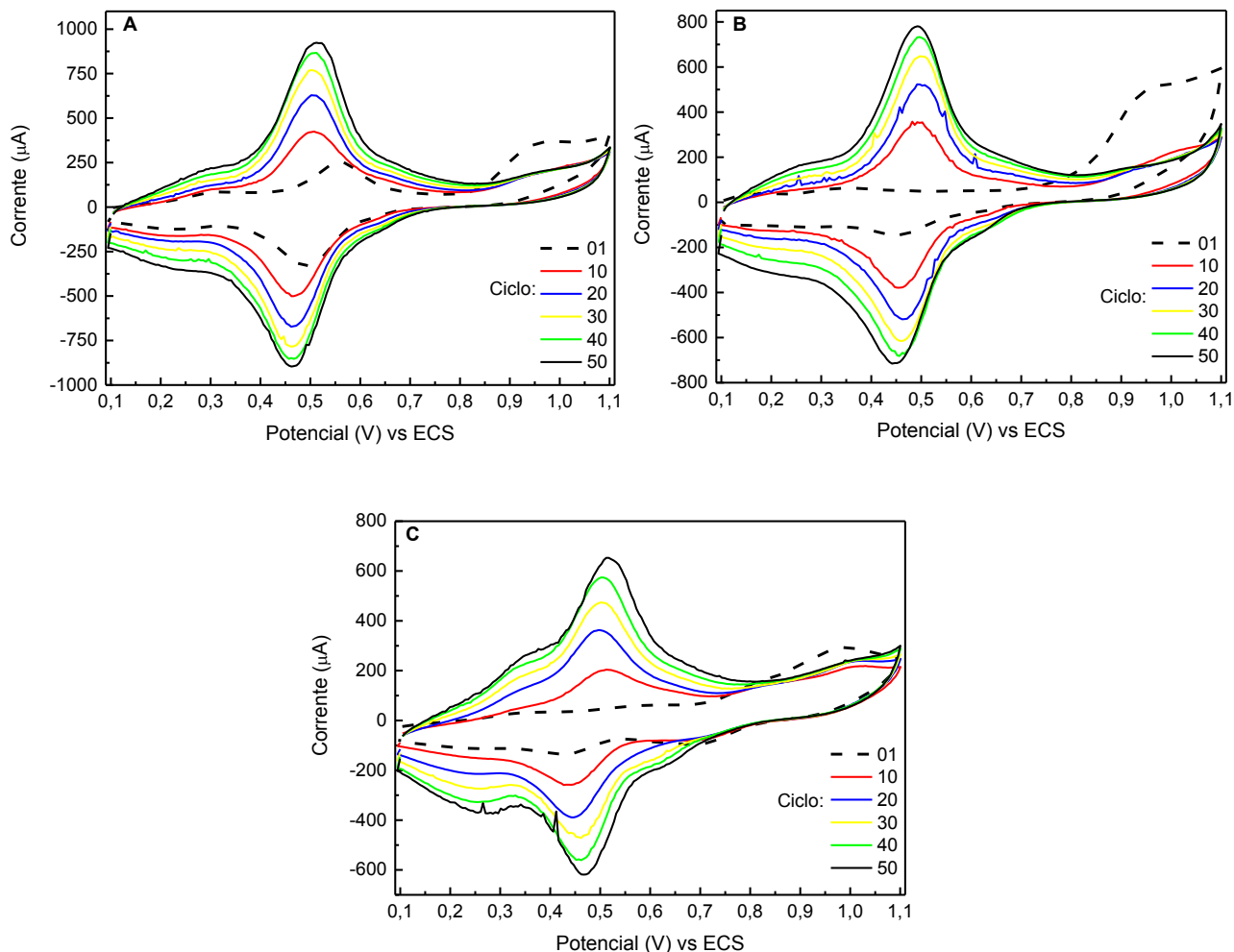
Observa-se que a oxidação irreversível do monômero OABA que seria próximo de +0,80 V referente a formação do cátion-radical foi deslocada para potenciais mais anódicos devido a influência da primeira camada polimérica já formada. Conforme se aumenta o número de ciclos de potencial decresce nos valores da I_{pa} do monômero, associado à um deslocamento de potencial para potenciais ainda mais anódicos, dificultando a oxidação de mais monômero; sugerindo um consumo de monômero próximo a superfície do eletrodo, para a formação e deposição do material polimérico derivado de POABA.

É possível observar, ainda, que o voltamograma correspondente a formação do filme de POABA sobre o filme de PANI (Figura 11A) não apresenta aumento de corrente na região de eletroatividade do filme de POABA (+0,4 a +0,6 V), evidenciando portanto dificuldade de crescimento do filme de POABA sobre a camada de PANI pré-existente. Para os demais (Figura 11B e Figura 11C), observa-se que há um aumento de corrente na região de eletroatividade do filme de POABA, conforme aumenta-se o número de ciclos. Isto evidencia que, a eletrodeposição do filme de POABA sobre as plataformas de POAF (Figura 11B) e POHBA (Figura 11C) é favorecida, estando assim, associado ao efeito de autodopagem da bicamada em formação, e que neste caso, sugere ser desfavorecida pela presença da primeira cama de PANI.

Na Figura 12, é mostrado os perfis de formação de bicamadas do filme de PANI sobre os filmes de POABA, POAF e POHBA. Observa-se a oxidação irreversível do monômero ANI próximo de +0,90 V referente a formação do cátion-radical, que, à medida que se aumenta o número de ciclos de potencial decresce nos valores da I_{pa} do monômero, associado à um deslocamento de potencial para potenciais mais anódicos, dificultando a oxidação de mais monômero; sugerindo portanto, um consumo de monômero próximo a superfície do eletrodo, para a formação e deposição do material polimérico derivado da ANI.

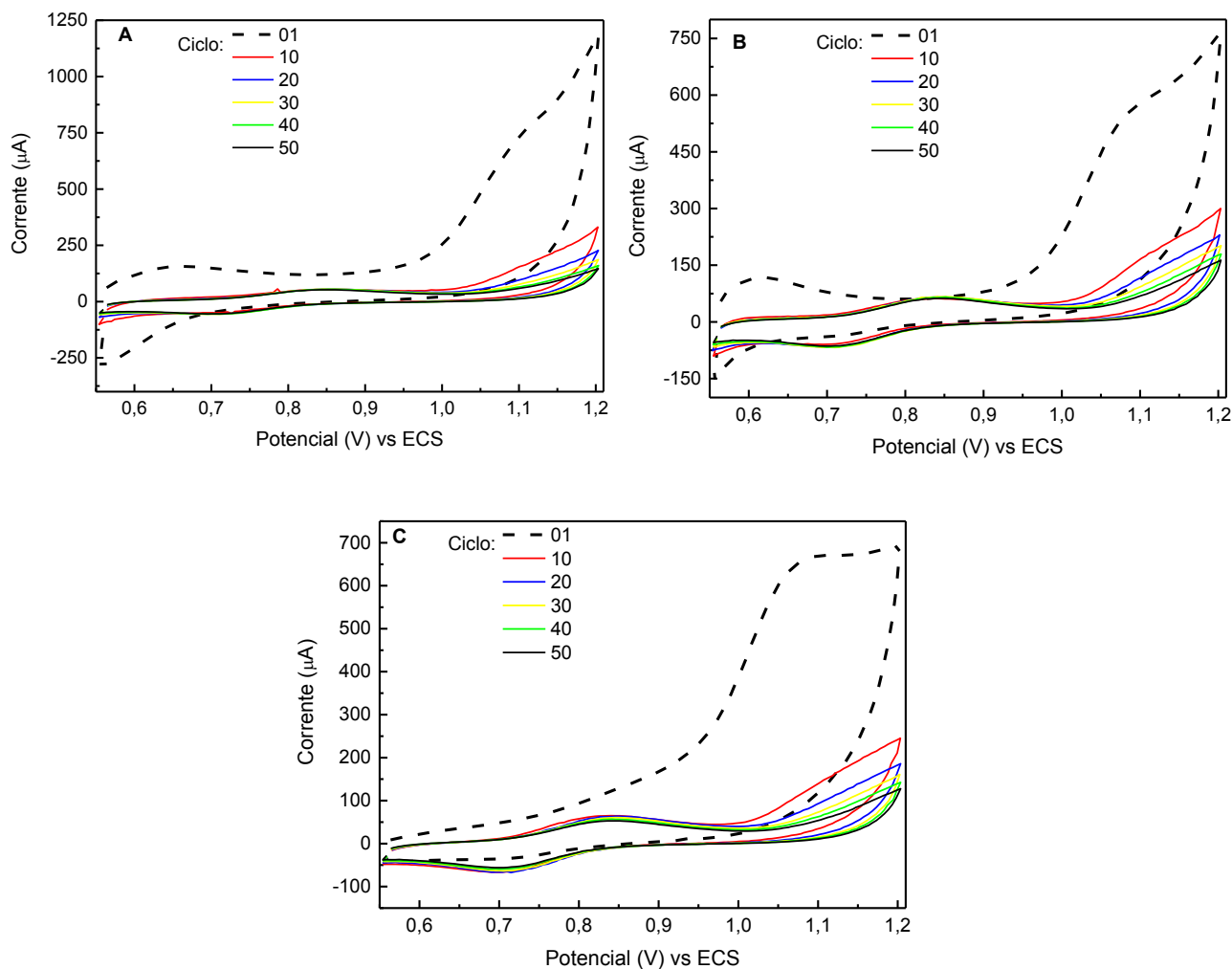
Nos voltamogramas, apresentados na Figura 12A, Figura 12B e Figura 12 observa-se que há um aumento de corrente na região de eletroatividade do filme de PANI (+0,3 a +0,6 V) conforme se aumenta o número de ciclos de potencial, e que a resposta voltamétrica característica da primeira camada vai se perdendo e tende àquela observada para um filme de PANI sobre EG (Figura 9A) e, portanto, indica o filme de PANI recobre o polímero que foi depositado na primeira camada; possibilitando inferir que a eletrodeposição da PANI sobre os filmes de POABA, POAF e POHBA foi favorecida pelo efeito de autodopagem da bicamada com a primeira camada polimérica existente.

Figura 12 - Voltamogramas cíclicos obtidos para o EG durante o processo de eletropolimerização das bicamadas de: (A) ANI_sobre_POABA; (B) ANI_sobre_POAF e (C) ANI_sobre_POHBA. Número de ciclos = 50; $\nu = 50$ mV/s. Eletrólito suporte HClO_4 0,5 M.



A Figura 13 apresenta os perfis de formação de bicamadas do filme de POHBA sobre os filmes de PANI (Figura 13A), POABA (Figura 13B) e POAF (Figura 13C). Observa-se a oxidação irreversível do monômero OHBA próximo de +1,10 V referente a formação do cátion-radical com leve descolamento para potenciais mais anódicos quando comparada ao mesmo filme gerado sobre EG (Figura 9D) devido a influência da primeira camada polimérica já formada. Observa-se que a medida que se aumenta o número de ciclos de potencial decresce os valores da I_{pa} do monômero, associado à um deslocamento de potencial para potenciais mais anódicos, dificultando a oxidação de mais monômero; sugerindo um consumo de monômero próximo a superfície do eletrodo, para a formação e deposição do material polimérico derivado de 2-HBA.

Figura 13 - Voltamogramas cíclicos obtidos para o EG durante o processo de eletropolimerização das bicamadas de: (A) OHBA_sobre_PANI; (B) OHBA_sobre_POABA e (C) OHBA_sobre_POAF. Número de ciclos = 50; $v = 50$ mV/s. Eletrólito suporte HClO_4 0,5 M.



Ainda é possível observar que os voltamogramas correspondentes a formação de bicamadas de POHBA sobre os filmes de PANI (Figura 13A), POABA (Figura 13B), e POAF (Figura 13C) não apresentam aumento significativo de corrente faradáica na região de eletroatividade do filme de POHBA (+0,60 a +0,95 V). Isto evidencia que a eletropolimerização do filme de POHBA gera um produto com elevada resistência à transferência de carga ou ainda, que a eletropolimerização está sendo desfavorecida pelo impedimento estérico dos grupos funcionais ancorados ou até mesmo por efeito de autodopagem ineficiente pela bicamada em formação.

5.2.3 Eletrodos de grafite modificados com copolímeros

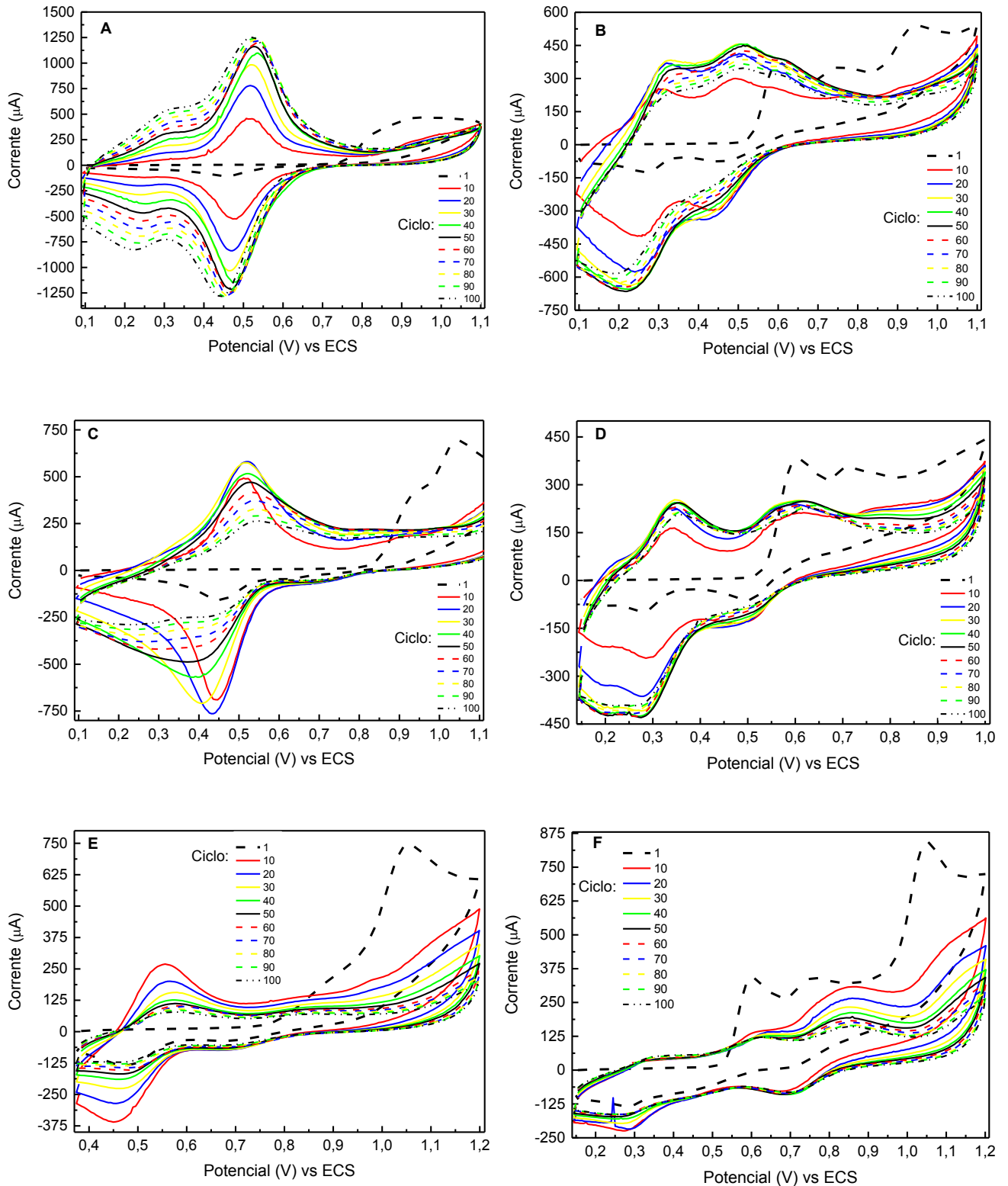
Com o intuito de eletrossintetizar copolímeros, com pares de monômeros na cadeia polimérica, foi utilizado uma mistura de dois monômeros em concentração de 2,5 mM para cada copolímero formado, conforme Tabela 2, em ácido perclórico 0,50 M, sobre EG e a uma velocidade de varredura de 50 mV/s. Para formação dos copolímeros adotou-se aquela faixa de potencial que abrangeria a oxidação de ambos os monômeros envolvidos em cada copolímero. Na formação dos copolímeros realizou-se 100 ciclos de varredura de potencial.

Na Figura 14 são apresentados os voltamogramas obtidos na formação dos copolímeros, onde observa-se que para o copolímero PANI_POABA_cop (Figura 14A) o perfil voltamétrico observado é como se existisse apenas o monômero ANI na solução de eletropolimerização, indicando que há predominância de ANI no polímero formado.

Na formação dos demais copolímeros (Figura 14B, Figura 14C, Figura 14D, Figura 14E e Figura 14F) observa-se no primeiro ciclo a oxidação irreversível dos monômeros OAF, ANI, OHBA e OABA em potenciais próximo de +0,6 V e +0,7 V; +0,9 V; +1,05 V; +0,9 V, respectivamente referentes a formação dos respectivos cátions-radical com leve descolamento quando comparado aos homopolímeros gerados sobre EG (Figura 9), devido a influência da presença de duas espécies monoméricas com potenciais de eletropolimerização próximos em cada copolímero. Observa-se, que, analogamente ao observado para as demais plataformas, à medida que se aumenta o número de ciclos de potencial decresce os valores da I_{pa} dos monômeros.

Observa-se que o voltamograma correspondente a formação do copolímero PANI_POHBA_cop (Figura 14C) apresentam aumento de corrente predominantemente na região de eletroatividade da ANI (+0,2 a +0,6 V), evidenciando, portanto, que a estrutura do copolímero formado possui carácter majoritário da ANI. Os copolímeros PANI_POAF_cop (Figura 14B) e POABA_POAF_cop (Figura 14D) apresentam aumento de corrente na região de eletroatividade dos monômeros envolvidos em cada caso, evidenciando que a estrutura do copolímero formado deriva das contribuições de ambos os monômeros envolvidos em cada copolímero; sendo notório ainda, que após 50 ciclos de varredura de potencial não há aumento da corrente na região de eletroatividade dos copolímeros formados.

Figura 14 - Voltamogramas referentes aos sucessivos ciclos de potencial na formação dos copolímeros: (A) PANI_POABA_cop; (B) PANI_POAF_cop; (C) PANI_POHBA_cop; (D) POABA_POAF_cop; (E) POABA_POHBA_cop e (F) POAF_POHBA_cop. Número de ciclos = 100; $\nu = 50$ mV/s. Eletrólito suporte HClO_4 0,5 M.



Na formação do copolímero POABA_POHBA_cop (Figura 14E) o perfil voltamétrico apresentado evidencia característica predominante do filme de POHBA, indicando que a estrutura do copolímero formado possui contribuição majoritária de OHBA. Observa-se ainda, que após 10 ciclos de varredura de potencial há decréscimo da corrente na região de eletroatividade do copolímero formado. Esta análise, corrobora com a observação feita para a formação da bicamada de POHBA_sobre_POABA, onde a eletropolimerização do filme de POHBA gera um produto com elevada resistência à transferência de carga ou ainda, que a eletropolimerização está sendo desfavorecida pelo impedimento estérico dos grupos funcionais ancorados ou até mesmo por efeito de autodopagem ineficiente.

O perfil voltamétrico apresentado na formação do copolímero POHBA_POAF_cop (Figura 14F) mostra que ambos os monômeros envolvidos contribuem para o copolímero formado, porém, após 10 ciclos de varredura de potencial há decréscimo da corrente na região de eletroatividade do copolímero formado. Novamente, esta análise, corrobora com as observações feitas para a formação da bicamada de POHBA_sobre_POABA e para o copolímero POABA_POHBA_cop.

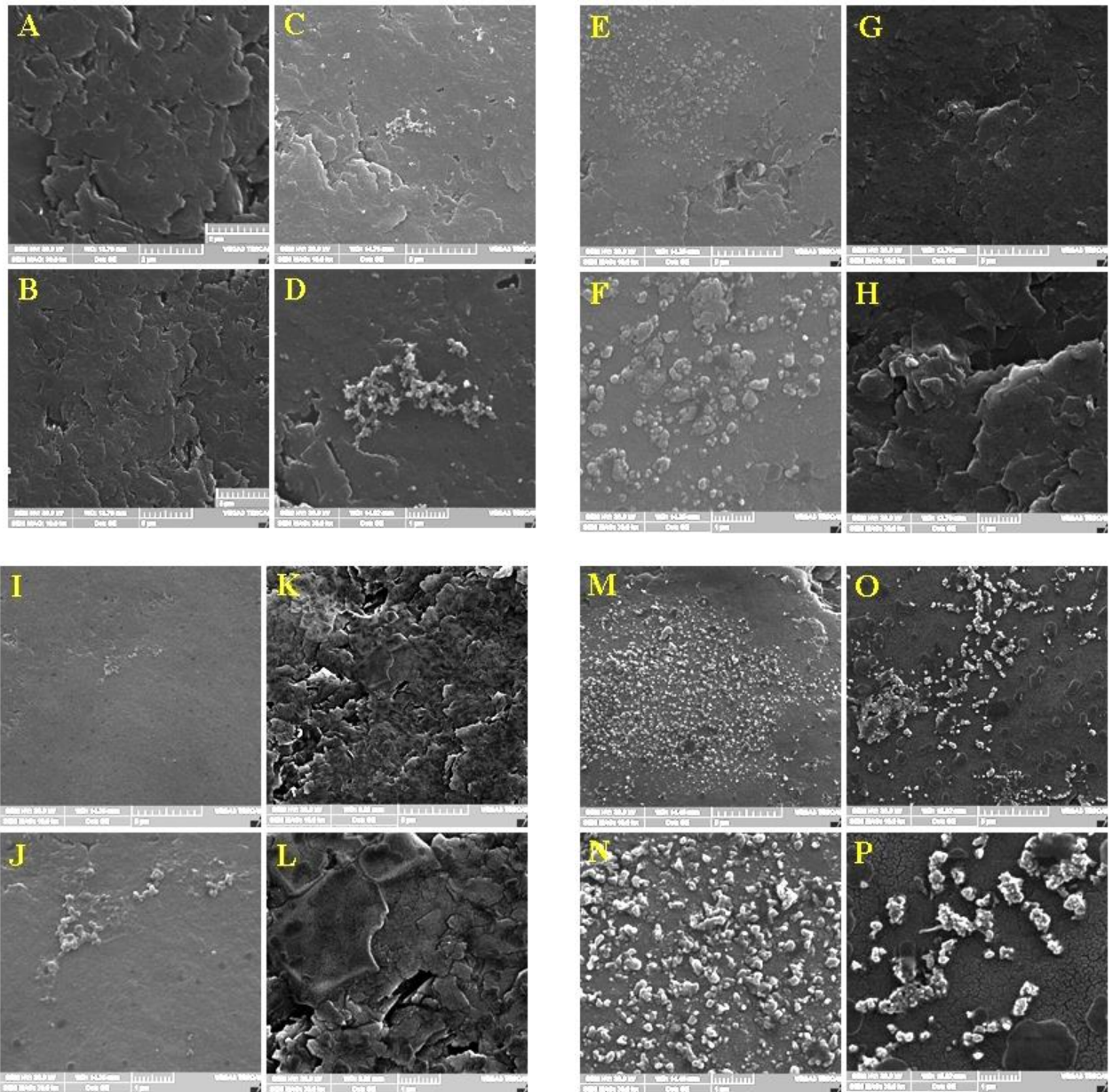
5.3 Análises morfológicas

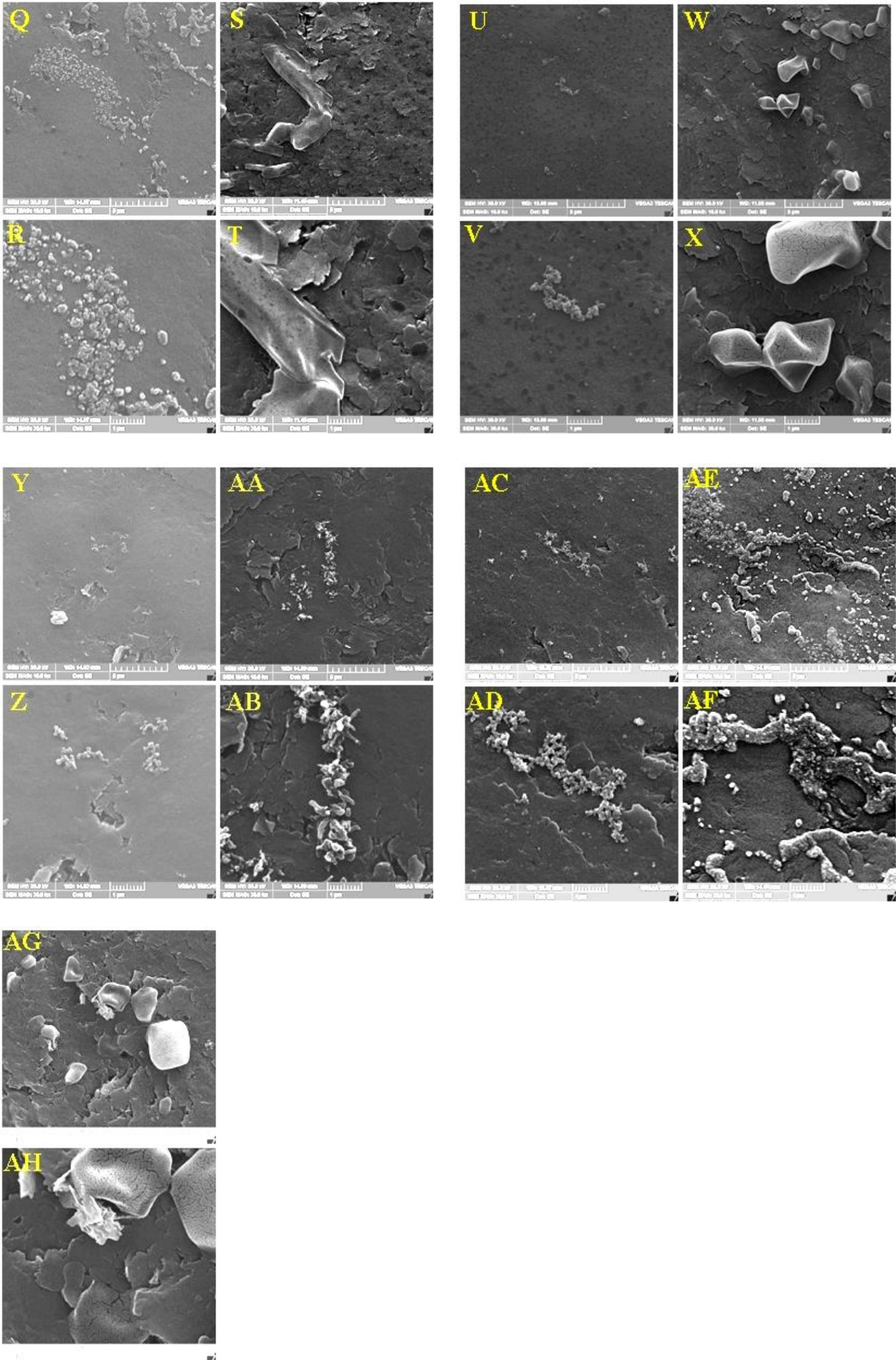
A fim de avaliar a morfologia das plataformas funcionalizadas desenvolvidas, realizou-se análises de MEV nas ampliações de 10.000x e 30.000x e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 15 e na Figura 16.

A Figura 15, apresenta análises de MEV realizadas para as plataformas funcionalizadas resultantes dos homopolímeros e para as bicamadas. Ressalta-se que a grafite se caracteriza como um material poroso, o que a torna uma adequada matriz para fixação de filmes poliméricos.

A Figura 15A e a Figura 15B mostram as imagens obtidas por MEV para o EG, onde observa-se uma superfície muito porosa e homogênea, como previsto para um eletrodo não modificado. Através da análise de MEV (Figura 15), é possível observar que há diferenças morfológicas significativas entre as plataformas funcionalizadas e o EG não modificado, comprovando assim a modificação da superfície dos EG pela adsorção dos polímeros formados.

Figura 15 - Imagens de MEV para homopolímeros e bicamadas em ampliações de 10.000x e 30.000x para: (A e B): EG; (C e D): PANI; (E e F): PANI_sobre_POABA; (G e H): PANI_sobre_POAF; (I e J): PANI_sobre_POHBA; (K e L): POABA; (M e N): POABA_sobre_PANI; (O e P): POABA_sobre_POAF; (Q e R): POABA_sobre_POHBA; (S e T): POAF; (U e V): POAF_sobre_PANI; (W e X): POAF_sobre_POABA; (Y e Z): POAF_sobre_POHBA; (AA e AB): POHBA; (AC e AD): POHBA_sobre_PANI; (AE e AF): POHBA_sobre_POABA; (AG e AH): POHBA_sobre_POAF.



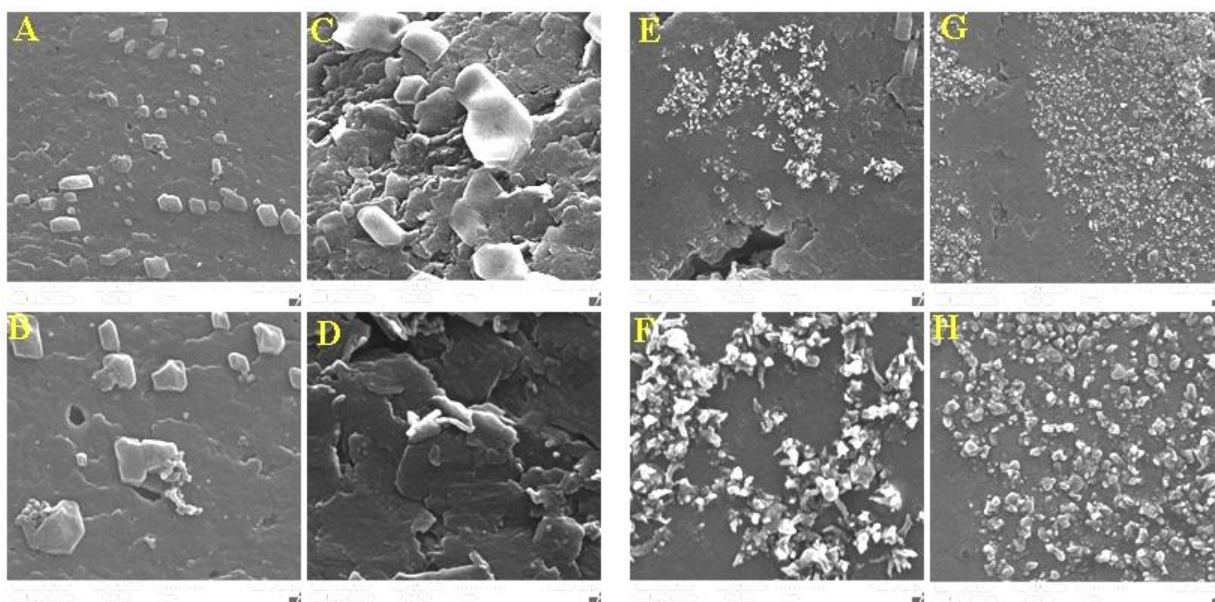


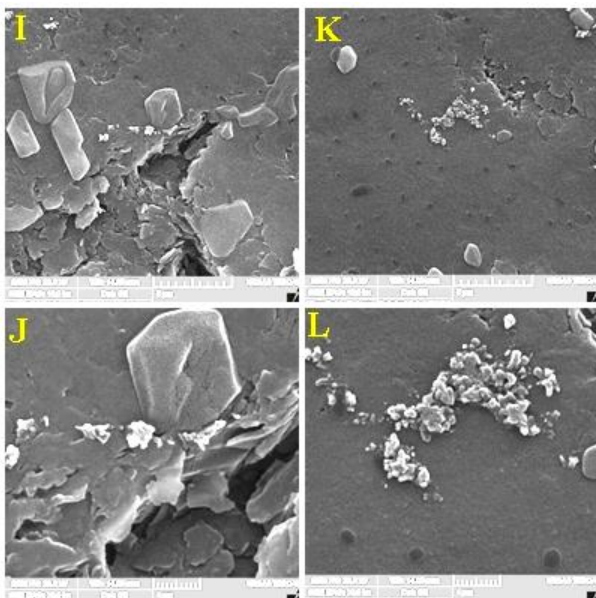
Comparando as imagens apresentadas na Figura 15, observa-se que plataformas derivadas de PANI (Figura 15C e Figura 15D) apresentaram uma morfologia aparentemente “esponjosa enovelada”. Os eletrodos modificados com a POABA (Figura 15K e Figura 15L) apresentaram morfologia definida por placas com formatos irregulares. Os eletrodos derivados do POAF (Figura 15S e Figura 15T) apresentaram morfologia com formato de lamelas irregulares. Por fim, os EG modificados com a POHBA (Figura 15AA e Figura 15AB) apresentaram morfologia constituída de poliedros aciculares bem definidos.

Na Figura 15, observa-se ainda que na formação das bicamadas ocorre sobreposição parcial da primeira camada, tornando evidente a morfologia da segunda camada, como por exemplo, para POAF_sobre_POABA (Figura 15W e Figura 15X), onde é possível visualizar a sobreposição das placas de POABA pelas lamelas de POAF.

Resultados obtidos nas análises de MEV para os copolímeros são apresentados na Figura 16, permitindo inferir que a eletrogeração dos copolímeros PANI_POHBA_cop (Figura 16E e Figura 16F) e POABA_POAF_cop (Figura 16G e Figura 16H) apresentaram uma deposição polimérica superior aos demais copolímeros. Observa-se ainda que, de forma geral, os copolímeros tendem a proporcionar uma morfologia similar à dos homopolímeros geratrizes, como por exemplo, o copolímero PANI_POAF_cop (Figura 16C e Figura 16D) que apresenta estrutura na forma de lamelas irregulares (oriundas de POAF) com inclusões enoveladas características de PANI.

Figura 16 - Imagens de MEV para copolímeros em ampliações de 10.000x e 30.000x para: (A e B): PANI_POABA_cop; (C e D): PANI_POAF_cop; (E e F): PANI_POHBA_cop; (G e H): POABA_POAF_cop; (I e J): POABA_POHBA_cop e (K e L): POAF_POHBA_cop.

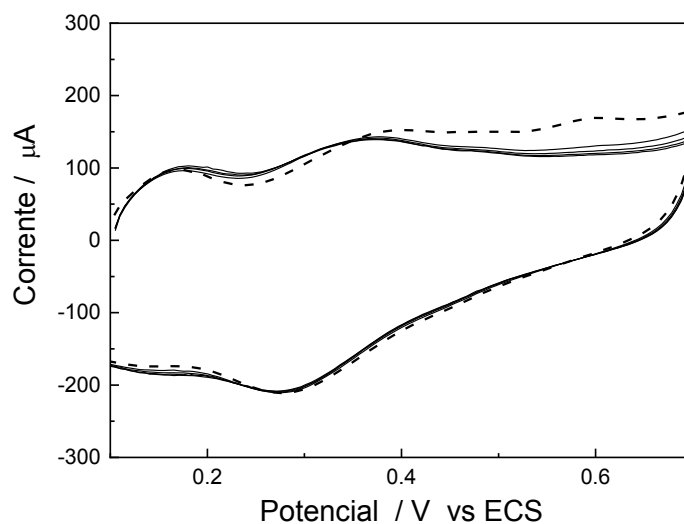




5.4 Comportamento eletroquímico das plataformas funcionalizadas

Após o procedimento de eletropolimerização, todas as plataformas foram submetidas a ciclos de potencial nas mesmas regiões de eletrogeração, em solução somente do eletrólito suporte. Este procedimento objetiva confirmar a presença de respostas eletroativas do material adsorvido e oxidar possíveis monômeros que tenham sido ancorados via adsorção no filme polimérico durante o processo de eletropolimerização, conforme demonstrando na Figura 17.

Figura 17 - VC do POAF/EG após eletropolimerização com 100 ciclos de potencial em solução de HClO₄ 0,50 M. Sendo: (---) 1º ciclo de potencial e (—) os 4 ciclos seguintes. $v = 75$ mV/s.



A Figura 17 mostra cinco ciclos de varredura de potencial obtidos para o POAF/EG somente em solução do eletrólito suporte, após o procedimento de eletropolimerização. Os VCs foram obtidos após o EG contendo o filme de POAF ter sido retirado da solução monomérica, lavado em água com abundância e seco sob fluxo de $N_{2(g)}$. Observa-se que há no primeiro ciclo de potencial uma I_{pa} próximo a +0,6 V que, praticamente desaparece após o segundo ciclo de varredura de potencial, ficando evidente o processo de oxidação referente ao monômero adsorvido, uma vez que este ocorre em valores muito próximos a aquele da oxidação do OAF.

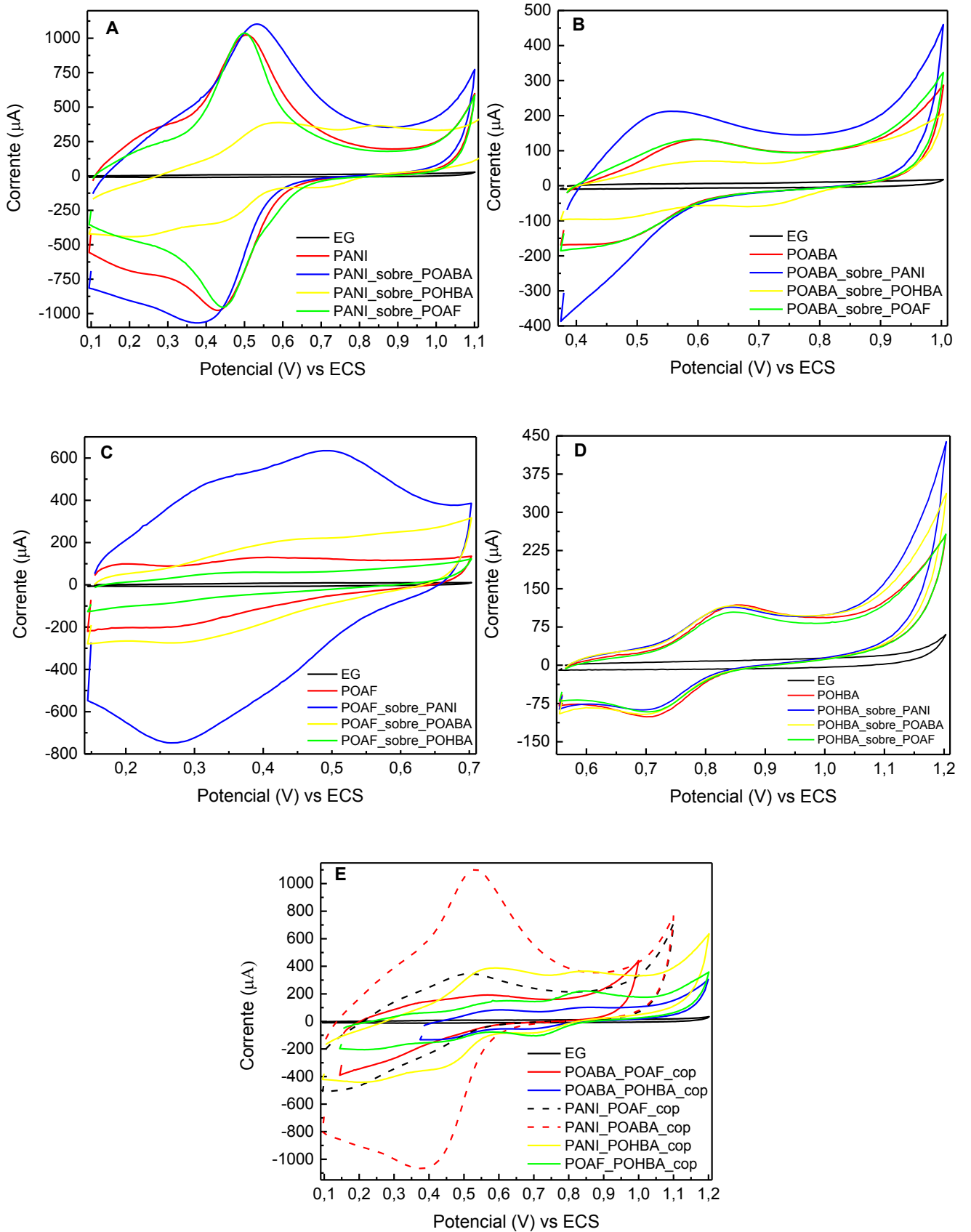
Este monômero residual pode ter sido retido na malha polimérica durante a realização do processo extensivo de eletropolimerização. As intensidades de corrente relacionadas aos processos de atividade eletroquímica do filme se tornam praticamente constantes após a segunda varredura. Este procedimento de integração do monômero residual à estrutura polimérica é um fator importante para se eliminar possíveis interferências de atividades eletroquímicas relacionadas em análises subsequentes. Essa discussão é válida para todas as plataformas embora aqui esteja apresentado o voltamograma cíclico referente apenas a remoção de monômero residual para o POAF.

A Figura 18 apresenta a região de eletroatividade das diferentes plataformas investigadas. Conforme discutido anteriormente, a modificação do eletrodo de grafite é confirmada quando se compara os perfis eletroquímicos do EG e das plataformas funcionalizadas (Figura 18) em solução do eletrólito suporte ($HClO_4$).

Sendo assim, observa-se nitidamente que há modificações na superfície dos eletrodos de grafite após os procedimentos de eletropolimerização, sendo avaliada para os eletrodos modificados, uma eletroatividade do material adsorvido nas respectivas regiões de eletropolimerização sugerindo que o material eletropolimerizado fica adsorvido sobre a superfície do EG.

Analisando-se os resultados apresentados na Figura 18, é possível inferir que para as bicamadas derivadas de PANI (Figura 18A), POABA (Figura 18B), POAF (Figura 18C) as plataformas funcionalizadas PANI_sobre_POABA, POABA_sobre_PANI e POAF_sobre_PANI apresentaram, respectivamente, eletroatividade superior às demais. Para bicamadas derivadas de POHBA (Figura 18D) não se observa diferença significativa de eletroatividade indicando assim, que filmes derivados de POHBA tendem a apresentar elevada resistência à transferência de carga. Na Figura 18E observa-se que houve formação e adsorção de todos os copolímeros sintetizados e que o copolímero PANI_POABA_cop apresentou eletroatividade superior aos demais.

Figura 18 - VC dos EG e EG modificados na forma de homopolímeros, bicamadas e copolimerizações em solução de HClO_4 0,50 M, $\nu = 75 \text{ mV/s}$.



Deduz-se ainda, que há diferenças significativas entre as respostas das bicamadas e dos copolímeros, confirmando que, a copolimerização não é apenas uma sobreposição de homopolímeros como ocorre nas bicamadas.

5.5 Propriedades de transferência de carga das plataformas funcionalizadas

A adsorção de substâncias eletroativas na superfície de um eletrodo provoca alterações nas propriedades de transferência eletrônica do sistema. Os complexos ferrocianeto/ferricianeto de potássio e cloreto de hexaaminorutênio II/III tem sido utilizados como sondas redox para investigar estas alterações, através do processo de transferência eletrônica de eletrodos dessas sondas sobre as diferentes plataformas.

Sendo assim, as propriedades de transferência eletrônica sobre as plataformas funcionalizadas foram investigadas utilizando a sonda aniônica ferrocianeto/ferricianeto de potássio e a sonda catiônica cloreto de hexaaminorutênio II/III. Possíveis interações eletrostáticas existentes entre as sondas redox e o polímero são capazes de sugerir informações acerca das propriedades elétricas dos polímeros formados.

Conforme já discutido e apresentado na Figura 7A, o eletrodo de grafite apresenta $\Delta E_p = 116$ mV para o par redox ferro/ferricianeto de potássio e $\Delta E_p = 105$ mV para cloreto de hexaaminorutênio II/III. Em contraste, para o eletrodo de grafite contendo filmes poliméricos é observado variações no ΔE_p e nos valores de $I_{p,a}$ e $I_{p,c}$, indicando que o perfil voltamétrico do par redox é afetado pela presença dos filmes poliméricos adsorvido na superfície do eletrodo.

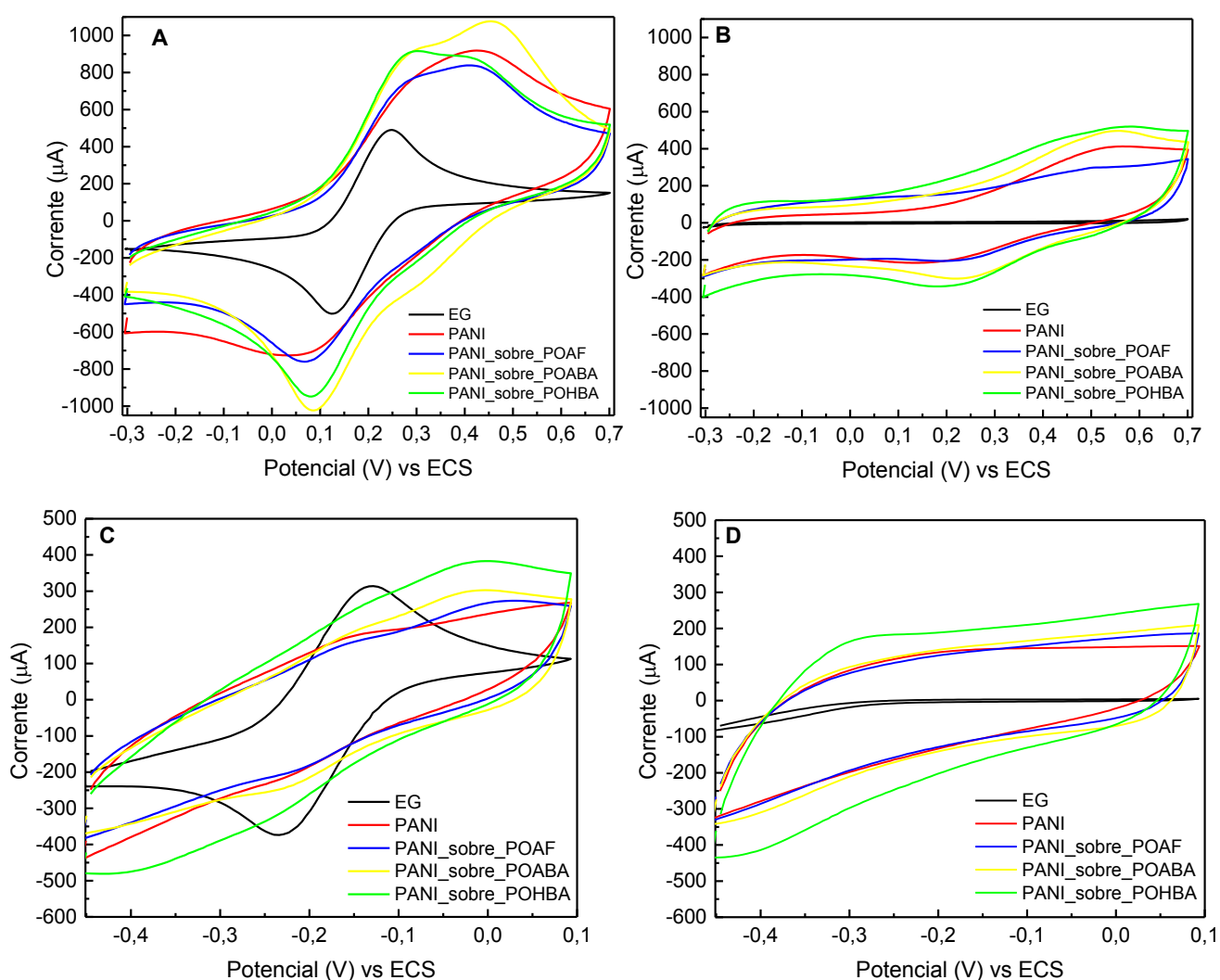
Estas variações na corrente faradáica dos pares redox, podem indicar o caráter de carga (aniônico ou catiônico) do material adsorvido na superfície do eletrodo, ou seja, para materiais com caráter aniônico espera-se obter uma redução na corrente faradáica do par redox ferro/ferricianeto de potássio enquanto um aumento da corrente faradáica deve ser observado para o par redox cloreto de hexaaminorutênio II/III, devido repulsão e atração eletrostática, respectivamente, da sonda redox pelo filme polimérico, enquanto para materiais com caráter catiônico espera-se o oposto.

Para garantir que este efeito observado esteja relacionado somente aos pares redox ferrocianeto/ferricianeto de potássio e cloreto de hexaaminorutênio II/III, VCs foram obtidos somente em solução do eletrólito suporte (KCl 0,1 M), uma vez que já fora observado eletroatividade dos materiais depositados (Figura 18) em região de potencial próximo àquela das sondas redox. Assim, para determinação da corrente faradáica puramente relativa aos

pares redox subtraiu-se a contribuição da corrente determinada em solução apenas do eletrólito suporte e essa diferença foi denominada de ΔI_{pico} .

Na Figura 19, são apresentados os voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento eletroquímico dos eletrodos nas sondas redox catiônica e aniônica para as plataformas do tipo homopolímeros e bicamadas derivadas da PANI.

Figura 19 - VCs do EG e PANI/EG na forma de homopolímeros e bicamadas em solução de: (A) ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mM contendo KCl 0,1 M, (B) e (D) KCl 0,1 M e (C) cloreto de hexaaminorutênio II/III 5,0 mM em KCl 0,1 M.

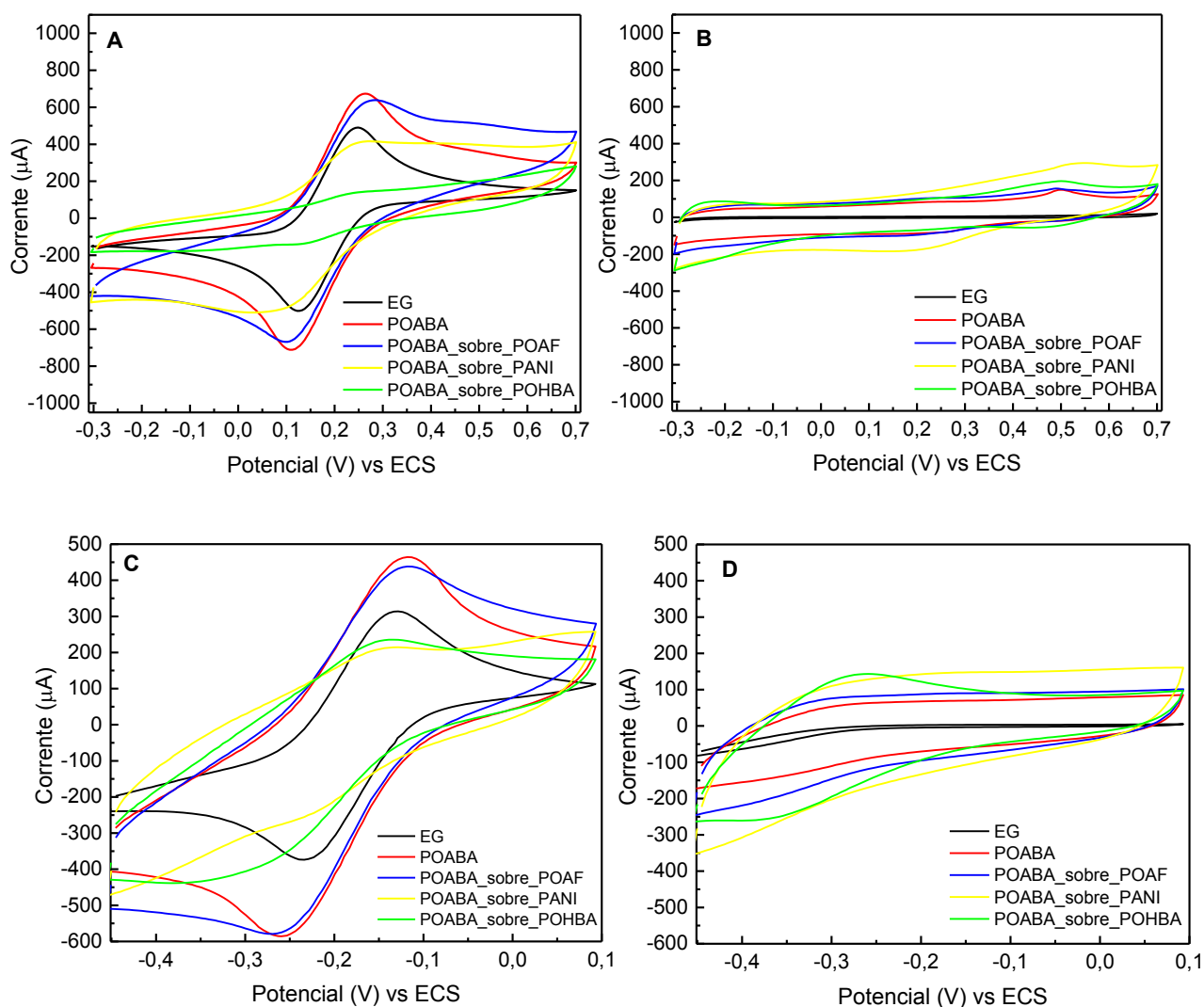


Observa-se que houve aumento da corrente faradáica do par redox ferro/ferricianeto de potássio (Figura 19A) para as plataformas funcionalizadas quando comparadas ao EG, enquanto para a corrente faradáica da sonda redox cloreto de

hexaaminorutênio II/III (Figura 19C) houve uma redução; indicando que tais plataformas apresentam carregamento majoritariamente catiônico. Destaca-se que dentre tais plataformas, a bicamada PANI_sobre_POABA apresentou caráter catiônico superior as demais. Observa-se ainda deslocamentos dos picos de oxidação e redução da espécie eletroativa.

Na Figura 20, observa-se os voltamogramas referentes ao comportamento eletroquímico em sondas redox catiônica e aniônica para as plataformas do tipo homopolímero e bicamadas derivadas da POABA.

Figura 20 - VCs do EG e POABA/EG na forma de homopolímeros e bicamadas em solução de: (A): Ferro/Ferricianeto de potássio 5,0 mM em KCl 0,1 M, (B) e (D) KCl 0,1 M e (C) cloreto de hexaaminorutênio II/III 5,0 mM em KCl 0,1 M.

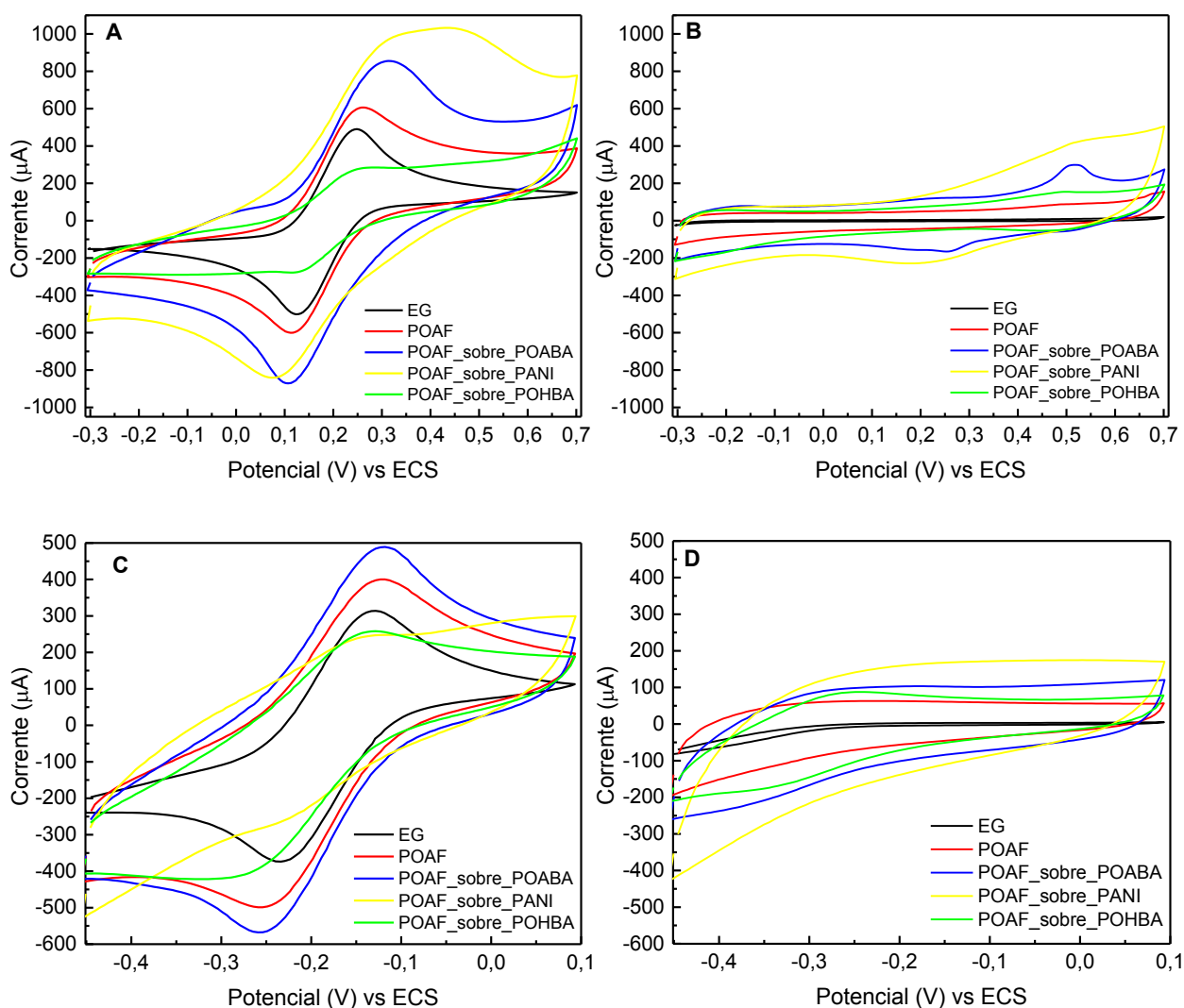


Observa-se que para as plataformas POABA e POABA_sobre_POAF houve aumento da corrente faradáica de ambos os pares redox (ferro/ferricianeto de potássio (Figura

20A) e cloreto de hexaaminorutênio II/III (Figura 20C), quando comparados ao EG, indicando que tais polímeros se comportam como bons condutores e ainda, que o efeito de dopagem em ambos propicia atração eletrostática tanto com espécies catiônicas quanto aniônicas. Observa-se que a plataforma POABA_sobre_POHBA apresentou na presença da sonda redox cloreto de hexaaminorutênio II/III valores de corrente faradáica superiores aos apresentados na presença da sonda redox ferro/ferricianeto de potássio, indicando que a primeira camada de POHBA tende a apresentar caráter majoritariamente aniônico.

Na Figura 21, são apresentados os voltamogramas referentes ao comportamento eletroquímico em sondas redox catiônica e aniônica para as plataformas do tipo homopolímero e bicamadas derivadas de POAF.

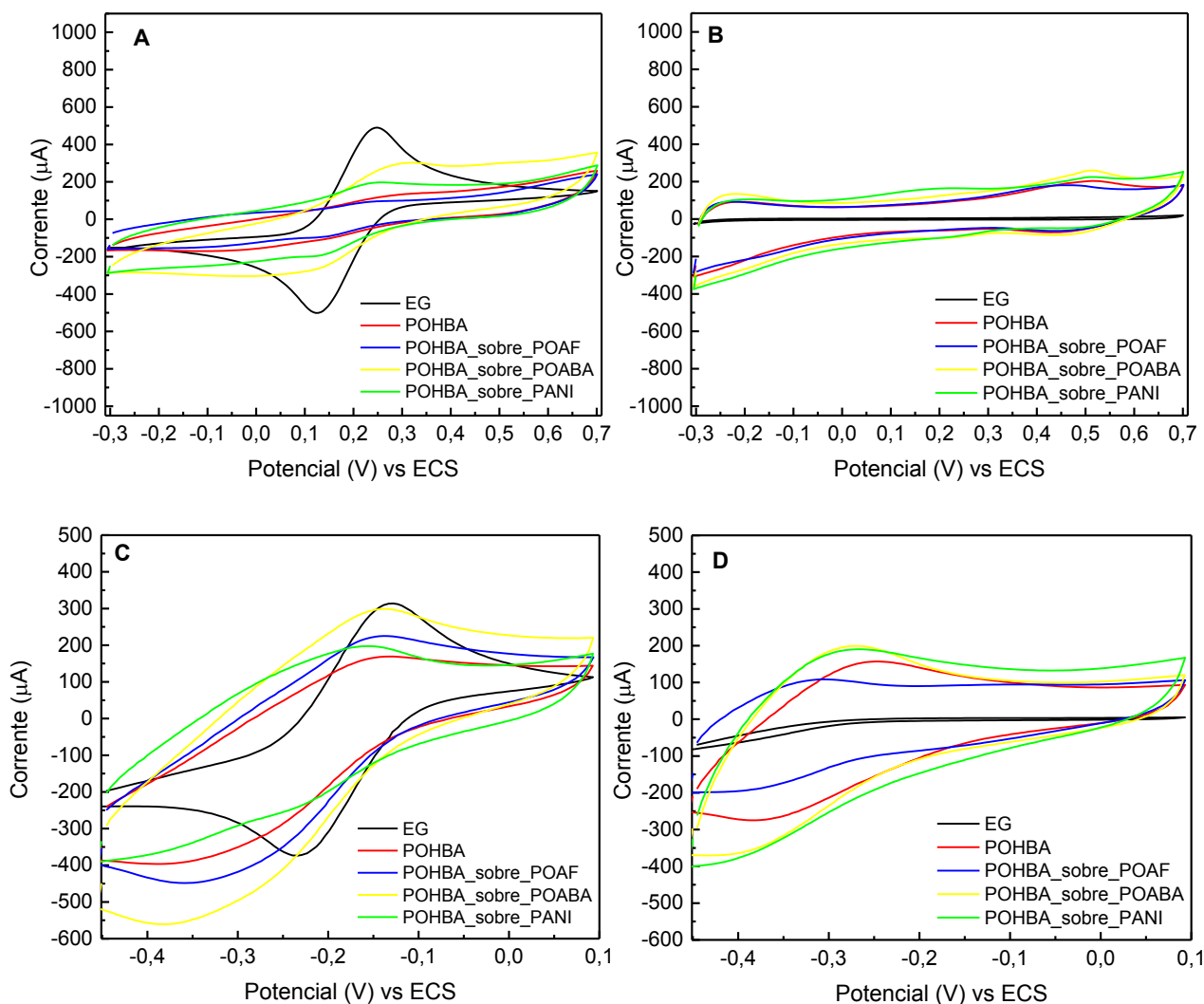
Figura 21 - VCs do EG e POAF/EG na forma de homopolímeros e bicamadas em solução de: (A): Ferro/Ferricianeto de potássio 5,0 mM em KCl 0,1 M, (B) e (D) KCl 0,1 M e (C) cloreto de hexaaminorutênio II/III 5,0 mM em KCl 0,1 M.



Observa-se que as plataformas POAF e POAF_sobre_POABA (Figura 21) apresentaram caráter similar ao discutido para POABA e POABA_sobre_POAFA (Figura 20), onde houve aumento da corrente faradáica de ambos os pares redox (ferro/ferricianeto de potássio (Figura 21A) e cloreto de hexaaminorutênio II/III (Figura 21C), quando comparados ao EG, indicando que tais polímeros se comportam como bons condutores e ainda, que o efeito de dopagem em ambos propicia atração eletrostática tanto com espécies catiônicas quanto aniônicas. Observa-se que a plataforma POAF_sobre_PANI na presença da sonda redox ferro/ferricianeto de potássio apresentou valores de corrente faradáica superiores aos apresentados na presença da sonda redox cloreto de hexaaminorutênio II/III, indicando que ela apresentou carregamento majoritariamente catiônico, e ainda, superior às demais.

Na Figura 22, nota-se os voltamogramas referentes ao comportamento eletroquímico em sondas redox catiônica e aniônica para as plataformas do tipo homopolímero e bicamadas derivadas de POHBA.

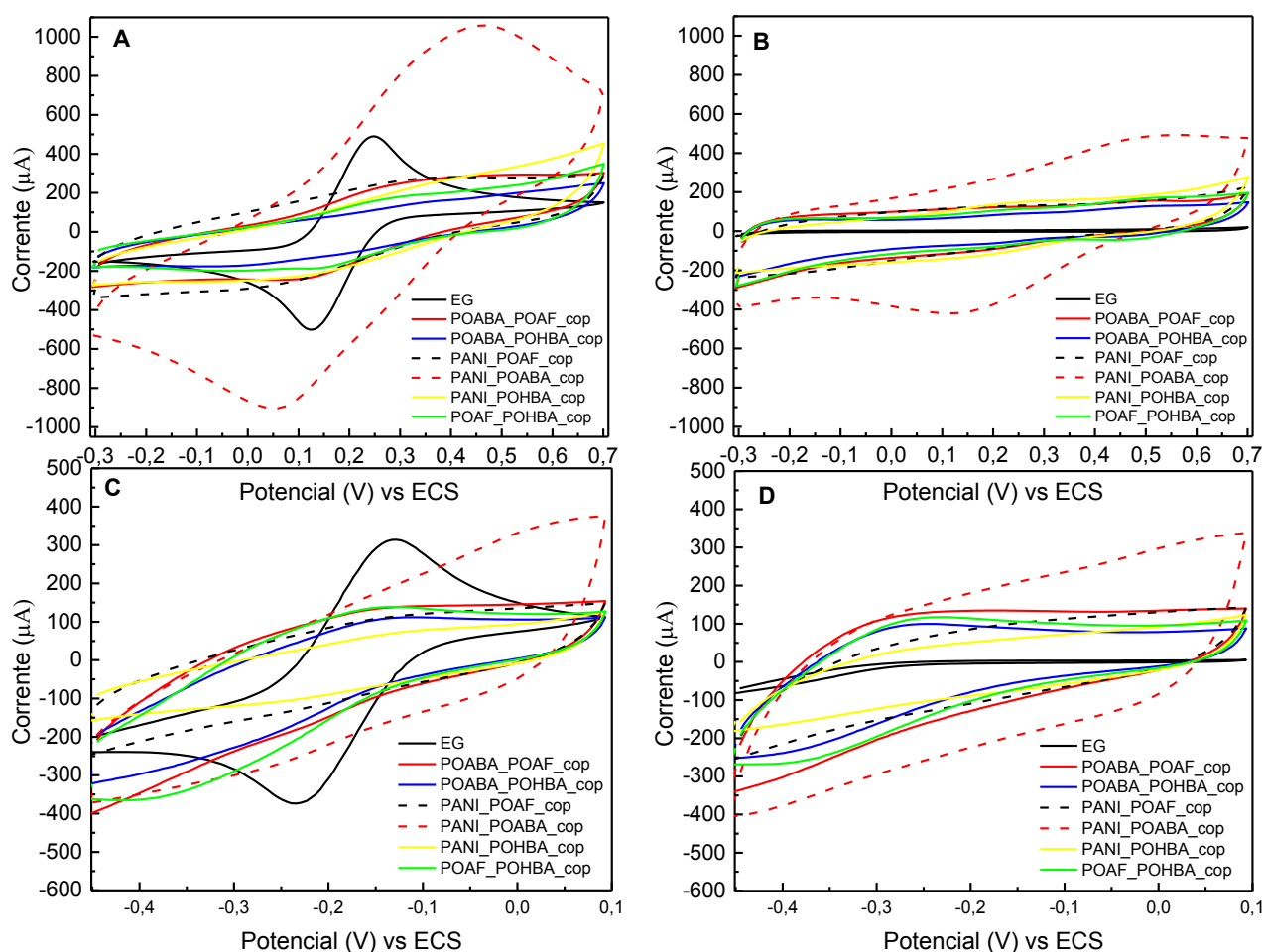
Figura 22 - VCs do EG e POHBA/EG na forma de homopolímeros e bicamadas em solução de: (A): Ferro/Ferricianeto de potássio 5,0 mM em KCl 0,1 M, (B) e (D) KCl 0,1 M e (C) cloreto de hexaaminorutênio II/III 5,0 mM em KCl 0,1 M.



Observa-se que tais plataformas tenderam a apresentar carregamento majoritariamente catiônico, porém é evidente que os filmes poliméricos derivados de POHBA apresentam elevada resistência à transferência de carga uma vez que há redução da corrente faradáica de ambos os pares redox (ferro/ferricianeto de potássio (Figura 22A) e cloreto de hexaaminorutênio II/III (Figura 22C).

O comportamento eletroquímico apresentado pelos copolímeros na presença das sondas redox catiônica e aniônica está apresentado na Figura 23.

Figura 23 - VCs do EG e EG modificados na forma de copolímeros em solução de: (A): ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mM em KCl 0,1 M; KCl 0,1 M: (B) e (D); (C): cloreto de hexaaminorutênio II/III 5,0 mM em KCl 0,1 M.



Observa-se que, analogamente ao discutido para as plataformas derivadas de POHBA (Figura 22), o comportamento eletroquímico dos copolímeros (Figura 23) na presença das sondas redox aniônica e catiônica tenderam a suprimir a corrente faradáica de ambos pares redox, indicando que eles apresentam elevada resistência à transferência de

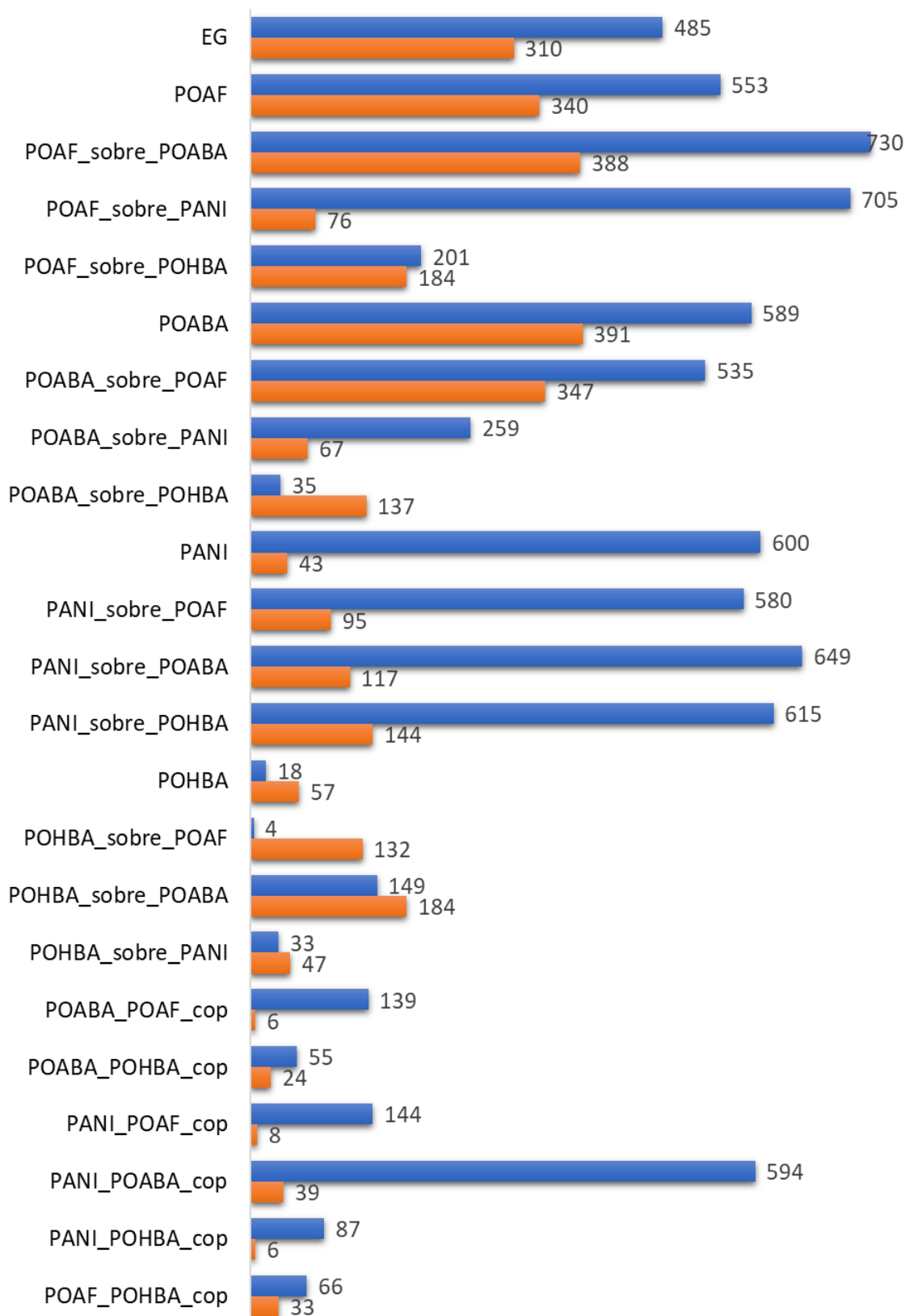
carga; excetuando-se o copolímero PANI_POABA_cop, que apresentou caráter majoritariamente catiônico evidenciado pelo aumento da corrente faradáica do par redox ferro/ferricianeto de potássio (Figura 23A) quando comparadas ao EG, enquanto para a corrente faradáica da sonda redox cloreto de hexaaminorutênio II/III (Figura 21C) houve uma redução.

Variações na corrente faradáica dos pares redox, podem indicar o caráter de carga (aniônico ou catiônico) do material adsorvido na superfície do eletrodo. Assim, como objetivo de avaliar qualitativamente as características de carga das plataformas, propôs-se inicialmente em avaliar a ΔI_p que determina a corrente faradáica puramente relativa aos pares redox através da subtração entre a corrente total (sonda redox em eletrólito suporte) e a corrente determinada em solução contendo apenas do eletrólito suporte (KCl 0,1 M). Os resultados obtidos para ΔI_p das plataformas funcionalizadas desenvolvidas neste trabalho estão apresentados na Figura 24.

Nesse contexto, analisando os resultados apresentados na Figura 24 observa-se que as seguintes plataformas se destacaram por apresentaram caráter majoritariamente catiônico, em ordem decrescente: POAF_sobre_POABA; POAF_sobre_PANI; PANI_sobre_POABA; PANI_sobre_POHBA; PANI; PANI_POABA_cop e POABA. Contudo, se tal hipótese fosse aplicada para caracterização daquelas plataformas com caráter majoritariamente aniônico obteríamos as seguintes plataformas, em ordem decrescente: POABA; POAF_sobre_POABA; POABA_sobre_POAF, POAF. Além disso, de forma geral podemos observar que o POHBA, homopolímero ou suas variações, tende a produzir plataformas com baixos valores de ΔI_p tanto para a sonda catiônica quanto para a aniônica.

Por fim, após realizar as análises das plataformas em ambas as sondas redox, podemos notar que a avaliação do caráter da carga (aniônico ou catiônico) superficial do material adsorvido não poder ser obtido, exclusivamente, pela avaliação do comportamento eletroquímico de transferência de carga das sondas redox, uma vez que, por exemplo, o POAF_sobre_POABA apresentou os melhores resultados tanto para a sonda catiônica quanto para a aniônica. Isso leva a crer que apesar do comportamento eletroquímico da sonda redox sobre a superfície do eletrodo modificado ser um indicativo do caráter catiônico ou aniônico desta, temos que considerar também a condutividade dos materiais eletrodepositados. Neste caso, é amplamente descrito na literatura que o poli(o-aminofenol) é um polímero condutor, contribuindo de forma mais significativa para o transporte de carga das espécies na superfície do eletrodo modificado do que a funcionalização da superfície.

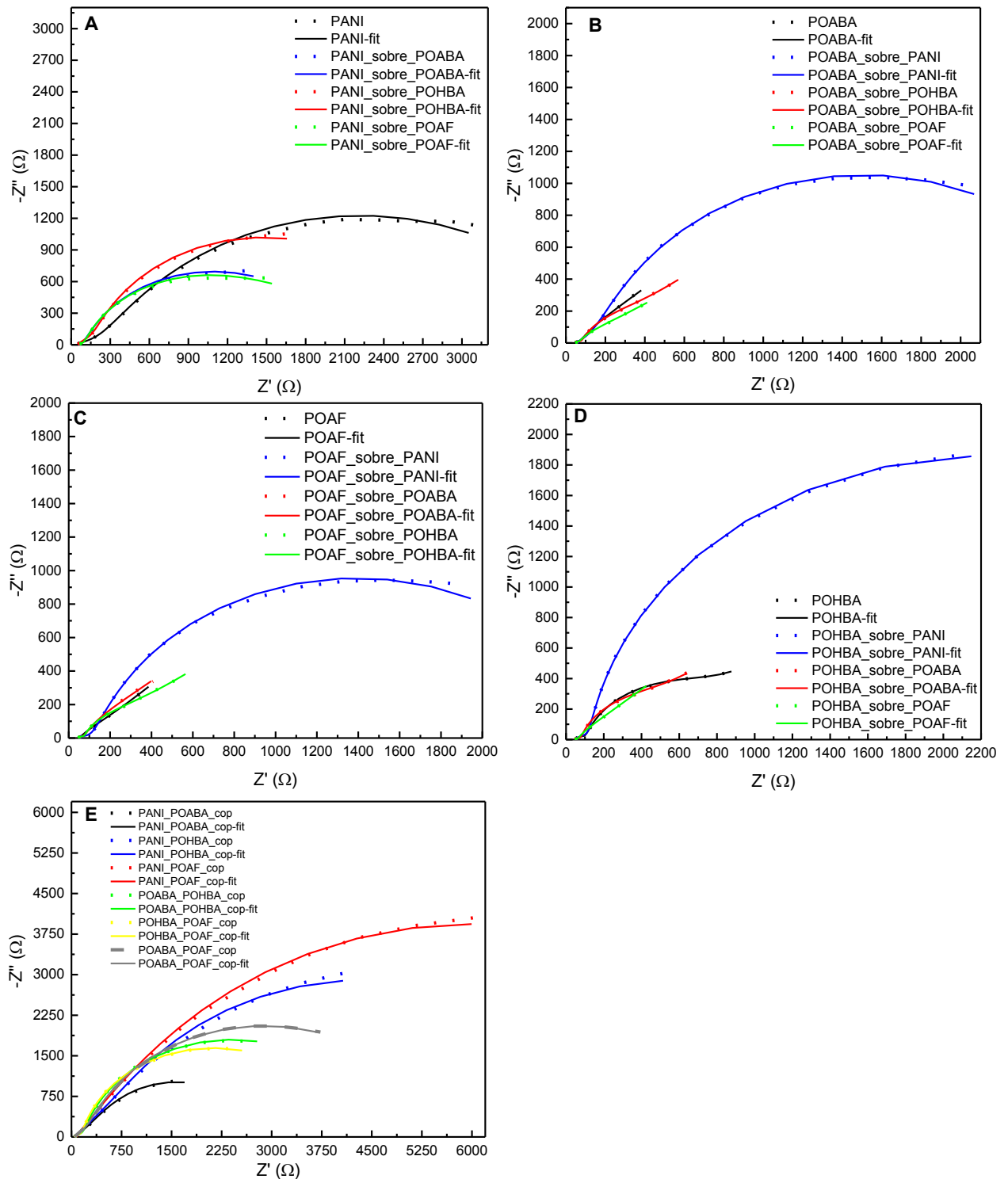
Figura 24 – Gráfico dos valores obtidos para a ΔI_p das plataformas funcionalizadas na presença da sonda redox: (—) ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mM em KCl 0,1 M e (—) cloreto de hexaaminorutênio II/III 5,0 mM em KCl 0,1 M.



5.6 Propriedades elétricas das plataformas funcionalizadas

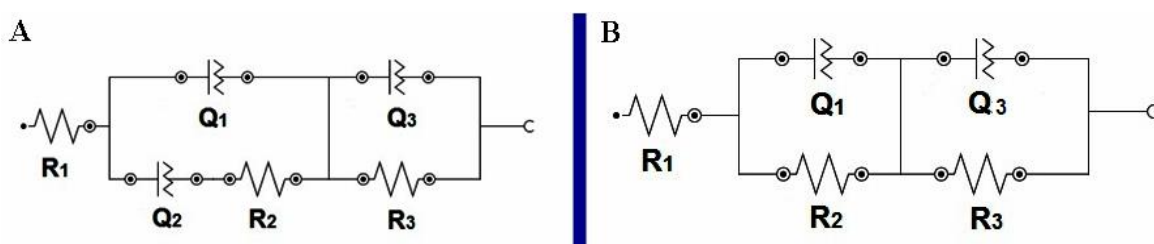
A Figura 25 exibe os diagramas Nyquist obtidos nas análises de EIE para os filmes poliméricos em solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mM contendo KCl 0,1 M.

Figura 25 - Diagramas de Nyquist obtidos nas análises de EIE para as plataformas funcionalizadas em solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mM contendo KCl 0,1 M. As linhas sólidas representam o ajuste dos dados experimentais ao circuito equivalente. Eap = OCP. Amplitude: 10 mV. Frequência: 100 kHz a 10 mHz.



Para simulação dos dados experimentais, foi sugerido os circuitos equivalentes apresentados na Figura 26, baseado em circuitos equivalentes para polímeros condutores descritos na literatura por ATES (2011). O circuito (A) (Figura 26-A) consiste em um elemento (R1) representando a resistência não compensada da solução, seguido por dois arranjos paralelos R-Q. O primeiro é composto por um elemento de fase constante (Q1) representando a pseudocapacitância da dupla camada elétrica, em paralelo com um elemento de fase constante (Q2) que representa a impedância de Warburg (Z_w) atribuída a difusão semi-infinita das espécies carregadas, estando em série com uma resistência (R2) que representa a resistência a transferência de carga (R_{ct}). Na segunda parte, um elemento de fase constante (Q3) representa a pseudocapacitância do filme e está em paralelo com a resistência do filme (R3).

Figura 26 - Circuitos equivalentes propostos para simulação das análises de EIE.



O circuito (B) (Figura 26-B) consiste em um elemento (R1) representando a resistência não compensada da solução (R_s), seguido por dois arranjos paralelos R-Q. O primeiro é composto por um elemento de fase constante (Q1) representando a pseudocapacitância da dupla camada elétrica, em paralelo com uma resistência (R2) que representa a resistência a transferência de carga (R_{tc}). Na segunda parte, um elemento de fase constante (Q3) representa a pseudocapacitância do filme e está em paralelo com a resistência do filme (R3).

A necessidade do uso de dois componentes para simulação dos resultados obtidos nas análises de EIE das plataformas funcionalizadas, indica a formação de um filme polimérico rugoso/poroso formado por alternadas cadeias longas e curtas, de comprimento variável (modelo de escova) (LÁNG, UJVÁRI, INZELT, 2001).

A Tabela 3 e a Figura 27 apresentam os parâmetros obtidos na simulação dos resultados obtidos nas análises de EIE para as plataformas funcionalizadas, onde observa-se

que os resultados estão coerentes com a discussão feita para as análises de caracterização eletroquímica por voltametria cíclica.

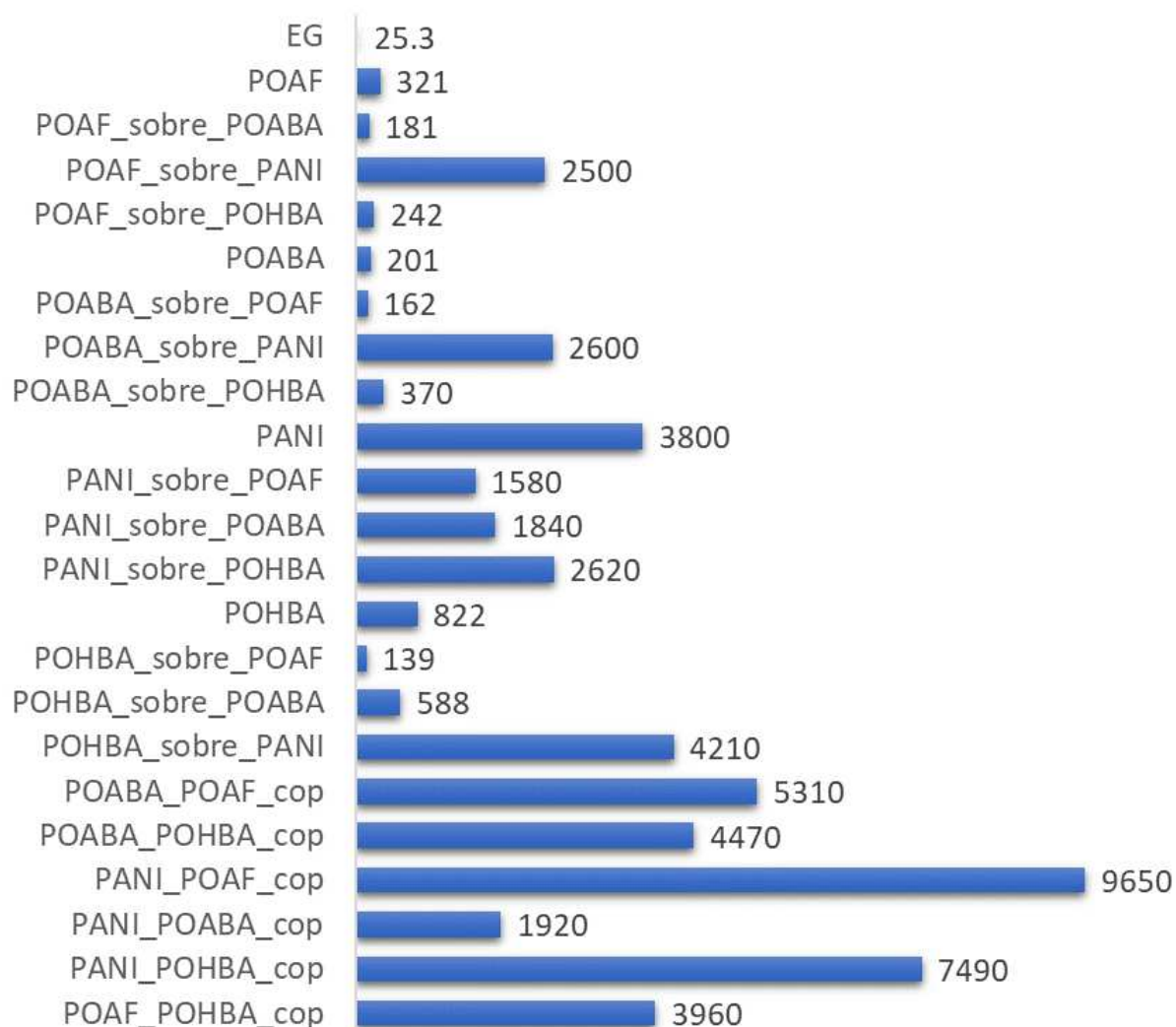
Tabela 3 - Parâmetros obtidos nas simulações dos dados de EIE para as plataformas funcionalizadas.

Plataforma / Parâmetro	R₁	R₂	R₃	Q₁	n₁	Q₂	n₂	Q₃	n₃
POAF	41	321	13	6340	0,61	5876	0,48	2741	0,37
POAF_sobre_POABA	44	181	56	9991	0,89	7308	0,46	6363	0,37
POAF_sobre_PANI	38	2497	128	2166	0,83	—	—	2681	0,27
POAF_sobre_POHBA	43	242	33	3795	0,85	6537	0,45	899	0,57
POABA_POAF_cop	44	5307	205	1286	0,84	—	—	939	0,62
POABA	44	201	55	10162	0,83	6817	0,46	7480	0,37
POABA_POHBA_cop	46	4470	131	1981	0,86	—	—	686	0,61
POABA_sobre_POAF	46	162	32	5288	0,74	7530	0,41	3598	0,44
POABA_sobre_PANI	51	2602	199	2348	0,85	—	—	3094	0,42
POABA_sobre_POHBA	47	370	35	4557	0,82	7955	0,51	971	0,59
PANI_POAF_cop	59	9646	1793	1028	0,81	—	—	1231	0,55
PANI_POABA_cop	55	1918	914	5971	0,91	—	—	2506	0,51
PANI	31	3799	375	995	0,72	—	—	1173	0,29
PANI_POHBA_cop	53	7489	703	1478	0,82	—	—	1135	0,59
PANI_sobre_POAF	45	1576	67	1883	0,81	9020	0,37	1838	0,36
PANI_sobre_POABA	52	1843	63	2838	0,79	21146	0,27	3352	0,43
PANI_sobre_POHBA	50	2618	128	3302	0,84	—	—	1752	0,59
POHBA_POAF_cop	44	3959	110	2243	0,88	—	—	671	0,65
POHBA	47	822	61	3410	0,86	15465	0,61	701	0,63
POHBA_sobre_POAF	44	139	24	5576	0,78	6104	0,46	3469	0,41
POHBA_sobre_POABA	45	588	38	5267	0,87	12105	0,59	1575	0,53
POHBA_SOBRE_PANI	51	4211	73	3166	0,92	—	—	1178	0,61

R₁, R₂ e R₃ = Ω

Q₁, Q₂ e Q₃ = (Y₀) [$\mu\text{Mho} \cdot (\text{s}^n)$].

Figura 27 – Gráfico dos valores de resistência a transferência de carga (R_{tc}) obtidos nas simulações dos dados de EIE para as plataformas funcionalizadas. Unidade: [Ω].



Os circuitos simulados apresentaram valores de chi-quadrado aceitáveis (χ^2), na ordem de 10^{-3} a 10^{-2} (Figura 27), mostrando que os circuitos propostos apresentam um bom ajuste dos dados experimentais e ainda proporcionam boa correlação estatística na simulação das análises de EIE realizadas.

Analisando os resultados apresentados na Figura 27, observa-se que as plataformas funcionalizadas obtidas por copolimerização, no geral, apresentaram elevados valores de R_{tc} , exceto a plataforma PANI_POABA_cop que apresentou menor valor de R_{tc} dos copolímeros enquanto PANI_POAF_cop apresentou um maior valor de R_{tc} entre os copolímeros. Estes resultados corroboram e confirmam a discussão feita para a análise do comportamento eletroquímico via VC dos copolímeros na presença das sondas redox (Figura 23).

Plataformas em bicamadas derivadas de POAF e POABA e os respectivos homopolímeros apresentaram baixos valores de R_{tc} , exceto as plataformas POAF_sobre_PANI e POABA_sobre_PANI. Para plataformas em bicamadas derivadas de PANI e seu respectivo homopolímero apresentaram elevados valores de R_{tc} , com destaque para a plataforma PANI que dentre estas apresentou valor de R_{tc} superior as demais.

Plataformas derivadas de POHBA apresentaram valores de R_{tc} superiores aos apresentados para plataformas derivadas de POABA e POAF. Destaca-se que a plataforma POHBA_sobre_PANI apresentou um valor de R_{tc} superior as demais bicamadas derivadas de POHBA enquanto POHBA_sobre_POAF apresentou os menores valores de R_{tc} .

Assim, observa-se que os resultados obtidos por EIE comprovam as observações feitas nas análises de voltametria cíclica para as plataformas funcionalizadas na presença das sondas redox.

5.7 Estudos dos antígenos recombinantes

No desenvolvimento do imunossensor proposto neste trabalho, adotou-se a hipótese apresentada por UMEZAWA e colaboradores, (1999) (seção 3.4.1), e utilizou-se uma mistura antigênica composta pelos antígenos JL7, 1F8 e B13 em proporções iguais (1:1:1) a fim de minimizar variações e alcançar elevada sensibilidade.

Para conhecer melhor o caráter de carga, massa molar e ponto isoelétrico teórico dos antígenos utilizados, estudos de homologia de sequência foram realizados utilizando-se banco de dados de peptídeos e os resultados seguem apresentados na Tabela 4.

Tabela 1 - Propriedades dos antígenos 1F8, B13 e JL7.

	1F8	B13	JL7
Aminoácidos	211	214	249
Massa molar (g/mol)	23707,72	20317,41	28806,40
Ponto isoelétrico teórico	4,93	5,35	4,97
Carga líquida	-9	-1	-11

Os resultados apresentados na Tabela 4 mostram que os antígenos 1F8 e JL7 apresentam caráter majoritariamente aniônico, quando comparados ao antígeno B13, sendo

que, isto se deve às elevadas frações de glutamato presentes nos antígenos 1F8 e JL7 quando comparada ao antígeno B13, conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 2 - Composição relativa dos antígenos recombinantes 1F8, B13 e JL7.

Aminoácido	1F8		B13		JL7	
	FA	FR	FA	FR	FA	FR
Alanina (ala)	22	10,4	52	24,3	34	13,7
Arginina (arg)	12	5,7	0	0,0	31	12,4
Asparagina (asn)	6	2,8	0	0,0	8	3,2
Ácido aspártico (asp)	22	10,4	16	7,5	23	9,2
Cisteína (cys)	4	1,9	0	0,0	0	0,0
Glutamina (gln)	2	0,9	17	7,9	14	5,6
Ácido glutâmico (glu)	22	10,4	2	0,9	37	14,9
Glicina (gly)	14	6,6	37	17,3	5	2,0
Histidina (his)	1	0,5	0	0,0	0	0,0
Isoleucina (ile)	6	2,8	3	1,4	4	1,6
Leucina (leu)	18	8,5	3	1,4	31	12,4
Lisina (lys)	23	10,9	17	7,9	18	7,2
Metionina (met)	4	1,9	0	0,0	7	2,8
Fenilamina (phe)	13	6,2	17	7,9	8	3,2
Prolina (pro)	6	2,8	40	18,7	14	5,6
Serina (ser)	11	5,2	9	4,2	8	3,2
Treonina (thr)	8	3,8	0	0,0	0	0,0
Triptofano (trp)	3	1,4	1	0,5	0	0,0
Tirosina (tyr)	3	1,4	0	0,0	0	0,0
Valina (val)	11	5,2	0	0,0	7	2,8
Pirrolisina (pyl)	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Selenocisteína (sec)	0	0,0	0	0,0	0	0,0

FA = Frequência Absoluta

FR (%) = Frequência Relativa

A fim de maximizar o efeito de carga nos antígenos, o uso de solução tampão aniônica, como é o caso do tampão fosfato, tende a maximizar o carregamento aniônico nos antígenos por meio de reação ácido base em pH 7,4 e devido às interações eletrostáticas das

cadeias laterais dos aminoácidos, aumentando a susceptibilidade da imobilização de tais antígenos em plataformas funcionalizadas catiônicas, pois, desta forma a imobilização via adsorção física será favorecida devido a contribuição de interações eletrostáticas entre os antígenos recombinantes e a plataforma funcionalizada.

Cabe destacar ainda que, não apenas o caráter aniônico ou catiônico da plataforma pode influenciar na efetiva imobilização do componente biológico (antígeno), mas também a estrutura tridimensional do polímero, como também a presença dos grupos funcionais presentes na superfície do eletrodo que são preservados após procedimento de eletropolimerização, conforme demonstrado por Santos et al. (2019).

5.8 Estudos iniciais do desenvolvimento do imunossensor

As plataformas funcionalizadas foram empregadas para estudos iniciais do desenvolvimento de um imunossensor para detecção de anticorpos específicos da doença de Chagas presentes em amostras clínicas. A imobilização da mistura antigênica contendo os antígeno JL7, 1F8 e B13 (70 μ L, 50 ng/ml, 30 minutos, 25 °C) foi conduzida via adsorção física com posterior interação do antígeno (Ag) com os soros positivo (Ab^+) e negativo (Ab^-) (contra prova) em diluição de 1/320 (70 μ L, 30 minutos de imunorreação, 37 °C). Para monitoramento dos eventos de imobilização do antígeno e da imunorreação utilizou-se a técnica de EIE.

Os resultados obtidos no monitoramento da imobilização do Ag, bem como da imunorreação foram simulados utilizando-se os circuitos propostos apresentados anteriormente na Figura 26. Na Tabela 6 segue apresentado os resultados de resistência à transferência de carga obtidos no desenvolvimento dos imunossensores.

Tabela 3 - Resultados obtidos na simulação das análises de EIE para detecção da doença de Chagas. Unidade: R_{tc} em [Ω].

Plataforma	Ag	Ag/Ab⁻	Ag/Ab⁺	$\Delta(\text{Ag/Ab}^-)\text{-Ag}$	$\Delta(\text{Ag/Ab}^+)\text{-Ag}$
PANI	7,530	10,800	12,400	3,270	4,870
PANI_sobre_POABA	4,740	5,730	5,890	0,990	1,150
PANI_sobre_POAF	3,630	4,340	4,650	0,710	1,020
PANI_sobre_POHBA	5,780	6,970	7,410	1,190	1,630
POABA	0,047	0,057	0,206	0,010	0,159
POABA_sobre_PANI	4,280	5,240	5,740	0,960	1,460
POABA_sobre_POAF	0,329	0,508	0,511	0,179	0,182
POABA_sobre_POHBA	0,608	0,869	1,080	0,261	0,472
POAF	0,218	0,323	0,411	0,105	0,193
POAF_sobre_PANI	4,150	5,130	5,460	0,980	1,310
POAF_sobre_POABA	0,446	0,502	0,552	0,056	0,106
POAF_sobre_POHBA	0,545	0,886	2,080	0,341	1,535
POHBA	1,090	1,620	1,830	0,530	0,740
POHBA_sobre_PANI	4,990	5,770	5,740	0,780	0,750
POHBA_sobre_POABA	0,736	0,973	2,080	0,237	1,344
POHBA_sobre_POAF	0,317	0,532	1,250	0,215	0,933
PANI_POABA_cop	5,440	8,590	10,000	3,150	4,560
PANI_POAF_cop	13,100	11,600	12,000	-1,500	-1,100
PANI_POHBA_cop	17,600	20,300	19,300	2,700	1,700
POABA_POAF_cop	6,290	6,540	6,550	0,250	0,260
POABA_POHBA_cop	5,840	6,430	6,560	0,590	0,720
POAF_POHBA_cop	4,820	5,520	5,670	0,700	0,850

Utilizando-se os resultados apresentados na Tabela 6, determinou-se a especificidade (equação 3) e seletividade (equação 4) de cada uma das plataformas aplicadas ao desenvolvimento do imunossensor, com base nas seguintes equações:

$$\text{especificidade} = \frac{[R_{tc(\text{Ab}^+)} - R_{tc(\text{Ag})}]}{R_{tc(\text{Ag})}} \quad \text{equação 3}$$

$$seletividade = \frac{[R_{ic(Ab^-)} - R_{ic(Ag)}]}{R_{ic(Ag)}} \quad \text{equação 4}$$

A Figura 28 apresenta os resultados de especificidade e seletividade obtidos para cada uma das plataformas e observa-se que POABA, POAF_sobre_POHBA, POHBA_sobre_POAF e POHBA_sobre_POABA apresentaram especificidade de 338%, 282%, 294% e 183% respectivamente e, portanto, melhores desempenhos quando comparadas às demais.

Este resultado permite deduzir que a eficiência e eficácia da imobilização dos antígenos recombinantes não é função apenas do caráter de carregamento da superfície da plataforma funcionalizada, mas também de outras variáveis como distribuição estérica dos grupos funcionais presentes na plataforma funcionalizada para acoplamento da biomolécula e até mesmo a característica morfológica.

Isto pode ser observado uma vez que as plataformas POAF_sobre_POHBA, POHBA_sobre_POAF e POHBA_sobre_POABA não apresentaram carácter majoritariamente catiônico (Figura 24) e, ainda assim, apresentaram melhores desempenhos quando comparada a outras majoritariamente catiônicas.

Os diagramas de Nyquist referentes a detecção dos anticorpos específicos e de pacientes saudáveis (contraprova) para a doença de Chagas, utilizando as plataformas POABA, POAF_sobre_POHBA, POHBA_sobre_POAF e POHBA_sobre_POABA seguem apresentados na Figura 29 onde é nítido as diferenciações quanto à especificidade e seletividade de tais plataformas.

Figura 28 - Gráfico da porcentagem de variação dos valores de resistência a transferência de carga (ΔR_{tc}) referentes a: (—) sensibilidade e (—) seletividade do imunossensor impedimétrico na detecção de anticorpos *anti*-T. Cruzii em amostras clínicas utilizando as diferentes plataformas funcionalizadas.

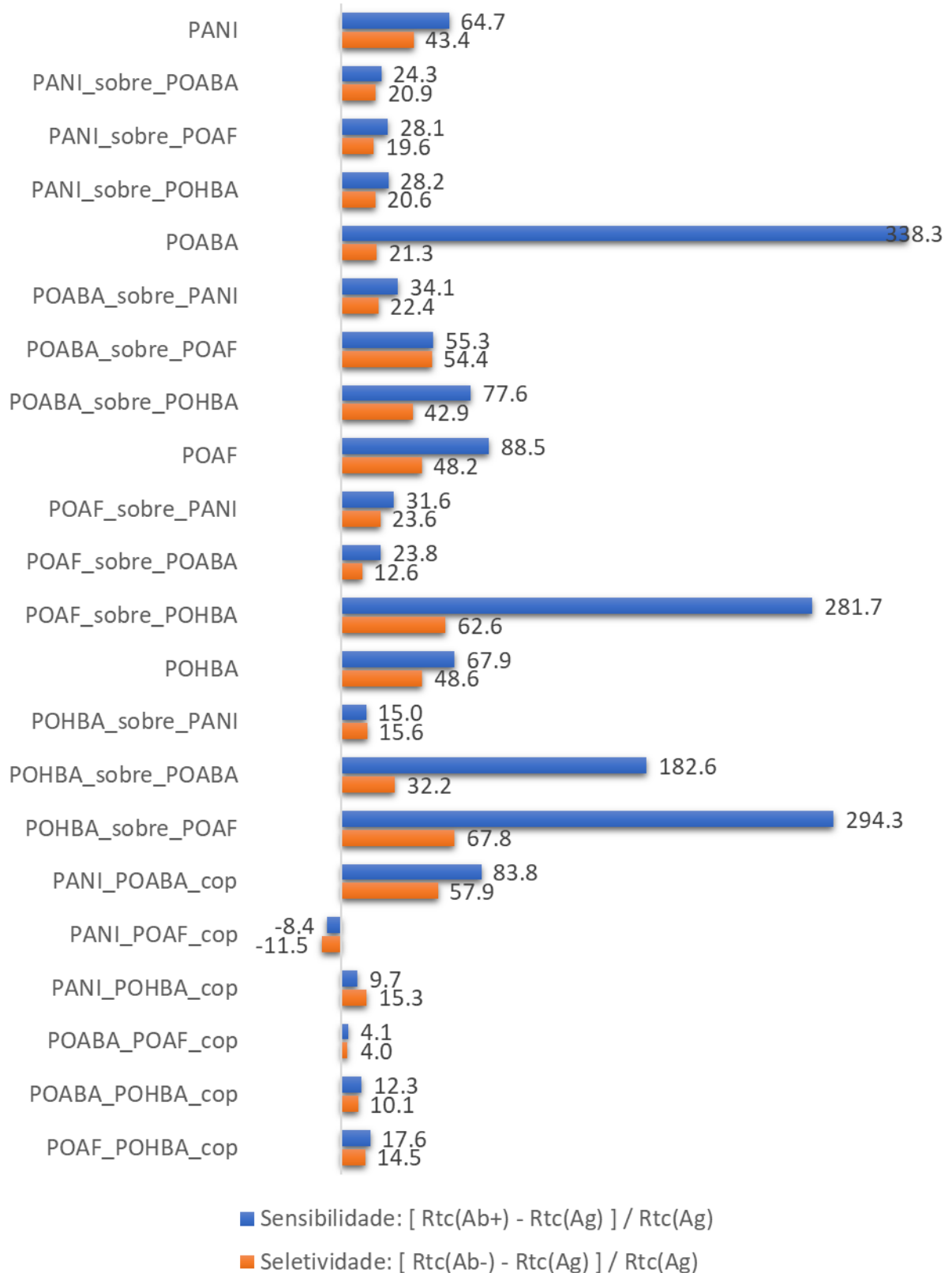
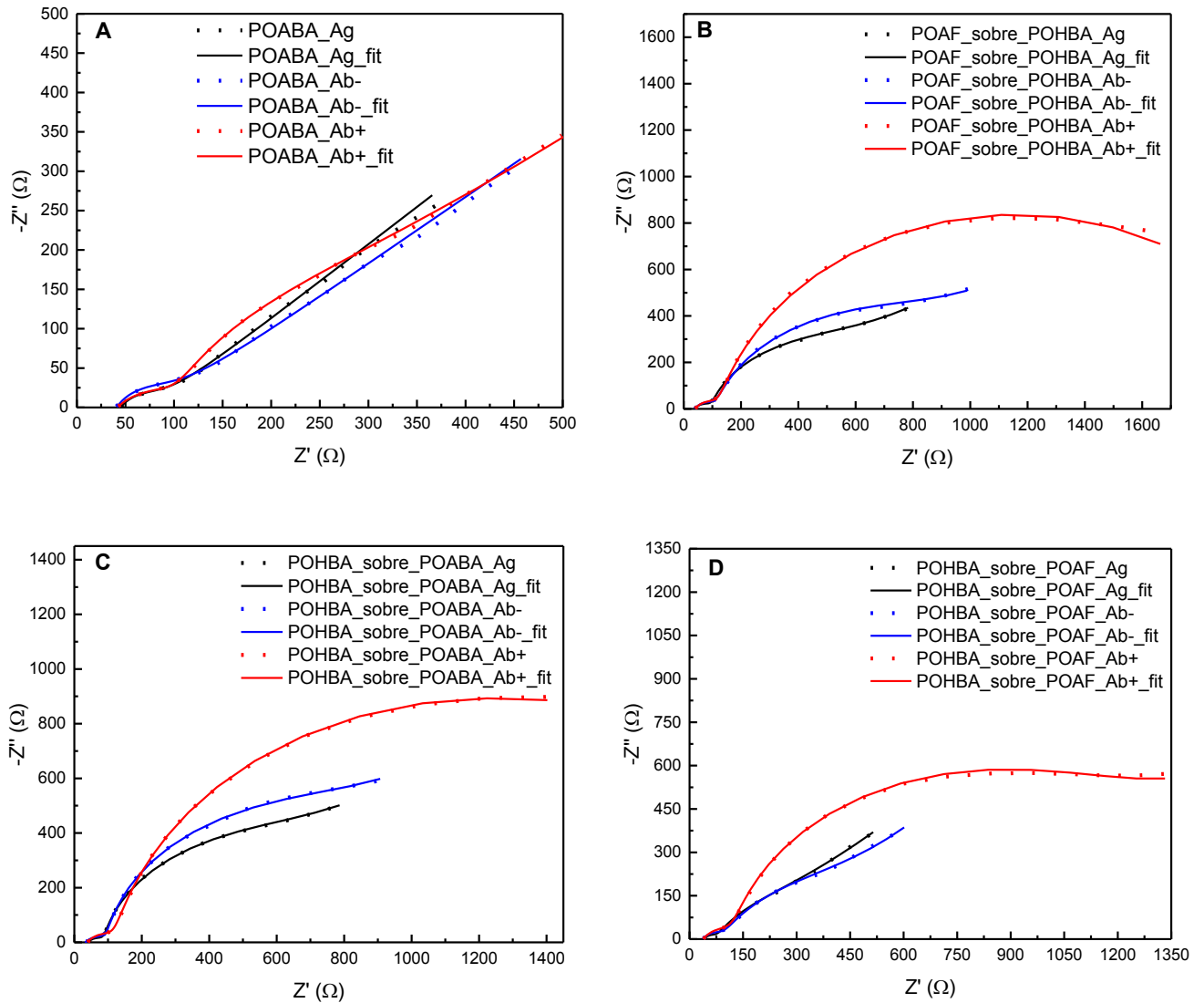


Figura 29 - Diagramas de Nyquist referentes a detecção dos anticorpos específicos da doença de Chagas e de pacientes saudáveis usando as plataformas: (A) POABA; (B) POAF_sobre_POHBA; (C) POHBA_sobre_POABA e (D) POHBA_sobre_POABA, obtidos em solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mM contendo KCl 0,1 M. Amplitude: 10 mV. Frequência: 100 kHz a 10 mHz. As linhas sólidas representam o ajuste dos dados experimentais aos circuitos equivalentes propostos.



6 CONCLUSÃO

Neste trabalho realizou-se o desenvolvimento e caracterização eletroquímica e morfológica de vinte duas plataformas funcionalizadas na forma de homopolímeros, bicamadas e copolímeros derivadas dos monômeros o-aminofenol, anilina, o-aminobenzamida e o-hidroxibenzamida com aplicação preliminar ao desenvolvimento de imunossensor para diagnóstico da doença de Chagas.

Observou-se diferenças entre as respostas eletroquímicas das bicamadas e dos copolímeros, sugerindo que, a copolimerização não é apenas uma sobreposição dos homopolímeros como ocorre nas bicamadas. Notou-se, ainda, que plataformas funcionalizadas derivadas dos monômeros: anilina, o-aminofenol e o-aminobenzamida tenderam a apresentar caráter majoritariamente catiônico, enquanto plataformas funcionalizadas derivadas do monômero o-hidroxibenzamida tenderam a apresentar caráter majoritariamente aniônico.

Análises de MEV possibilitaram observar diferenças morfológicas entre as plataformas funcionalizadas e o EG não modificado, comprovando assim a modificação da superfície dos EG pelos polímeros formados. Observou-se ainda que na formação das bicamadas ocorre sobreposição parcial da primeira camada, o que torna evidente a morfologia da segunda camada.

A partir de análises de EIE observou-se que plataformas funcionalizadas obtidas por copolimerização, no geral, apresentaram elevados valores de R_{tc} , enquanto bicamadas derivadas de POAF e POABA e os respectivos homopolímeros apresentaram baixos valores de R_{tc} . Os resultados obtidos por EIE comprovaram as observações feitas nas análises de voltametria cíclica para as plataformas funcionalizadas na presença das sondas redox.

Estudos a respeito do caráter de carga dos antígenos recombinantes 1F8, JL7 e B13 mostraram que os antígenos 1F8 e JL7 apresentam caráter majoritariamente aniônico enquanto o antígeno B13 apresenta caráter levemente catiônico.

Verificou-se que a eficiência e eficácia da imobilização dos antígenos recombinantes não é função apenas do caráter de carregamento da superfície da plataforma funcionalizada, mas também de outras variáveis como distribuição estérica dos grupos funcionais presentes na plataforma funcionalizada para acoplamento da biomolécula e até mesmo a característica morfológica e estrutural do filme polimérico.

Os imunossensores desenvolvidos utilizando-se as plataformas POABA, POAF_sobre_POHBA, POHBA_sobre_POAF e POHBA_sobre_POABA mostraram-se

promissores uma vez que apresentaram especificidade (diferenciação da resposta eletroquímica do anticorpo positivo quando comparada ao antígeno) de 338%, 282%, 294% e 183% respectivamente e, portanto, melhores desempenhos quando comparadas às demais.

Como perspectivas para este trabalho, pode-se realizar otimização da eletrogeração das plataformas POABA, POAF_sobre_POHBA, POHBA_sobre_POAF e POHBA_sobre_POABA; otimização do imunossensor proposto, uma vez que foram realizados apenas estudo iniciais, sem estudos de análise de interferentes, testes de estabilidade, reprodutibilidade e possibilidade de miniaturização do imunossensor.

REFERÊNCIAS

- ABACI, U.; GUNAY, H. Y.; KADIROGLU, U. Morphological and electrochemical properties of PPy, PANi bilayer films and enhanced stability of their electrochromic devices (PPy/PAni–PEDOT, PANi/PPy–PEDOT). **Electrochimica Acta**, 96 (2013), pp. 214-224.
- AFONSO, A. M.; EBELL, M. H.; TARLETON, R. L. A systematic review of high quality diagnostic tests for Chagas disease. **PLoS Negl Trop Dis.** (2012) 6: e1881.
- AGUILAR, H. M.; ABAD-FRANCH, F.; DIAS, J. C.; JUNQUEIRA, A. C.; COURA, J. R. Chagas disease in the Amazon Region. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 102, 47–56 (2007).
- AK, M.; CETIŞLI, H.; TOPPARE, L. Blend or copolymer? Spectroelectrochemical evidence of copolymerization and blending of two electrochromic monomers. **Colloid Polymer Science**, 291 (2013), pp. 767-772.
- ALAKHRAS, F.; HOLZE, R. Spectroelectrochemistry of intrinsically conducting Selenophene-3-chlorothiophene copolymers. **Journal of Solid State Electrochemistry**, 27 (2016), pp. 941-949.
- ALVES, M. F.; CORRÊA, R. A. M. S.; DA CRUZ, F. S.; FRANCO, D. L.; FERREIRA, L. F. Electrochemical enzymatic fenitrothion sensor based on a tyrosinase/poly(2-hydroxybenzamide)-modified graphite electrode. **Analytical Biochemistry**, vol. 553, 2018, pp. 15-23.
- ARJOMANDI, J.; ASHRAFIAN, A.; PARVIN, M. H. Conducting copolymers of N-methylaniline and o-aminophenol: electrosynthesis and in situ spectroelectrochemical characterization. **Journal of the Electrochemical Society**, 162 (2015), pp. E353-E361.
- ARUGULA, M. A.; SIMONIAN, A. Novel trends in affinity biosensors: current challenges and perspectives. **Measurement Science and Technology**, 25 (2018).
- ATES, M.; Review study of electrochemical impedance spectroscopy and equivalent electrical circuits of conducting polymers on carbon surfaces. **Progress in Organic Coatings**, vol. 71, 2011, p. 1-10.
- BALOUZ, V.; AGÜERO, F.; BUSCAGLIA, C. A. Chagas Disease Diagnostic Applications: present knowledge and future steps. **Advances in parasitology**. (2017) Vol. 97. pp. 1–45.
- BAR-COHEN, Y.; ANDERSON, I. A. Electroactive Polymer (EAP) actuators - background review. **Mechanics of Soft Materials**. 2019.
- BARD, A. J. FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2ª edição. JOHN WILEY & SONS, INC: New York. 1980.

BARROS, M. V.; ROCHA, M. O.; RIBEIRO, A. L.; MACHADO, F. S. Tissue Doppler imaging in the evaluation of the regional diastolic function in Chagas' disease. **Eur. J. Echocardiogr.** 2, 94–99 (2001).

BASHIR, M.; RAJENDRAN, P. A review on electroactive polymers development for aerospace applications. **Journal of Intelligent Material Systems and Structures**, Vol 29, 2018, p. 3681-3695.

BERGGREN, C.; BJARNASON, B.; JOHANSSON, G. Capacitive biosensors. **Electroanalysis**, vol 12, (2001), p. 173-180.

BERN, C. Chagas disease in the immunosuppressed host. **Current Opinion in Infectious Diseases**, (2012), Vol 25(4), 450-457.

BERN, C. Chagas' Disease. **N. Engl J. Med** (2015) 373: 456–466.

BERN, C.; KJOS, S.; YABSLEY, M. J.; MONTGOMERY, S. P. Trypanosoma cruzi and Chagas' disease in the United States. **Clin. Microbiol. Rev.** 24, 655–681 (2011).

BERN, C.; MARTIN, D. L.; GILMAN, R. H. Acute and congenital Chagas disease. **Advanced Parasitology.** 75, 19–47 (2011).

BERN, C.; MONTGOMERY, S. P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. **Clin. Infect. Dis.** 49, e52–e54 (2009).

BHARDWAJ, D.; GUPTA, S.; YADAV, P.; BHARGAV, R.; PATRA, A. All conjugated poly (3-hexylthiophene)-block-poly(hexyl-3,4-ethylenedioxythiophene)copolymers. **Chemistry Select**, 2 (2017), pp. 9557-9562.

BIVONA, A. E.; ALBERTI, A. S.; CERNY, N.; TRINITARIO, S. N.; MALCHIODI, E. L. Chagas disease vaccine design: the search for an efficient Trypanosoma cruzi immune-mediated control. **BBA – Molecular Basis of Disease**, 2020.

BLANCO-LÓPEZ, M. C.; LOBO-CASTAÑÓN, M. J.; MIRANDA-ORDIERES, A. J.; TUÑÓN-BLANCO, P. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 2004, 23, 36.

BOEHME, J. L.; MUDIGONDA, D. S.; FERRARIS, J. P. Electrochromic properties of laminate devices fabricated from polyaniline, poly (ethylenedioxythiophene), and poly (N-methylpyrrole). **Chemical Materials**, 13 (2001), pp. 4469-4472.

BOLIS, S. D.; CHARALAMBOUS, P. C.; EFSTATHIOU, C. E.; MANTZILA, A. G.; MALAMOU, C. A.; PRODROMIDIS, M. I. Monitoring of the avidin–biotinylated dextran interaction on Au- and Ti/TiO₂-electrode surfaces using a charge integrating device. **Sensors and Actuators B Chemical**, 114 (2006), pp. 47-57.

BOUFFLET, P.; WOOD, S.; WADE, J.; FEI, Z.; KIM, J. S.; HEENEY, M. Comparing blends and blocks: synthesis of partially fluorinated diblock polythiophene copolymers to investigate the thermal stability of optical and morphological properties. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, 12 (2016), pp. 2150-2163.

BRASIL P. E. A. A.; DE CASTRO, L.; HASSLOCHER-MORENO, A. M.; SANGENIS, L. H. C.; BRAGA, J. U. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. **BMC Infect Dis.** (2010) 10: 337.

BRITTO, C. C. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2018; 104: 122–135.

BUSCAGLIA, C. A.; KISSINGER, J. C.; AGÜERO, F. Neglected Tropical Diseases in the Post-Genomic Era. **Trends Genet.** (2015) 31: 539–555.

CANTEY, P. T.; STRAMER, S. L.; TOWNSEND, R. L.; KAMEL, H.; OFAFA, K. et al. The United States Trypanosoma cruzi Infection Study: evidence for vector-borne transmission of the parasite that causes Chagas disease among United States blood donors. **Transfusion.** (2012), Vol.52(9), pp.1922-1930.

CHIKKAVEERIAIAH, B.V.; BHIRDE, A.A.; MORGAN, N.Y.; EDEN, H.S.; CHEN, X. Electrochemical immunosensors for detection of cancer protein biomarkers. **ACS Nano**, 6 (2012), pp. 6546-6561.

CHOTSUWAN, C.; ASAWAPIROM, U.; SHIMOI, Y.; AKIYAMA, H.; NGAMAROONCHOTE, A.; JIEMSAKUL, T.; JIRAMITMONGKON, K. Investigation of the electrochromic properties of tri-block polyaniline-polythiophene-polyaniline under visible light. **Synthetic Metals**, 226 (2017), pp. 80-88.

CIRIELLO, R.; CARBONE, M. E.; COVIELLO, D.; GUERRIERI, A.; SALVI, A. M. Improved stability of thin insulating poly(o-aminophenol) films in aqueous solutions through an efficient strategy for electrosynthesis under neutral pH conditions: Electrochemical and XPS investigation. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, vol. 867, 2020.

CONSTANTINE, C. A.; MELLO, S. V.; DUPONT, A.; CAO, X. H.; SANTOS, D.; OLIVEIRA, O. N. et al. Layer-by-layer self-assembled chitosan/poly(thiophene-3-acetic acid) and organophosphorus hydrolase multilayers. **Journal American Chemical Society**, 125 (2003), pp. 1805-1809.

COTRIM, P. C.; PARANHOS, G. S.; MORTARA, R. A.; WANDERLEY, J.; RASSI, A.; CAMARGO, M. E.; DA SILVEIRA, J. F. Expression in Escherichia coli of a dominant immunogen of Trypanosoma cruzi recognized by human chagasic sera. **J. Clin. Microbiology**, vol. 28, 1990, pp. 519-524.

COTRIM, P. C.; PARANHOS-BACCALA, G.; SANTOS, M. R.; MORTENSEN, C.; CANO, M. I.; JOLIVET, M.; CAMARGO, M. E.; MORTARA, R. A.; DA SILVEIRA, J. F. Organization and expression of the gene encoding an immunodominant repetitive antigen associated to the cytoskeleton of Trypanosoma cruzi. **Mol. Biochem. Parasitology**, vol. 71, 1995, pp. 89-98.

COURA, J. R. **Chagas disease: what is known and what is needed—a background article.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 113–122 (2017).

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropical**, 115, 5–13 (2010).

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C. **Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz 107, 145–154 (2012).

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, 465, S6–S7 (2010).

COUTO, R. A. S.; LIMA, J. L. F. C.; QUINAZ, M. B. Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis. **Talanta**, (2016), 146, pp. 801-814.

CUNHA-NETO, E.; DURANTI, M.; GRUBER, A.; ZINGALES, B.; DE MESSIAS, I.; STOLF, N.; BELLOTTI, G.; PATARROYO, M. E.; PILLEGGI, F.; KALIL, J. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, vol. 92, 1995, pp. 3541-3545.

CUNHA-NETO, E.; TEIXEIRA, P. C.; NOGUEIRA, L. G.; KALIL, J. Autoimmunity. **Adv. Parasitol.** 76, 129–152 (2011).

DAIKH, S.; ZEGGAI, F. Z.; BELLIL, A.; BENYOUCEF, A. Chemical polymerization, characterization and electrochemical studies of PANI/ZnO doped with hydrochloric acid and/or zinc chloride: Differences between the synthesized nanocomposites. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, vol 121, 2018.

DANIELS, J. S.; POURMAND, N. Label-free impedance biosensors: opportunities and challenges. **Electroanalysis**, 19 (2007), pp. 1239-1257.

DELONGCHAMP, D. M.; KASTANTIN, M.; HAMMOND, P. T. High-contrast electrochromism from layer-by-layer polymer films. **Chemistry of Materials**, 15 (2003), pp. 1575-1586.

DIAS, J. C. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease: a clinical epidemiological review. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 22, 147–156 (1989).

DIEZ, C. N.; MANATTINI, S.; ZANUTTINI, J. C.; BOTTASSO, O.; MARCIPAR, I. The value of molecular studies for the diagnosis of congenital Chagas disease in northeastern Argentina. **American Journal Tropical Med. Hyg.** 2008; 78: 624–627.

DING, L.; BOND, A.M.; ZHAI, J.; ZHANG, J. Utilization of nanoparticle labels for signal amplification in ultrasensitive electrochemical affinity biosensors: a review. **Anal. Chim. Acta**, 797 (2013), pp. 1-12.

DUTRA, W. O.; ROCHA, M. O.; TEIXEIRA, M. M. The clinical immunology of human Chagas disease. **Trends Parasitology.** (2005) 21, 581–587.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRAN, A. N.; GHEDIN, E.; WORTHEY, E.A; The Genome Sequence of *Trypanosoma Cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. **Science**, vol. 309, 2005, pp. 409-415.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BLANDIN, G.; BERRIMAN, M.; CRABTREE, J.; AGGARWAL, G.; CALER, E.; RENAULD, H.; WORTHEY, E. A.; HERTZ-FOWLER, C.; GHEDIN, E.; et al. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science**, vol. 309, 2005, pp. 404-409.

ERDEM, H.; KARADENIZ, A.; CALISKAN. Dendrimer modified graphite sensors for detection of anticancer drug Daunorubicin by voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. **Analysta**, (2011), 136, pp. 1041 – 1045.

FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, A.D. Drugs and vaccines in the 21st century for neglected diseases. **Lancet Infect Dis**, 19 (2019), pp. 125-127.

GARCIA-ALVAREZ, A. et al. Chagas cardiomyopathy: the potential of diastolic dysfunction and brain natriuretic peptide in the early identification of cardiac damage. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 4, e826 (2010).

GARRAUD, O.; ANDREU, G.; ELGHOZZI, M. H.; LAPERCHE, S.; LEFRÈRE, J. J. Measures to prevent transfusion-associated protozoal infections in non-endemic countries. **Travel Med. Infect. Dis.** 5, 110–112 (2007).

GASCON, J.; BERN, C, PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Trop.** (2010), 115: 22–27.

GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Application of conducting polymers to biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, 17:(5), 2002, 345-359.

GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRAB, B. D. Application of conducting polymers to biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, vol. 17, 2002, pp. 345-359.

GOMES, Y. M.; LORENA, V. M. B.; LUQUETTI, A. O. **Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies?** Mem Inst Oswaldo Cruz, (2009) 104 Suppl: 115–121.

GRUBER, A.; ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas' disease. **Exp. Parasitology**, vol. 76, 1993, pp. 1-12.

GU, H.; LIN, K.; LIU, X.; JIAN, N.; QU, K.; XU, J. Enhanced redox stability and optical contrast of electrochromic copolymers from selenophene and 3-methylthiophen. **Journal Solid State Electrochemistry**, 22 (2018), pp. 599-611.

GÜRTLER, R. E.; KITRON, U.; CECERE, M. C.; SEGURA, E. L.; COHEN, J. E. Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 104, 16194–16199 (2007).

GUTIERREZ, F. R.; GUEDES, P. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. **Parasite Immunol.** 31, 673–685 (2009).

HAN, K. N.; LI, C. A.; SEONG, G. H. Microfluidic chips for immunoassays. **Annual Reviews of Analytical Chemistry**, vol 6 (2013), pp. 119-141

HEINZE, J. **Electronically conducting polymers**. Electrochemistry IV, Springer, 1990, pp. 1-47.

HEINZE, J.; FRONTANA-URIBE, B. A.; LUDWIGS, S. Electrochemistry of conducting polymers—persistent models and new concepts. **Chemical Reviews**, 110 (2010), pp. 4724-4771.

HEINZE, J.; URIBE, B. A. F.; LUDWIGS, S. Electrochemistry of Conducting Polymers-Persistent Models and New Concepts. **American Chemical Society**. Chemical reviews, 2010, Vol. 110.

HERWALDT, B. L. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. **Clin. Microbiol. Rev.** 14, 659–688 (2001).

HWANG, S. Y.; YOO, E. S.; IM, S. S. The synthesis of copolymers, blends and composites based on poly (butylene succinate). **Polymer Journal**, 44 (2012), p. 1179.

IANNI, B. M.; ARTEAGA, E.; FRIMM, C. C.; PEREIRA-BARRETTO, A. C.; MADY, C. Chagas' heart disease: evolutive evaluation of electrocardiographic and echocardiographic parameters in patients with the indeterminate form. **Arq. Bras. Cardiol.** 77, 59–62 (2001).

KALIMUTHU, P.; JOHN, S. A. Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid and xanthine using a nanostructured polymer film modified electrode. **Talanta**, vol. 80, 2010, pp. 1686-1691.

KEPAS, A.; GRZESZCZUK, M. Implications of layer-by-layer electrodeposition of polypyrrole from a solution of the same composition for ion transport in the polymer electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 582 (2005), pp. 209-220.

KHAN, M. Z. H. Nanoparticles Modified ITO Based Biosensor. **Journal of Electronic Materials**. Vol. 46, 2017, pp. 2254–2268.

KIM, S. K.; KIM, D.; JEON, S. Electrochemical determination of serotonin on glassy carbon electrode modified with various graphene nanomaterials. **Sensors and Actuators B: Chemical**. vol. 174, 2012, pp. 285-291.

KÖBERLE, F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. **Adv. Parasitol.** 6, 63–116 (1968).

KUO, C. W.; LEE, P. Y. Electrosynthesis of copolymers based on 1, 3, 5-tris (N-carbazolyl) benzene and 2, 2'-bithiophene and their applications in electrochromic devices. **Polymers**, 9 (2017), p. 518.

LABIB, M.; HEDSTROM, M.; AMIN, M.; MATTIASSON, B. A capacitive immunosensor for detection of cholera toxin. **Analytica Chimica Acta**, vol 634 (2009), pp. 255-261.

LAFAILLE, J. J.; LINSS, J.; KRIEGER, M. A.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W. GOLDENBERG, S. Structure and expression of two Trypanosoma cruzi genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. **Mol. Biochem. Parasitology**, vol. 35, 1989, pp. 127-136.

LÁNG, G., UJVÁRI, M.; INZELT, G. Possible origin of the deviation from the expected impedance response of polymer film electrodes. **Electrochimica Acta**, vol. 46, 2001, 4159-4175.

LI, J.; LIN, X. Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in poly (o-aminophenol) film on polypyrrole-Pt nanocomposite modified glassy carbon electrode. **Biosensor and Bioelectronic**, vol. 22, 2007, pp. 2898-2905.

LI, M.; ISHIHARA, S.; AKADA, M.; LIAO, M.; SANG, L.; HILL, J. P.; KRISHNAN, V.; MA, Y.; ARIGA, K. Electrochemical-coupling layer-by-layer (ECC-LbL) assembly. **Journal American Chemical Society**, 133 (2011), pp. 7348-7351.

LI, J.; ZHAO, J.; WEI, X. A sensitive and selective sensor for dopamine determination based on a molecularly imprinted electropolymer of o-aminophenol. **Sensors and Actuators B: Chemical**, vol. 140, 2009, pp. 663-669.

LIMA-COSTA, M. F.; MATOS, D. L.; RIBEIRO, A. L. Chagas disease predicts 10-year stroke mortality in community-dwelling elderly: the Bambuí cohort study of aging. **Stroke** 41, 2477–2482 (2010).

LIMA-COSTA, M. F.; PEIXOTO, S. V.; RIBEIRO, A. L. Chagas disease and mortality in old age as an emerging issue: 10 year follow-up of the Bambuí population-based cohort study (Brazil). **Int. J. Cardiol.** 145, 362–363 (2010).

LISDAT, F.; SCHAFFER, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 391 (2008), p. 1555-1567.

LYDON, B. R.; GERMANN, A.; YANG, J. Y. Chemical modification of gold electrodes: Via non-covalent interactions. **Inorganic Chemistry Frontiers**. vol. 3, 2016, pp. 836-841.

MACHADO, F. S. Pathogenesis of Chagas disease: time to move on. **Front. Bioscience**. (Elite Ed.) 4, 1743–1758 (2012).

MACHADO, F. S.; TANOWITZ, H. B.; TEIXEIRA, M. M. New drugs for neglected infectious diseases: Chagas' disease. **Br. J. Pharmacol**, 160, 258–259 (2010).

MALHOTRA, B. D.; RAMANATHAN, K.; PANDEY, S. S.; KUMAR, R.; GULATI, A.; MURTHY, A. S. N. **Journal of Applied Polymer Science**, 2000, 78, 662.

MARIN NETO, J. A.; SIMÕES, M. V.; SARABANDA, A. V. Chagas' heart disease. **Arq. Bras. Cardiol.** 72, 247–280 (1999).

- MARIN-NETO, J. A.; ALMEIDA FILHO, O. C.; PAZIN-FILHO, A.; MACIEL, B. C. Indeterminate form of Chagas' disease. Proposal of new diagnostic criteria and perspectives for early treatment of cardiomyopathy [Portuguese]. **Arq. Bras. Cardiol.** 79, 623–627 (2002).
- MARIN-NETO, J. A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B. C.; SIMÕES, M. V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, 115, 1109–1123 (2007).
- MARTINS-MELO, F. R.; ALENCAR, C. H.; RAMOS, A. N. JR.; HEUKELBACH, J. Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999–2007. **PLoS. Negl. Trop. Dis.** 6, (2012).
- MATTOSO, L. H. C.; MACDIARMID, A. J.; EPSTEIN, A. J. Controlled synthesis of high molecular weight polyaniline and poly(o-methoxyaniline). **Synthetic Metals**, 68 (1994), pp. 1-11.
- MATUSCHEK, L.; GÖBEL, G.; LISDAT, F. Electrochemical detection of serotonin in the presence of 5- hydroxyindoleacetic acid and ascorbic acid by use of 3D ITO electrodes. **Electrochemistry Communications**. vol. 81, 2017, pp. 145-149.
- MEDETALIBEYOGLU, H.; BEYTUR, M.; AKYILDIRIM, O.; ATAR, N.; YOLA, M. L. Validated electrochemical immunosensor for ultra-sensitive procalcitonin detection: Carbon electrode modified with gold nanoparticles functionalized sulfur doped MXene as sensor platform and carboxylated graphitic carbon nitride as signal amplification. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Vol 319, (2020).
- MISTRY, K.K.; LAYEK, K.; MAHAPATRA, A.; ROYCHAUDHURI, C.; SAHA, H. A review on amperometric-type immunosensors based on screen-printed electrodes. **Analyst**, 139 (2014), pp. 2289-2311.
- MOHAMMED, M. I.; DESMULLIEZ, M. P. Y. Lab-on-a-chip based immunosensor principles and technologies for the detection of cardiac biomarkers: a review., vol 11 (2011), pp. 569-595.
- MOLINA, R. B. et al. Dysautonomia and ventricular dysfunction in the indeterminate form of Chagas disease. **Int. J. Cardiology**. 113, 188–193 (2006).
- MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 104, 17–30 (2009).
- MOONA, J. M.; THAPLIYAL, N.; HUSSAINA, K. K.; GOYALC, R. N.; SHIMA, Y. B. Conducting polymer-based electrochemical biosensors for neurotransmitters: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, 102, (2018), p:540-552.
- MORA, M. C.; NEGRETTE O. S.; MARCO, D. et al. Early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection using PCR, hemoculture, and capillary concentration, as compared with delayed serology. **J. Parasitology** 2005; 91: 1468–1473.

- MOURE, Z.; ANGHEBEN, A.; MOLINA, I.; GOBBI, F.; ESPASA, M.; et al. Serodiscordance in chronic Chagas disease diagnosis: a real problem in non-endemic countries. **Clin Microbiol Infect.** (2016).
- MUBANGA, C.; MWAPE, K. E.; PHIRI, I. K.; et al. Progress on the development of rapid diagnostic tests for foodborne neglected zoonotic helminthiases: A systematic review. **Acta Tropica**, Volume 194, June 2019, Pages 135-147.
- MUÑOZ-CALDERÓN, A.; DÍAZ-BELLO, Z.; VALLADARES, B.; NOYA, O.; LÓPEZ, M. C.; et al. Oral transmission of Chagas disease: typing of *Trypanosoma cruzi* from five outbreaks occurred in Venezuela shows multiclonal and common infections in patients, vectors and reservoirs. **Infect Genet Evol.** (2013) 17: 113–122.
- NAGAJYOTHI, F. et al. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Cell. Microbiol.** 14, 634–643 (2012).
- NICOLIA, A.; MANZO, A.; VERONESI, F.; ROSELLIN, D. An overview of the last 10 years of genetically engineered crop safety research. *Crit. Rev. Biotechnol*, 34 (1) (2018), pp. 77-88.
- OLIVEIRA, E.; RIBEIRO, A. L.; ASSIS SILVA, F.; TORRES, R. M.; ROCHA, M. O. The Valsalva maneuver in Chagas disease patients without cardiopathy. **Int. J. Cardiol.** 82, 49–54 (2002).
- OLIVEIRA, R. M.; VIEIRA, S. N.; ALVES, H. C.; FRANÇA, E. G.; FRANCO, D. L.; FERREIRA, L. F.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Electrochemical and morphological studies of an electroactive material derived from 3-hydroxyphenylacetic acid: a new matrix for oligonucleotide hybridization. **Journal of Materials Science**, vol. 45, 2010, p. 475-482.
- OZCAN, A. İLKBAS, S. Poly(pyrrole-3-carboxylic acid)-modified pencil graphite electrode for the determination of serotonin in biological samples by adsorptive stripping voltammetry. **Sensors and Actuators B: Chemical**, vol. 215, 2015, pp. 518-524.
- PATRA, A.; KUMAR, R.; CHAND, S. Selenium containing π conjugated polymers for organic solar cells. **Isr. Journal Chemistry**, vol: 54 (2014), pp. 621-641.
- PECOUL, B.; BATISTA, C.; STOBBAERTS, E.; RIBEIRO, I.; VILASANJUAN, R. et al. The BENEFIT Trial: Where Do We Go from Here? **PLoS Negl Trop. Dis.** (2016), 10.
- PEELING, R. W. Bringing diagnostics to developing countries: an interview with Rosanna Peeling. **Expert Rev Mol Diagn.** (2015) 15: 1107–1110.
- PEELING, R. W. Diagnostics in a digital age: an opportunity to strengthen health systems and improve health outcomes. **Int Health** (2015) 7: 384–389.
- PEREPICHKA, I. F.; PEREPICHKA, D. F.; MENG, H.; WUDL, F. Light-emitting polythiophenes. **Advanced Materials**, vol: 17, 2005, pp. 2281-2305.
- PETHERICK, A. Country by country. **Nature**, 465, S10–S11 (2010).

- PINTO DIAS, J. C. Natural history of Chagas disease [Portuguese]. **Arq. Bras. Cardiol.** 65, 359–366 (1995).
- POTYRAILO, R. A. Polymeric sensor materials: toward an alliance of combinatorial and rational design tools. **Angewandte Chemie Int**, 45 (2006), pp. 702-723.
- PRADO, C. M. et al. The vasculature in Chagas disease. **Adv. Parasitol.** 76, 83–99 (2011).
- PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect. Dis.** 1, 92–100 (2001).
- PRODROMIDIS, M. I. Impedimetric immunosensors—A review. **Electrochimica Acta.** Volume 55, (2010), p. 4227-4233.
- RAMANATHAN, K.; BANGAR, M. A.; YUN, M.; CHEN, W.; MYUNG, N. V.; MULCHANDANI, A. *Journal of the American Chemical Society* 2004, 127, 496.
- RASSI A. JR.; RASSI A.; MARIN-NETO J.A. (2010) Chagas disease. **Lancet** 375: 1388–1402.
- RIBEIRO, A. L.; CAMPOS, M. S.; BAPTISTA, L. M.; DE SOUSA, M. R. The Valsalva maneuver in Chagas disease patients without cardiopathy. **Clin. Auton. Res.** 20, 79–83 (2010).
- RIBEIRO, A. L.; ROCHA, M. O. Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** (1998) 31, 301–314.
- ROBINSON, D. L.; HERMANS, A.; SEIPEL, A. T.; WIGHTMAN, R. M. Monitoring rapid chemical communication in the brain. **Chemical Reviews.** vol. 108, 2008, pp. 2554-2584.
- ROCHA, M. O.; RIBEIRO, A. L.; TEIXEIRA, M. M. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. **Front. Biosci.** 8, e44–e54 (2003).
- ROCHITTE, C. E. et al. Myocardial delayed enhancement by magnetic resonance imaging in patients with Chagas' disease: a marker of disease severity. **Journal American Coll. Cardiology**, 46, 1553–1558 (2005).
- ROMAÑA, C. **Acerca de un síntoma inicial de valor para el diagnóstico de la forma aguda de la enfermedad de Chagas.** La conjuntivitis schizotripanosómica unilateral (hipótesis sobre la puerta de entrada conjuntival de la enfermedad). *Mision de Estudios de Patología Regional Argentina (MEPRA)* 35, 16–25 (2012).
- RUSSOMANDO, G.; ALMIRON, M.; CANDIA, N.; FRANCO, L.; SANCHEZ Z, DE GUILLEN, I. Implementation and evaluation of a locally sustainable system of prenatal diagnosis to detect cases of congenital Chagas disease in endemic areas of Paraguay. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2005; 38 (suppl 2): 49–54.
- SAJID, M.; NAZAL, M. K.; MANSHA, M.; ALSHARAA, A.; JILLANI, S. M. S.; BASHEER, C. Chemically modified electrodes for electrochemical detection of dopamine in

the presence of uric acid and ascorbic acid: A review. **Trends in Analytical Chemistry**, vol. 76, 2016, pp. 15-29.

SANTOS, C. C.; PIMENTA, T. C.; THOMASINI, R. L.; VERLY, R. M.; FRANCO, D. L.; FERREIRA, L. F. Electropolymerization of phenol and aniline derivatives: Synthesis, characterization and application as electrochemical transducers. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, vol. 846, 2019.

SARKER, A. K.; HONG, J. D. Layer-by-layer self-assembled multi-layer films composed of graphene/polyaniline bilayers: high-energy electrode materials for supercapacitors. **Langmuir**, 28 (2012), pp. 12637-12646.

SCARIM, C. B.; JORNADA, D. H.; MACHADO, M. G. M.; et al. Thiazole, thio and semicarbazone derivatives against tropical infective diseases: Chagas disease, human African trypanosomiasis (HAT), leishmaniasis, and malária. **European Journal of Medicinal Chemistry**. Volume 162, 15 January 2019, Pages 378-395.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 102, 75–85 (2007).

SCHOFIELD, C. J.; DIAS, J. C. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. **Adv. Parasitology**. 42, 1–27 (1999).

SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. **Trends Parasitology**. 22, 583–588 (2006).

SHACKELFORD, J. F. **Introduction to materials science for engineers**. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2008.

SHAH, A. A.; HOLZE, R. Copolymers and two-layered composites of poly(o-aminophenol) and polyaniline. **J. Solid State Electrochemical**, 2006. vol:11. p:38–51.

SHAHJAD; BHARGAV, R.; BHARDWAJ, D.; MISHRA, A.; PATRA, A. Synthesis and characterization of benzodithiophene–chalcogenophene based copolymers: a comparative study of optoelectronic properties and photovoltaic applications. **Macromolecular Chemistry and Physics**, vol 218, 2017, p. 1700038.

SHI, Y.; PENG, L.; DING, Y.; ZHAO, Y.; YU, G. Nanostructured conductive polymers for advanced energy storage. **Chemical Society Reviews**, vol. 44, 2015, pp. 6684-6696.
SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clin. Infect. Dis.** 54, 845–852 (2012).

SIMOTWO, S. K.; KALRA, V. Polyaniline-based electrodes: recent application in supercapacitors and next generation rechargeable batteries. **Current Opinion in Chemical Engineering**, vol. 13, 2016, pp. 150-160.

SINGHAL, S.; YADAV, P.; NAQVI, S.; GUPTA, S.; PATRA, A. Donor–acceptor–donor copolymers with 3,4-ethylenedioxythiophene moiety: electropolymerization and effect on optoelectronic and electrochromic properties. **ACS Omega**, 4 (2019), pp. 3484-3492.

SNOOK, G.A., KAO, P.; BEST, A.S. Conducting-polymer-based supercapacitor devices and electrodes. **Journal of Power Sources**, 196:(1), 2011, 1-12.

SRINIVASAN, R.; ELAIYAPPILLAI, E.; ANANDARAJ, S. KUMAR, B.; JOHNSON, P. M.; Study on the electrochemical behavior of BiVO₄/PANI composite as a high performance supercapacitor material with excellent cyclic stability. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, vol. 861, 2020.

STORINO, R.; MILEI, J.; MANZULLO, E. C.; DARRAIDOU, M. Evolucion natural y estudios longitudinales, in Enfermedad de Chagas (eds Storino, R. & Milei, J.) 593–604, **Inter-médica**, Buenos Aires, 1994.

SYED, A. A.; DINESAN, M. K. Polyaniline—a novel polymeric material. **Talanta**, vol. 38, 1991, pp. 815-837.

TALVANI, A.; TEIXEIRA, M. M. Inflammation and Chagas disease some mechanisms and relevance. **Adv. Parasitol.** 76, 171–194 (2011).

TIAN, Q.; XU, J.; ZUO, Y.; LI, Y.; ZHANG, J.; ZHOU, Y.; DUAN, X.; LU, L.; JIA, H.; XU, Q.; YU, Y. Three-dimensional PEDOT composite based electrochemical sensor for sensitive detection of chlorophenol. **J. Electroanal. Chem.**, 837 (2019), pp. 1-9.

TIMOTHY, R. J.; HOLFORD, F. D.; SEAMUS, P. J. H. **Biosensors and Bioelectronics**, vol 34 (2012), pp. 12-24.

TRIVINHO-STRIXINO, F.; PEREIRA, E. C.; MELLO, S. V.; OLIVEIRA, O. N. Ions transport and self-doping in layer-by-layer conducting polymer films. **Synthetic Metals**, 155 (2005), pp. 648-651.

TUDORACHE, M.; BALA, C. Biosensors based on screen printing technology and their applications in environmental and food analysis. **Anal. Bioanal. Chem.**, (2007), 338, pp. 565-578.

UMEZAWA, E. S.; BASTOS, S. F.; CAMARGO, M. E.; YAMAUCHI, L. M.; et al. Evaluation of Recombinant Antigens for Serodiagnosis of Chagas Disease in South and Central America. **Journals American Society of Microbiology**. 1999, Vol. 37, pp. 1554-1560.

USLU, B.; OZKAN, S. A. Electroanalytical application of carbon based electrodes to the pharmaceuticals. **Analytical Letters**, vol. 40, 2007, pp. 817-853.

VIOTTI, R. J. et al. Value of echocardiography for diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease cardiomyopathy without heart failure. **Heart** 90, 655–660 (2004).

WALTARI, E.; CARABAJAL, E.; SANYAL, M.; FRIEDLAND, N.; MCCUTCHEONA, K. M. Adaption of a conventional ELISA to a 96-well ELISA-Array for measuring the antibody

responses to influenza virus proteins and vaccines. **Journal of Immunological Methods**, (2020), 112789.

WAN, Y.; SU, Y.; ZHU, X.; LIU, G.; Fan, C. Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics. **Biosens. Bioelectron**, 47 (2013), pp. 1-11.

WANG, H.; LINC, J.; SHEN, Z. X. Polyaniline (PANi) based electrode materials for energy storage and conversion. **Journal of Science: Advanced Materials and Devices**, vol. 1, Issue 3, 2016, pp. 225-255.

WANG, B.; ZHAO, J.; XIAO, J.; CUI, C.; LIU, R. Synthesis and electropolymerization of 9H-carbazol-9-ylpyrene and its electrochromic properties and electrochromic device application. **Intern. Journal Electrochemical Science**, 7 (2012), pp. 2781-2795.

WHO. **Control and prevention of Chagas disease in Europe - 2018**.

WHO. Control of Chagas disease. **Second report of the WHO Expert Committee. Technical report series nº 905**. Geneva: World Health Organization, 2002.

WHO. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1. Último acesso em: 20/04/2020.

ZOROMBA, M. S.; TASHKANDI, M. A.; ALSHEHRI, A. A.; ABDEL-AZIZ, M. H.; BASSYOUNI, M.; MAHMOUD, S. A.; SLIMANE, A. B.; AL-HOSSAINY, A. F. Polymer solar cell based on doped o-anthranilic acid and o-aminophenol copolymer. **Optical Materials**, vol. 104, 2020.