



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CTG - CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIA
PPGEB- PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

DIEGO RICARDO DA SILVA LEITE

**DESENVOLVIMENTO DE SENSOR IMPRESSO NANOESTRUTURADO
MODIFICADO COM FTALOCIANINA DE COBALTO PARA
APLICAÇÃO EM IMUNOSSENSORES**

Recife

2016

DIEGO RICARDO DA SILVA LEITE

**DESENVOLVIMENTO DE SENSOR IMPRESSO NANOESTRUTURADO
MODIFICADO COM FTALOCIANINA DE COBALTO PARA APLICAÇÃO EM
IMUNOSSENSORES**

Dissertação apresentada ao Centro de Tecnologia e Geociências da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica.

Área de Concentração: Engenharia Biomédica

Orientadora: Profa. Dra. Rosa
Fireman Dutra

Recife

2016

Catálogo na fonte
Bibliotecária Valdicea Alves, CRB-4 / 1260

L533d	Leite, Diego Ricardo da Silva. Desenvolvimento de sensor impresso nanoestruturado modificado com ftalocianina de cobalto para aplicação em Imunossensores / Diego Ricardo da Silva Leite. – 2016. 62folhas, Il., Abre. Sigl. Simb. e Tabs. Orientadora: Profa. Dra. Rosa Fireman Dutra. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação de Engenharia Biomédica, 2016. Inclui Referências e Anexo. 1. Engenharia Biomédica. 2. Eletrodos impressos. 3. Nanotubos de carbono. 4. Polipirrol. 5. Imunossensor eletroquímico. 6. hepatite B. I. Dutra, Rosa Fireman. (Orientadora). II. Título. 610.28 CDD (22. ed.)	UFPE BCTG/2016-178
-------	--	----------------------------------

DIEGO RICARDO DA SILVA LEITE

**DESENVOLVIMENTO DE SENSOR IMPRESSO NANOESTRUTURADO
MODIFICADO COM FTALOCIANINA DE COBALTO PARA APLICAÇÃO EM
IMUNOSSENSORES**

Dissertação apresentada ao Centro de Tecnologia e Geociências da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica.

APROVADO EM 04/02/2016

Banca Examinadora:

Profª Drª Rosa Amália Fireman Dutra

Prof Dr Renato Evangelista de Araujo

Drª Elaine Cavalcanti Rodrigues Vaz

Recife

2016

A minha mãe **Josefa**, ao meu pai **Zezé** (*in memorian*) ao meu irmão **Edson**, a
minha sobrinha **Ana Laura (Lalinha/Pipi)** por todo amor, renúncia, carinho e
incentivo de cada um.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço e louvo a DEUS e a Jesus, em primeiro lugar, pelo dom da vida e por estar me ajudado a findar mais um ciclo. Glórias a Ele por tudo o que faz na minha vida. Agora parto a me tornar um Mestre, que me atrela um grande conhecimento junto as minhas graduações de Nutrição e Física.

À minha mãe Josefa (a sempre carinhosa dona Biuzinha), ao meu pai José (o divertido Sr Zezé) (*in memorian*), ao meu irmão José Edson e a minha sobrinha Laura (o amor de titio) que tanto me ajudam e apoiam nas horas boas e não tão boas assim e que constituem a minha força e a minha luz aqui na Terra. Sem eles nada disso estaria acontecendo. Junto com eles sempre descobri verdadeiro motivo do respeito, da doação e dos valores imutáveis da ética, bem como todo o apoio que tive e terei na minha vida.

À professora Rosa Dutra pelo enorme apoio e incentivo. Por sua disponibilidade, por ter acreditado e confiado em mim, assim sendo chave fundamental na escolha acadêmica e também ter me ensinado verdadeiramente o que é ciência.

À Erika Lima, que é muito importante em minha vida e que sempre me auxiliou me acalmando nas horas certas. Ao meu irmão de consideração Jeferson Fernandes que sempre esteve comigo orando e ao meu grande amigo e irmão Wallace Albuquerque. Vocês são aquelas pessoas que sempre estiveram e estão comigo me auxiliando de alguma forma para que esse sonho esteja se realizando, pois de uma forma ou de outra nunca se separaram de mim, me apoiando e ajudando de modo incondicional. São vocês que sei, nunca irão deixar de estar comigo. A força, a oração e a luz de cada um, foram e são muito importantes pra mim. Obrigado assim de forma mais que especial a vocês.

Sou grato também aos meus amigos do LAPED, os quais partilhamos tantos momentos, rimos, tomamos café, comemos bolo e trufa, almoçamos juntos, esquentamos muito a cabeça e é claro, trabalhamos muuuuuuito. Obrigado muito a Diego Guerra, Erika, Bellinha, Elaine Vaz, Djair, dentre outros.

A alguns amigos de minha turma de mestrado que sempre estiveram junto a mim me auxiliando e criando laços pra toda a vida como Jadiel Nascimento, Jessika Fernanda e Priscila Mendonça.

A todos os meus amigos de verdade que me auxiliaram, tanto no âmbito da pós-graduação, quanto na vida. Quais são pessoas especiais próximas

e distantes fisicamente. O laço que nos une faz-me acreditar que o amor e a amizade existem entre os povos. À minha comadre Gaby Santos, Clarice Maria, dona Fátima Santos, meus compadres Samuel Azevedo e Gerliane Bezerra, bem como meu afilhado Pietro Miguel, Cristiane Perecles, Alex Bruno, Géssyka Campos, Marah Lima, Flávia Rafaela, Maria Fernanda, Nandinha Felix, Val Nascimento, Marcela Emília, Manu Mendonça, Thamyris Mayara, Victor Moura, Dennis Gabirel, Lucas Belisário, Wagner Anderson (*in memorian*) e demais, que, embora não citados, o meu carinho por eles é o mesmo.

A todos o meu muito obrigado.

DIEGO RICARDO DA SILVA LEITE

“Medo de nada, só amor”

Padre Haroldo J. Rahm, SJ.

“Sempre Mais Alto”

Treinamento de Liderança Cristã.

RESUMO

Atualmente, têm-se buscado métodos que viabilizem um diagnóstico eficaz, prático, rápido e de baixo custo na detecção de doenças que se revelem atrativos para os serviços de saúde pública. Nesse contexto, os imunossensores têm apresentado respostas promissoras, revelando-se como métodos analíticos práticos, rápidos e econômicos. Recentemente, a utilização de nanomateriais de alótropos de carbono, destacando-se os nanotubos de carbono (NTC), têm resultado em melhoria na sensibilidade por aumentar transferência eletrônica, sobretudo quando aliados a polímeros condutores. O objetivo deste trabalho foi desenvolver plataforma nanoestruturada para aplicação em imunossensores. Como objeto de estudo, foi detectado anticorpos contra o nucleocapsídeo do vírus da hepatite B (HBV), visto que este marcador é o mais importante no controle e vigilância de bolsas de sangue em serviços hemoterápicos. No presente trabalho, eletrodos de tinta de carbono serigrafados sobre substrato de polietileno tereftalato (PET) foram modificados por 0,0063% de nanotubos de carbono (NTC-COOH) e 6% em concentração de ftalocianina de cobalto (CoPc) que foram recobertos com filmes de polipirrol (PPi). O filme foi obtido por cronoamperometria (0,8V, 80s) usando soluções de 0,1 M de pirrol (Pi) em meio ácido. Foi observada uma boa reprodutibilidade e estabilidade dos eletrodos sobretudo pós-inserção do filme quando caracterizado eletroquimicamente. Além disso, as imagens de microscopia eletrônica mostraram uma baixa produção de pirroles. Os sensores desenvolvidos com a associação de nanotubos de carbono funcionalizados apresentaram melhor desempenho analítico em relação ao controle (sem NTC). A imobilização do antígeno do núcleo capsídeo da hepatite B (HBc-Ag) foi confirmada por decréscimo da área eletroativa dos voltamogramas cíclicos. A resposta aos anticorpos anti-HBc foi evidenciada por técnica de voltametria de onda quadrada, mostrando que a plataforma desenvolvida é promissora para aplicação em sensor para hepatite.

Palavras-chave: eletrodos impressos, nanotubos de carbono; polipirrol; imunossensor eletroquímico; hepatite B; ftalocianina de cobalto.

ABSTRACT

Currently, they have been sought methods that enable effective diagnosis, practical, fast and low-cost in detecting diseases that may prove attractive to public health services. In this context, immunosensors have shown promising responses, revealing himself as analytical methods of practical, fast and economical. Recently, the use of carbon allotropes of nanomaterials, highlighting carbon nanotubes (CNT), have resulted in improved sensitivity by increasing wire transfer, especially when combined with conductive polymers. The aim of this study was to develop nanostructured platform for immunosensors application. As study object was detected antibodies against the nucleocapsid of hepatitis B virus (HBV), as this marker is the most important in the control and surveillance of blood bags in haemotherapeutic services. In this study, carbon ink electrodes screen printed on the substrate polythene terephthalate (PET) have been modified for 0.0063% of carbon nanotubes (CNT-COOH) and 6% concentration of cobalt phthalocyanine (CoPc) were coated with polypyrrole films (PPy). The film was obtained by chronoamperometry (0.8 V, 80 s) using 0.1 M solution of pyrrole (Py) in acidic. Was observed a good reproducibility and stability particularly after insertion of the film electrode when electrochemically characterized. Furthermore, electron microscopy images showed a low production pyrroles. The sensors developed in association with functionalized carbon nanotubes showed better analytical performance compared to the control (without NTC). The immobilization of the capsid antigen hepatitis B core (HBc-Ag) was confirmed by decreasing the area of the electroactive cyclic voltammograms. The response to anti-HBc antibody was evidenced by technical square wave voltammetry, showing that the platform is developed promising for application to sensor hepatitis.

Keywords: printed electrodes, carbon nanotubes; polypyrrole; electrochemical immunosensor; Hepatitis B; cobalt phthalocyanine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Biossensor de glicose baseado no eletrodo de oxigênio de Clark (Adaptado de EGGINS,1997)	18
Figura 2 - Elementos de um biossensor.....	19
Figura 3 - Estrutura química do PPI	23
Figura 4 - Estrutura química da CoPc.....	26
Figura 5 - Vírus da hepatite B	30
Figura 6 - Imagem do eletrodo modificado com tinta de carbono	34
Figura 7 - Influência da quantidade de CoPc sobre a tinta de carbono, em suas diferentes concentrações. Os VC foram C obtidos em célula eletroquímica usando 5 mM de $K_4[Fe(CN)_6]$ / ($K_3[Fe(CN)_6]$) como eletrólito suporte, velocidade de varredura de 100 mV/s	36
Figura 8 - Voltamograma cíclicos mostrando (1) em preto, El controle após a limpeza e (2) VC em azul, El com filme de PPI. Os VC foram obtidos em célula eletroquímica usando 5 mM de $K_4[Fe(CN)_6]$ / ($K_3[Fe(CN)_6]$) como eletrólito suporte, velocidade de varredura de 100 mV/s	38
Figura 9 - VC consecutivos registrados em 20 ciclos a uma velocidade de varredura de 100 mV/s em solução de $K_4[Fe(CN)_6]$ / ($K_3[Fe(CN)_6]$)	39
Figura 10 - (A) VC sob diferentes velocidades de varredura aumentando de 10 a 120 mV/s do mais interno ao mais externo em solução de $K_4[Fe(CN)_6]$ / ($K_3[Fe(CN)_6]$). (B) Curvas de I_{pa} e I_{pc} em função da raiz quadrada da velocidade de varredura em solução de $K_4[Fe(CN)_6]$ / ($K_3[Fe(CN)_6]$)	40
Figura 11 - Estudo de reprodutibilidade: Voltamogramas dos eletrodos não modificado com o filme de PPI e voltamogramas do eletrodo modificado com o filme de PPI.....	41
Figura 12 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura	43
Figura 13 – VC das áreas eletroativas das etapas do imunossensor, mostrando sucessivos decréscimos da área eletroativa. Os eletrodos foram submetidos a	

velocidade de varredura de 100 mV/s em sonda redox de $K_4[Fe(CN)_6]$ /
 $(K_3[Fe(CN)_6])$ 45

Figura 14 A – VOQ das respostas analíticas do imunossensor ao anti HBc. A
indicação das setas mostra a direção das sucessivas incubações com
decaimento de corrente 46

Figura 14 B – Ajuste linear da resposta de corrente de pico anódico das VOQ
em relação à concentração de anti HBc (ng/mL) 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variação dos picos anódicos e catódicos em função da concentração de CoCp e sua relação I_{pa}/I_{pc} 37

Tabela 2 - Análise estatística da reprodutibilidade em função dos picos anódicos e catódicos dos EI sem PPI e EI com PPI..... 42

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ag/AgCl	Prata/cloreto de prata
CA	Cronoamperometria
DMF	Dimetilformamida
E	Potencial
EP_c	Potencial de pico catódico
EP_a	Potencial de pico anódico
F	Frequência de excitação
BSA	Albumina Sérica Bovina
I	Corrente
CoPc	Ftalocianina de cobalto
I_{pa}	Corrente de picoanódico
I_{pc}	Corrente de picocatódico
NTC	Nanotubos de Carbono
NTC-COOH	Nanotubos de carbono carboxilados
VOQ	Voltametria de onda quadrada
PPI	Polipirrol
VC	Voltametria cíclica
HBc Ag	Antígeno do núcleo capsídeo da Hepatite B
Anti-HBc	Anticorpos do núcleo capsídeo da Anti-hepatite B
PBS	Tampão fosfato salino
EDC	<i>N</i> -etil- <i>N'</i> -(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
NHS	<i>N</i> -hidroxi succinimida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	Biossensor	18
2.1.1	Imunossensor	20
2.2	Eletrodos Impressos	21
2.3	Modificação de Superfície	22
2.4	Polipirrol	23
2.5	Nanotubos de Carbono	24
2.6	Ftalocianina de Cobalto (CoPc)	26
2.7	Imobilização do Elemento Biológico	27
2.8	Hepatite B	28
3	OBJETIVOS	31
3.1	Objetivo geral	31
3.2	Objetivos Específicos	31
4	METODOLOGIA	32
4.1	Reagentes	32
4.2	Equipamentos	32
4.3	Confecção do eletrodo impresso modificado com CoPc	33
4.3.1	Obtenção da tinta de carbono modificada com NTC –COOH	33
4.3.2	Preparo do eletrodo impresso modificado com CoPc	33
4.3.3	Eletrodeposição do filme de Polipirrol (PPI)	34
4.4	Imobilização do HbC-Ag e resposta analítica do imunossensor	35
4.5	Análise Morfológica da Superfície eletródica	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	Otimização da concentração de CoPc na tinta de impressão	36

5.1.1	Estudo de estabilidade do filme de PPI.....	38
5.1.2	Estudos de reprodutibilidade.....	41
5.2	Análise Morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	42
5.3	Imobilização do HBc-Ag.....	44
5.4	Resposta do Imunossensor	45
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	48
	REFERÊNCIAS	49
	ANEXO- Artigo	56

1 INTRODUÇÃO

Biossensores são dispositivos que geram uma informação analítica utilizando-se um elemento de reconhecimento biológico, o qual, está em contato direto com um transdutor acoplado a um sistema.

Os biossensores são formados basicamente por dois elementos intimamente associados, o componente biológico ou biorreceptor e o transdutor. Entre as classificações existentes, os enzimáticos, genossensores e imunossensores, estão de acordo com o analito a ser detectado, outro fator de classificação existente é o tipo de transdutor utilizado que podem ser: eletroquímico, óptico, piezoelétrico, térmico, entre outros.

Os eletrodos, que são um dos elementos que constituem os biossensores, tem um papel fundamental, pois são sobre os mesmos que ocorrem todos os processos de interface eletroquímica, imobilização de amostras biológicas e detecção de analitos - alvo.

Eletrodos impressos (do inglês – “Screen-printed electrodes”) atualmente se revelam como uma alternativa de sucesso frente aos eletrodos convencionais, por apresentarem vantagens como: serem sistemas mais simples, menores, compactos e descartáveis, gerando diminuição das etapas de limpeza entre as análises eletroquímicas e envenenamento da superfície, viabilizando o desenvolvimento de sensores portáteis para aplicação diagnóstica em saúde.

Além das variadas vantagens acima mencionadas, os eletrodos impressos (EI) suportam várias formas de modificação na sua superfície sensora. Nos últimos anos, a introdução de nanomateriais e/ou reagentes específicos tem despertado o interesse para estudos de melhoria da sensibilidade e seletividade dos EI.

A escolha do material para modificação do eletrodo é um aspecto fundamental para boa eficácia do imunossensor. Esta matriz deve apresentar características eletroquímicas apropriadas como alta taxa de transferência eletrônica e também ser adequada para o método de imobilização selecionado. A importância da escolha do material do eletrodo de trabalho também se deve ao fato de que as respostas obtidas estão relacionadas com reações redox que

ocorrem na superfície ou na interface eletrodo - solução. Desta maneira, o analito interage com a superfície eletródica, resultando em menos espécies iônicas presentes na amostra que são oxidadas ou reduzidas, resultando na detecção da interação antígeno-anticorpo livre de interferências.

A utilização de nanomateriais na elaboração de matrizes sensoras tem sido amplamente estudada. Dentre os nanomateriais, os nanotubos de carbono são amplamente aplicados por apresentarem propriedades eletroquímicas que auxiliam na melhoria da condução da transferência eletrônica, na estabilidade e na interação entre o analito e a plataforma sensora. Os nanotubos de carbono são conceitualmente constituídos de folhas de grafeno enroladas de formato cilíndrico com arranjos hexagonais de carbono, variando o tamanho de seu diâmetro de nanômetros a centímetros.

Na confecção de eletrodo modificado, a ftalocianina de cobalto (CoPc), tem mostrado uma boa transferência de elétrons, e assim gerando, uma reação ainda mais eletrocatalítica quando em contato com uma sonda redox não - tampão.

As hepatites virais são causadas por vírus hepatotrópicos (A, B, C, D, E), e apresentam amplo espectro clínico, variando desde formas assintomáticas, anictéricas, ictéricas típicas, até quadros de insuficiência hepática aguda grave (fulminante). Na maior parte dos casos, mostram-se assintomáticas independentemente do tipo de vírus, quando apresentam sintomatologia, são caracterizadas por fadiga, mal-estar, náuseas, dores abdominais, anorexia e icterícia. Quando atinge a cronicidade, em geral, decorre de quadro assintomático, com manifestações clínicas apenas nos estágios mais avançados da doença. O diagnóstico para hepatite viral inclui a realização de exames laboratoriais demorados, custosos e que requerem muitas etapas, a fim de caracterizar a doença e qual a sua gravidade.

A possibilidade de construção de sensores com características desejadas como sensibilidade e especificidade diagnóstica e reprodutibilidade controlada tem levado a possibilidade de construir imunossensores para aplicação em amostras reais como soro, sangue total, etc. Neste contexto, qualidade de custo-efetividade mostram que o diagnóstico da hepatite B no Brasil constitui-se em possibilidade analítica desejada.

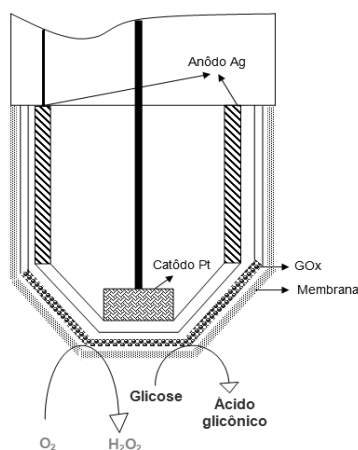
Diante do exposto, esta dissertação teve por objetivo o desenvolvimento de uma plataforma sensora com características de rápida resposta, baixo custo e facilidade de produção em larga escala. Foram utilizados na sua confecção, eletrodos impressos constituídos de tinta de carbono modificados por NTC e CoPc, recoberto por polímeros condutores na tentativa de aplicação e detecção de anticorpos contra o núcleo capsídeo do vírus da hepatite B (anti-HBC).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biossensor

O termo biossensor foi introduzido por Leland C. Clark Jr, em 1956, com a invenção do eletrodo amperométrico de oxigênio (figura 1). Em seus estudos na detecção de diferentes analitos pela modificação deste eletrodo com enzimas, Clark e Lyons construíram em 1962, um sensor de glicose, cujo eletrodo era envolto por uma membrana de diálise com a enzima glicose oxidase imobilizada (NEWMAN e TURNER, 2007; LOWE, 2007). O oxigênio dissolvido na solução entre os eletrodos foi reduzido, e a corrente resultante, proporcional às concentrações de oxigênio e glicose simultaneamente.

Figura 1 - Biossensor de glicose baseado no eletrodo de oxigênio de Clark
Adaptado de EGGINS (1997).



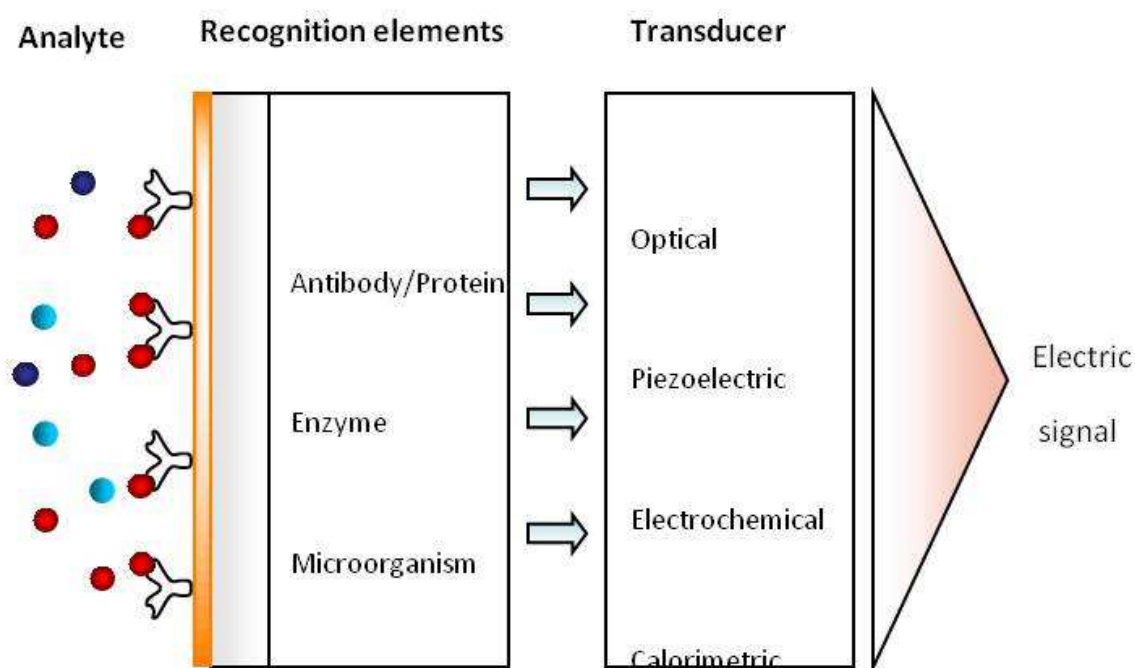
FONTE: LOWE et al.(2007)

O termo biossensor, é empregado a dispositivos capazes de fornecer um sinal analítico usando um elemento de reconhecimento biológico o qual, está em contato direto com o elemento de transdução (THEVENOT *et al.*, 2001).

O biossensor é formado basicamente por dois elementos intimamente associados, que são: o componente biológico ou biorreceptor e o transdutor (figura 2).

O componente biológico tem a finalidade de detectar a substância de interesse (analito) por meio de uma reação bioquímica gerando um sinal, que pode ser uma variação na concentração de íons, liberação de gases, emissão ou absorção de luz, variação de massa, mudança de estado de oxidação, dentre outros. O transdutor converte este sinal em uma resposta quantificável proporcional à concentração do analito (SILVA, 2010).

Figura 2 – Desenho esquemático demonstrando os elementos de um biossensor



FONTE: SILVA *et al.* (2010)

O que diferencia os biossensores dos sensores químicos e dos métodos analíticos convencionais é a especificidade e a seletividade da análise (THEVENOT *et al.*, 2001). Isso se deve ao componente biológico, onde sua interação com o substrato deve ser altamente específica, evitando interferência com outras substâncias (BRUCKNER-LEA, 2004; LIMA e NUNES, 2006); A seletividade é baseada na habilidade para diferenciar um dentre substratos variados (DIAS *et al.* 2013).

O biorreconhecimento resulta em respostas rápidas, combinando seletividade das reações bioquímicas, fácil manuseio, detecção do analito em limites baixos, sensibilidade, a qual, varia de acordo com o transdutor empregado (LIMA & NUNES, 2006; BRUCKNER-LEA, 2004).

2.1.1 Imunossensor

Imunossensor é um tipo de biossensor que se baseia em interações específicas antígeno-anticorpo, onde o antígeno ou o anticorpo é imobilizado na superfície do eletrodo de trabalho. No processo de transdução, também chamado de imunoensaio nesse tipo de biossensor, o sítio de ligação do anticorpo (porção Fab), se liga a porção superficial do antígeno ou epítopo, assim formando o complexo antígeno-anticorpo ou imunocomplexo. Essa interação que ocorre é caracterizada através de uma constante de afinidade, onde se relaciona com as funções de concentração do supracitado complexo que é formado no meio da reação, em que essa pode ser mantida por ligações de hidrogênio, ligações hidrofóbicas, forças eletrodinâmicas como a de *Van der Waals*, por exemplo; dessa forma garantem a especificidade da reação (DIAS *et al.* 2013).

Os imunoensaios são classificados como homogêneos, quando para a detecção não se faz necessária à separação entre espécies marcadas e livres, e heterogêneos quando se necessita a quantificação precisa, de uma etapa adicional para separação das frações livres e ligadas da espécie marcada (RICCARDI, 2002; MOZAZ, 2004).

2.2 Eletrodos Impressos

Existem vários tipos de eletrodos de trabalho atualmente, os quais são utilizados em determinações analíticas. O avanço tecnológico, permitiu a inovação de tecnologias a fim de se desenvolver dispositivos com maior robustez que utilizem metodologias mais práticas e simplificadas na adaptação de arranjos e tamanhos com intenção de análises em campo e análise e determinação de analito para determinações posteriores (TSOUTI, 2011; METTERS, KADARA & BANKS, 2011).

De tal forma, é esperado que se ofereça ao cientista/operador/profissional um instrumento sensível, econômico, de uso simplificado e que resulte em respostas rápidas e robustas. Nesse ínterim, os eletrodos impressos (EI) tem-se mostrado uma boa ferramenta, no que tange a oferecer ao mercado um arranjo de fácil manuseio, produzido de forma econômica e simples. São dispositivos de baixo custo, de alta versatilidade em aplicações e funcional, o que os tornam descartáveis depois de seu uso (ZHANG, 2011).

Os eletrodos impressos são produzidos sobre um suporte inerte (PET e cerâmicas, por exemplo) com um filme depositado sobre ele e fixado pela técnica de serigrafia ("silk-screen") recoberto por material isolante elétrico, esse com responsabilidade de definir a área do contato elétrico que é interligado a área da superfície ativa do eletrodo. Entretanto, mesmo com a técnica de serigrafia sendo definida como a técnica padrão, alguns autores estão atualmente testando outras técnicas, com diversas tintas de alta condutividade que estão em disponibilidade no mercado. Dentre essas tintas pode-se destacar a tinta a base de carbono, esta sem ou com algum metal (Pt, Ag, Au, entre outros), compostos (ftalocianina de cobalto) ou nanomaterial (nanotubos de carbono) para a produção dos eletrodos (TSOUTI, 2011; ZHANG, 2011).

Logo após a impressão dos eletrodos no suporte inerte, o filme é seco, podendo ser em altas temperaturas controladas em estufa ou em temperatura ambiente. Os eletrodos impressos, dessa maneira vêm sendo empregados como alternativa ao uso dos eletrodos convencionais como eletrodos de ouro, carbono vítreo e de mercúrio, por exemplo; pois se apresentam face aos supracitados com sistemas menores, mais simples, descartáveis e compactos. Com tantas benefícios geram ainda diminuição nas etapas de sua limpeza, oferecendo

facilidade na geração de sensores compactos (CAI, 2009; METTERS, KADARA & BANKS, 2011).

Deste modo, com o objetivo de atender a demanda de testes analíticos cada vez mais sensíveis, rápidos, simples e econômicos para determinação de compostos biologicamente e clinicamente importantes além do monitoramento de compostos importantes em matrizes ambientais, torna-se interessante investigar a possibilidade de desenvolver sensores eletroquímicos que atendam a essas exigências (TSAI, 2015).

2.3 Modificação de Superfície

A intenção com a modificação de superfície dos eletrodos de trabalho é ter um controle entre o eletrodo e o soluto, no ponto de vista físico-químico, devendo as respostas geradas serem mais elevadas do que se o eletrodo não estivesse modificado (VENDRAME, 2004).

Tais respostas devem ser capazes de revelar imunossensores confiáveis, pois são sensíveis quanto a imobilização de biomoléculas sobre as superfícies, essas se tornando mais estáveis e reprodutíveis do ponto de vista eletroanalítico (REZAEI, 2011).

Na modificação, a superfície do eletrodo de trabalho é alterada de forma proposital através de uma ligação covalente em sítios específicos na superfície do eletrodo, isso ocorre frequentemente por uma adsorção direta ao eletrodo de trabalho, assim com o recobrimento de toda superfície sensora, a condutividade de elétrons tende a tornar-se mais fácil e de modo a aumentar a superfície sensora.

Pode também ocorrer de modificar o eletrodo ainda em sua confecção, como no caso de eletrodos impressos, em que, na preparação do eletrodo de pasta de carbono, por exemplo, faz-se com um modificador pouco solúvel em água para que haja uma adsorção correta com o material referido (PEREIRA, SANTOS & KUBOTA, 2002).

Existe hoje uma gama de materiais que são capazes de modificar uma superfície sensora, nas mais variadas áreas da ciência, devendo ser escolhido na modificação aqueles materiais e nanomateriais que consigam uma boa interação entre si, não anulando o potencial do outro ou mascarando a resposta analítica,

podendo ao invés de auxiliar na transferência de elétrons, gerar na verdade um viés analítico (VENDRAME, 2004; REZAEI, 2011).

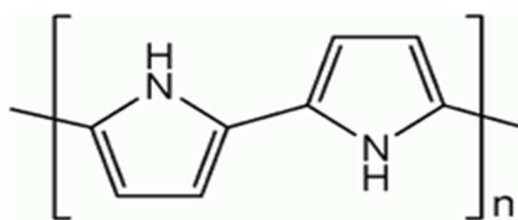
2.4 Polipirrol

O Polipirrol é um polímero que apresenta boa estabilidade química e reatividade redox, além disso exibe alta condutividade, além de ter uma facilidade de síntese (GUIMARD, GOMEZ & SCHIMIDT, 2007).

Sua síntese pode ser gerada de forma eletroquímica e química. Na química, sendo mais vantajosa, onde obtém grandes polímeros, pois sua síntese se baseia na adição de um reagente oxidante para ocorrer à polimerização. Porém para que essa polimerização ocorra de forma satisfatória, o potencial de oxidação tem que ser o mesmo. O método eletroquímico também chamado de eletropolimerização faz com que haja um controle na hora de se obter um filme polimérico da espessura que se deseja, pois ao contrário do método químico, o eletroquímico se faz necessário em eletrodos, pois nesses há a formação do filme com propriedades condutivas (SLIMANE, 2004).

É um composto heterocíclico aromático e bastante reativo por conta do anel aromático de sua estrutura (figura 3), onde com a inserção de prótons nos átomos de carbono, cátions são produzidos formando assim oligômeros que geram a polimerização. Dessa forma, o polipirrol é bastante condutor e quimicamente estável, levando de modo atrelado a uma elevada capacidade condutiva. Além do mais, essa síntese é de procedimento rápido, barato e limpo onde pode ser feito em meio aquoso ou não; tornando esse procedimento ainda mais conveniente (JANG, 2005; BURNS, 2007).

Figura 3 - Estrutura química do PPI



FONTE: GUIMARD, GOMEZ & SCHIMIDT (2007)

A utilização da eletropolimerização do polipirrol tem como enfoque a passagem da corrente anódica da solução que contém os monômeros, o eletrólito e o solvente, o que gera um filme condutor em um substrato na superfície eletródica (JAKAB, 2007).

Porém para que aconteça a eletropolimerização do polipirrol são necessárias quatro etapas, das quais no final delas deve acontecer uma acoplação das espécies oxidadas. Em ordem as etapas são as seguintes:

- 1- Oxidação do monômero e geração de um cátion;
- 2- Geração de um dímero do monômero oxidado e inserção de dois cátions;
- 3- Oxidação do dímero e reoxidação do monômero, acoplando-se ao trímero;
- 4- O cátion se torna pouco reativo e a estrutura final da cadeia aromática é esterificada.

2.5 Nanotubos de Carbono

Os nanotubos de carbono (NTC) despertam interesse desde sua descoberta em 1991 (IJIMA, 1991), justamente por conta das diferentes e diversas aplicações que tem; por causa de suas características como grande resistência mecânica, propriedade eletrônicas e estabilidades térmica e química (MERKOÇI, 2005); assim dependendo do diâmetro, quiralidade dos átomos de carbono e disposição dimensional, os nanotubos de carbono podem revelar características de um material semicondutor e condutor. Se revelando de excelente condutividade elétrica e térmica, têm uma força de tensão cem vezes maior que a do aço, os nanotubos de carbono, são hoje bastante usados no desenvolvimento da nanotecnologia e tem sido alvo de pesquisas e em alta tecnologia ao redor de todo o mundo (PUNBUSAYAKUL, 2013).

Os NTC podem ser constituídos por uma única folha de grafeno. Seu comprimento varia de nanômetros a centímetros, embora que, o diâmetro em ordem nanométrica varia dependendo do tipo do nanotubo. Em relação às suas camadas, podem ser de múltiplas camadas de grafeno, conhecidos por nanotubos de paredes múltiplas (NTCPM) ou com apenas uma única folha de

grafeno, sendo chamada assim de nanotubos de paredes simples (NTCPS) (BAUGHMAN, 2012; PUNBUSAYAKUL, 2013).

Para a síntese dos NTC são usados diversos métodos como podemos destacar alguns comumente utilizados na produção como deposição química de vapor, descarga de arco elétrico e ablação por laser. Assim, por produzir uma quantidade elevada dessa nanomaterial, sendo esses com diminuto teor de impurezas e boa qualidade de alta eficiência, o método de deposição a vapor químico, dentre os três métodos supracitados, é o eleito dentre eles (MASHETER, 2007).

Ao se usar um biossensor eletroquímico, acaba-se por aumentar a área de superfície sensora, o que se revela de uma importância bastante relevante para esse tipo de biossensor. Assim, as superfícies com NTC se mostram com acentuada propriedade eletrocatalítica e alta condutividade elétrica. Tais características são importantes, pois podem ser explicadas na relevância do aumento da cinética de transferência dos elétrons com e ao eletrodo, a sensibilidade ao biossensor e também na melhoria da reprodutibilidade do biossensor que foi confeccionado (PUNBUSAYAKUL, 2013).

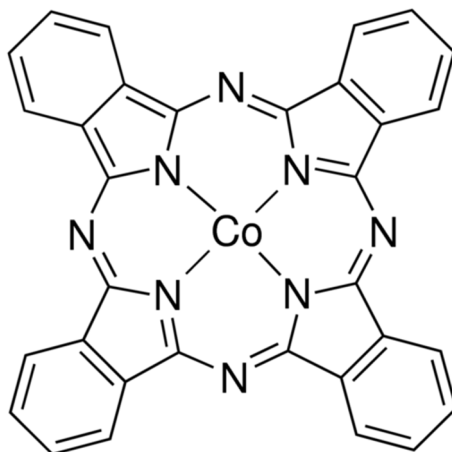
Uma das características atrativas do NTC é que estes são insolúveis e inertes na maior parte dos solventes orgânicos, bem como quimicamente, ocorrendo esse fato por conta das interações de *Van der Waals* entre as superfícies dos nanotubos. De tal maneira, deve-se haver uma funcionalização com introdução de radicais como tiol, hidroxila, carboxila e amina, por exemplo. Essa funcionalização dos NTC permite uma ligação estável (preferencialmente covalente) com as biomoléculas. A modificação da hibridização de ligações entre os átomos de carbono gera sensores mais sensíveis e seletivos; tanto a dispersão quanto funcionalização são etapas importantes para a obtenção de sensores mais robustos (CHIANG, 2001; MERKOÇI, 2005; PUNBUSAYAKUL, 2013).

2.6 Ftalocianina de Cobalto (CoPc)

As ftalocianinas foram descobertas acidentalmente em 1907 por BRUN & TCHEMIAC, na *South Metropolitan Gas Company* em Londres, sendo um subproduto da síntese da *o*-cianobenzamida partindo da ftalamida e anidrido acético.

A palavra ftalocianina do grego (ftalo = óleo de rocha e cianina = azul) foi utilizada pela primeira vez por LINSTED & ROBERTSON em 1933 para descrever uma nova classe de compostos orgânicos. Na década de 30, LINSTED & ROBERTSON determinaram as estruturas das ftalocianinas de base livre e ftalocianinas de Ni(II), Cu(II) e Pt(II), utilizando-se apenas análises de difração de raios-X. A região central da molécula de ftalocianina (figura 4) geralmente contém uma dupla de hidrogênios e metais (ao todo são mais de setenta diferentes metais). É um material semicondutor (RODRIGUEZ-MENDEZ, 2009; NASCIMENTO, 2013).

Figura 4 - Estrutura química da CoPc



FONTE: NASCIMENTO (2013)

Como compostos macrocíclicos altamente conjugados, as ftalocianinas possuem propriedades químicas e físicas que têm despertado a muitas pesquisas. Como características destacam-se a alta estabilidade, excelente atividade redox do ponto de vista das voltametrias (o que ocorre em contrapartida uma desestabilização do potencial oxidativo) e ausência de toxicidade (PARRA, 2007).

A ftalocianina de cobalto é revelada há muito tempo, para grande parte de reações químicas como catalisador heterogêneo e homogêneo. Funcionando assim como um catalisador de potencial redox em que o estado de oxidação tem bastante variação do complexo metálico gerando um ciclo catalítico. Essa atividade catalítica do referido complexo é dependente de um íon metálico no centro da estrutura química e ainda, da oxidação total do complexo. O uso do macrocíclico na confecção de eletrodos de tinta de carbono quimicamente modificados tem se revelado como uma ótima aplicação analítica (NASCIMENTO, 2013).

2.7 Imobilização do Elemento Biológico

Na tecnologia de biossensores, a imobilização do elemento biológico é um dos fatores chave para o desenvolvimento de dispositivos eficientes, com desempenho apropriado, estabilidade e alta sensibilidade, alta seletividade, tempo de resposta curto e alta reprodutibilidade (SASSOLAS *et al.*, 2011; SOTOMAYOR e KUBOTA, 2001).

A imobilização de biomoléculas, em materiais é de interesse não somente na confecção de biossensores, mas também em áreas da indústria de alimentos, farmacêutica, células artificiais e em reações (TALBERT e GODDARD, 2012).

A principal característica do método de imobilização é que o mesmo deve garantir que a biomolécula continue ativa e disponível para o analito (SASSOLAS *et al.*, 2011). Desta forma, a eficiência do biossensor será garantida se a biomolécula for imobilizada por um mecanismo que garanta a orientação da biomolécula, não interferindo em sua estrutura e conformação (KIM *et al.*, 2006; ANSARI, 2012). No caso de imunossensores, o sítio ativo deve estar disponível, devendo ser observada a sua orientação e acessibilidade além da manutenção de sua atividade biológica (NORDE *et al.*, 2008).

A imobilização não só permite a proximidade necessária entre o biomaterial e o transdutor, mas também ajuda a estabilizar o conjunto para reutilização. Alguns materiais são utilizados como matriz de imobilização, como

polímeros condutores, nanomateriais, sol-gel e hidro-gel, membranas, fibras, vidro e grafite (ARYA *et al.*, 2008).

O método de imobilização afeta a atividade e estabilidade dos biossensores enzimáticos (SASSOLAS *et al.*, 2011). Desta forma, tem surgido grande interesse no entendimento dos fatores que afetam a atividade, assim como estratégias de imobilização de biomoléculas (TALBERT e GODDARD, 2012). Dentre elas, as biomoléculas têm sido imobilizadas principalmente pelas técnicas de adsorção não covalente ou não específica, adsorção covalente e oclusão (SASSOLAS *et al.*, 2011).

A imobilização de biomoléculas por ligação covalente consiste em ligações de grupos não ativos das biomoléculas, ou seja, não essenciais para sua atividade catalítica (no caso de enzimas) e grupos reativos (grupos funcionais ou espaçadores), como hidroxila, carboxila, amino, tiol, glutaraldeído, carbodiimina, ligados na superfície sólida do suporte insolúvel (THEVENOT *et al.*, 2001). Os suportes podem ser materiais inorgânicos, naturais ou polímeros sintéticos (SASSOLAS *et al.*, 2011). Este tipo de ligação é geralmente atingido pela ativação iniciada na superfície usando reagentes multifuncionais, como por exemplo, glutaraldeído ou carbodiiiminas. Em seguida é realizado o acoplamento da biomolécula ao suporte ativado e remoção do excesso e biomoléculas não ligadas (SASSOLAS *et al.*, 2011).

Com este tipo de ligação, tem-se biossensores com elevado tempo de vida, pois há um aumento da estabilidade e não se produz perda da biomolécula durante a sua utilização (GALLI, 2011).

2.8 Hepatite B

As hepatites virais constituem um grave problema de saúde pública em todo mundo, destacando-se sobretudo quando advindos de estoques de sangue em hemocentros, entre os agentes responsáveis pelo desenvolvimento da doença destaca-se, o vírus da Hepatite B (HBV).

Em 1965, nos Estados Unidos da América (EUA), Blumberg e colaboradores identificaram em dois pacientes hemofílicos politransfundidos com anticorpos que reagem com um antígeno presente no soro de um aborígine

australiano (Blumberg, 1965). Devido a esta descoberta, este antígeno foi denominado “antígeno Austrália”.

Posteriormente, o antígeno Austrália foi encontrado em indivíduos com diagnóstico de hepatite. No ano de 1976, Blumberg foi contemplado com o prêmio Nobel de medicina em reconhecimento à sua descoberta (Lee, 1997).

Atualmente, sabe-se que o antígeno Austrália corresponde a uma proteína presente na superfície da partícula do HBV, denominada “antígeno de superfície do vírus da Hepatite B” (HBsAg).

Estima-se que dois bilhões de pessoas estejam infectadas por este vírus no mundo, e que mais de 350 milhões tenham hepatite crônica nos seus diferentes estágios (Lee, 1997; Lin KW, 2004). A infecção crônica pelo HBV representa uma das doenças virais mais importantes dos seres humanos, evidenciado pelo fato de que mais de um terço da população mundial mostra evidências sorológicas de contato prévio com o vírus (Lin KW, 2004).

Entretanto, a incidência mundial do anti-HBs (anticorpo de superfície do vírus da Hepatite B) está caindo e esta queda não está relacionada apenas à vacinação, mas também às melhores condições de higiene e à campanha de combate à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) que enfatiza os perigos da promiscuidade e do compartilhamento de seringas e agulhas (Lin KW, 2004; Robinson WS, 1976).

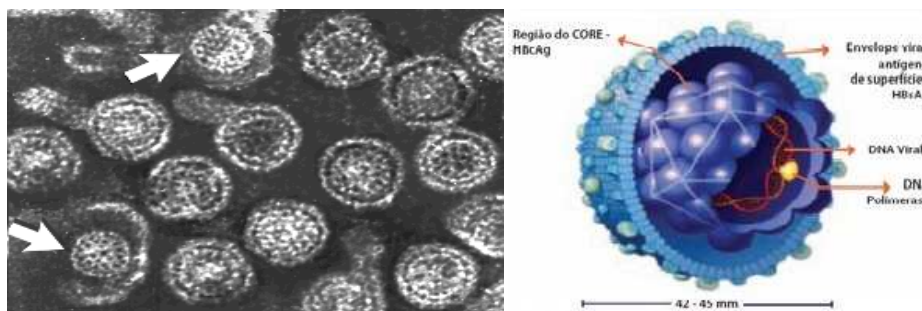
O vírus da Hepatite B é um vírus pequeno de aproximadamente 42 nm de diâmetro (figura 5). A partícula viral consiste de uma porção central de natureza proteica, o cerne, que contém o genoma viral, a DNA polimerase, uma porção externa de natureza lipídica, o envelope, com proteínas virais inseridas. A estrutura do DNA genômico é de dupla fita circular incompleta com um hiato de 600 a 2.100 nucleotídeos (Miller, 1986; Petit, 1990). Ao penetrar na célula hospedeira, a DNA polimerase viral repara este hiato. No envelope viral encontra-se a proteína chamada de “antígeno do core” (HBcAg). Durante a infecção, o DNA viral encontra-se no núcleo da célula infectada, na forma episomal, e, nos casos de carcinoma hepatocelular, tem sido encontrado integrado no DNA do hepatócito.

O genoma do HBc apresenta quatro fases de leitura aberta (ORFs) que se sobrepõem, permitindo uma maior capacidade codificadora. A ORF-S é subdividida em S, pré-S1 e pré-S2, e codifica o HBsAg.

O domínio pré-S1 parece estar envolvido na interação do HBV com o receptor específico nos hepatócitos (Petit, 1990; Alberti, 1990). Esse efeito pode ser importante no desenvolvimento da Hepatite B crônica, sendo que o pré-S2 tem comportamento semelhante (Kurai, 1989). A ORF-C/pré C codifica o antígeno do core (HBcAg) e o antígeno “e” (HBeAg). A ORF-P codifica a DNA polimerase que tem, também, atividade de transcriptase reversa. A ORF-X codifica uma proteína ativadora da transcrição de diversos genes que estimulam a proliferação celular, além de interagir com a proteína supressora tumoral p53, interferindo na sua capacidade de regular negativamente a proliferação celular (Haruna, 1991).

Nos pacientes infectados pelo HBV podem ser identificados anticorpos contra estas proteínas virais (anti-HBs, anti-HBc e anti-HBe). A interpretação da fase clínica da doença é baseada na análise destes marcadores (antígenos e anticorpos) (Lin, 2004).

Figura 5 – Vírus da hepatite B



FONTE: LIN (2004)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver uma plataforma sensora de eletrodo impresso para imunossensor.

3.2 Objetivos Específicos

- Construir eletrodo impresso (com NTC e CoPc) e modificá-lo (com PPI) para obtenção de plataforma sensora;
- Caracterizar superfície sensora por técnicas eletroquímicas e microscópicas;
- Imobilizar o antígeno sobre a plataforma sensora do eletrodo impresso de tinta de carbono;
- Verificar a resposta sensora frente a anticorpos anti HBc.

4 METODOLOGIA

4.1 Reagentes

Tinta de carbono, ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$), ferrocianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$), dimetilformamida (DMF), as ftalocianina de cobalto (CoPc) com grau de pureza de 97%, EDC (*1-Ethyl-3-(3-dimethyl amino propyl)-carbodiimide*) e NHS (N-Hydroxy succinimide), Albumina sérica bovina (BSA – do inglês “*bovine serum albumin*”) e os monômeros do pirrol (Pi) com grau de pureza de 98% foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados com grupos carboxílicos (NTCs-COOH), grau de pureza de 95%, comprimento médio de 1,5 μm e diâmetro aproximado de 10 nm, foram obtidos da Dropsens (ESP). Antígeno e anticorpos contra o nucleocapsídeo da Hepatite B (HBcAg) e (anti-HBc) foram adquiridos Abcam (Cambridge, UK).

O tampão fosfato salino (PBS) (0,01 M; pH 7,4) foi utilizado para todas as diluições usadas nas amostras biológicas. Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada ultrapura obtida através de sistema Millipore Milli-Q® (EUA) com resistividade maior que 18 M Ω .cm. Os reagentes químicos utilizados em todos os experimentos foram de grau analítico.

4.2 Equipamentos

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Metrohm- Autolab®4.9 (*Utrecht- theNetherlands*), acoplado a um computador com o programa GPES 4.9 para controle de potencial, aquisição e tratamento de dados. Para as análises eletroquímicas, foi utilizado um sistema tri-eletródico composto por um eletrodo impresso de tinta de carbono com o eletrodo de trabalho, um eletrodo de fio helicoidal de platina como eletrodo auxiliar e um eletrodo Ag/AgCl(KCl_{sat}), como eletrodo de referência. Todos os experimentos foram realizados em uma célula eletroquímica com volume de 15 mL, à temperatura ambiente (25°C). Os dados para construção dos gráficos e

levantamento das curvas analíticas foram processados pelo *software* OriginLabTM, versão 8.0.

4.3 Confeção do eletrodo impresso modificado com CoPc

4.3.1 Obtenção da tinta de carbono modificada com NTC –COOH

Inicialmente, 1 mg NTC-COOH foi disperso em uma solução de 5 mL de DMF. Esta solução foi agitada em banho ultrassônico durante 1 hora. Após este procedimento, 100 µl da dispersão de NTC-COOH foram adicionados a 300 mg de tinta de carbono, segundo metodologia otimizada previamente no nosso laboratório (DIAS et al. 2013).

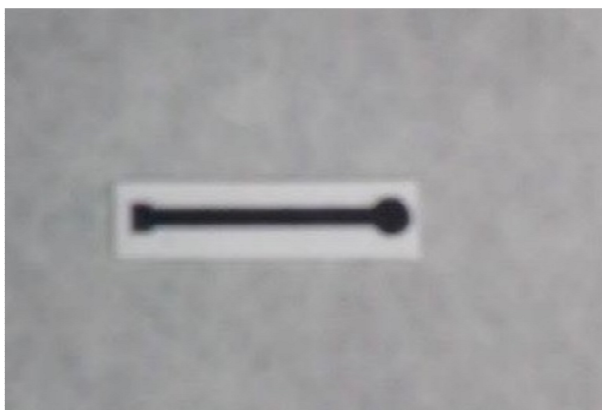
4.3.2 Preparo do eletrodo impresso modificado com CoPc

Considerando que a quantidade de CoPc acrescida à tinta de carbono afeta as propriedades eletroanalíticas do eletrodo, diferentes concentrações de CoPc foram testadas.

Após a homogeneização manual da mistura de tinta de carbono com NTC-COOH por 30 minutos, uma quantidade adequada de CoPc foi incorporada à tinta nanoestruturada. Em seguida, a tinta produzida foi aplicada com auxílio de uma espátula sobre um substrato retangular (0,5 x 1,5 cm) de polivinil tereftalato (PVC). Sobre o PET foi colado um adesivo (molde) contendo o formato do eletrodo de trabalho (figura 6). Após a impressão, o eletrodo confeccionado foi levado para estufa a 40 °C por 30 minutos para secagem.

Diferentes percentuais (p/p%) de CoPc misturados à tinta nanoestruturada foram testados de modo a obter melhor resposta eletrocatalítica. Esta foi otimizada a partir da análise das amplitudes de correntes dos picos anódicos (I_{pa}) e picos catódicos (I_{pc}) obtidos pela técnica de voltametria cíclica (VC).

Figura 6 - Imagem do eletrodo modificado com tinta de carbono



Fonte: LEITE, Diego Ricardo da Silva (2015)

4.3.3 Eletrodeposição do filme de Polipirrol (PPI)

O filme de PPI foi obtido por eletropolimerização utilizando a técnica de cronoamperometria (CA). Uma solução aquosa contendo 0,1 M de monômeros de Pi foi misturada [1:1] a 0,1 M em H_2SO_4 . O EI previamente limpo foi imerso em uma célula eletroquímica (10 mL) e submetido a um potencial 0,8 V durante 80 segundos em CA.

Para limpeza, os EI (eletrodos impressos) foram submetidos a um procedimento eletroquímico que constou de realização de voltametria cíclica, em solução de KCl a 1 M, com potenciais de -2 V a 2 V e velocidade de 100mV/s com 40 ciclos.

Com objetivo de investigar a contribuição do filme de PPI, um estudo paralelo foi realizado utilizando a metodologia camada por camada, onde o Pi foi inicialmente eletropolimerizado e posteriormente os NTC dispersos foram adsorvidos sobre a superfície do eletrodo impresso.

4.4 Imobilização do HBc-Ag e resposta analítica do imunossensor

Após a modificação da superfície sensora, 5 µl de HBc-Ag (100 µg/ml) foram depositados na superfície do EI modificado, mantida em repouso por 1 hora em câmara úmida à temperatura ambiente. Após esse período, foram realizadas análises por voltametrias cíclicas e de onda quadrada. 5µl de uma solução de BSA (1:1) foi depositada sobre a superfície com o antígeno imobilizado para bloqueio de ligações inespecíficas, por 30 minutos. Após a caracterização da etapa, 5µl de anti-HBc (1ng/ml) foi depositado na superfície para análise da reação antígeno-anticorpo.

4.5 Análise Morfológica da Superfície eletródica

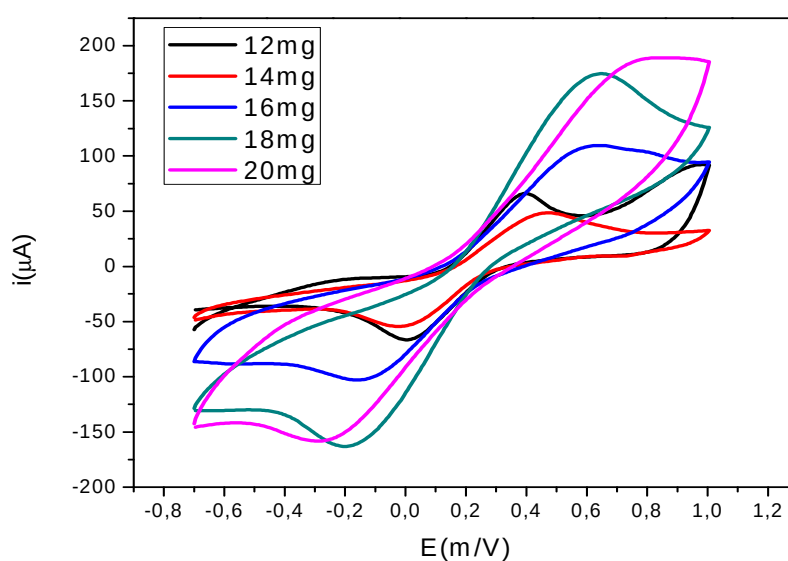
Para análise morfológica da superfície sensora, o EI foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). O microscópio utilizado foi o modelo *SS-550 superscan*, (*Shimadzu*,) instalado no Departamento de Química Fundamental (DQF) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Para as micrografias, os eletrodos impressos em PET foram fixados em porta amostra utilizando fita de carbono e em seguida foram metalizados com ouro.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização da concentração de CoPc na tinta de impressão

Devido às ftalocianinas apresentarem atividade eletrocatalítica e funcionarem como um catalisador redox das reações químicas influenciando na resposta eletroanalítica, um dos primeiros estudos realizados foi otimizar sua quantidade para obtenção de uma melhor resposta amperométrica. Aqui, foi avaliada a influência da quantidade de CoPc sobre a corrente e potencial de pico, utilizando o eletrodo impresso de tinta de carbono contendo nanotubos de carbono como eletrodo de trabalho e como método eletroquímico a voltametria cíclica (figura 7).

Figura 7- Influência da quantidade de CoPc sobre a tinta de carbono, em suas diferentes concentrações. Os VC foram C obtidos em célula eletroquímica usando 5 mM de $K_4[Fe(CN)_6]$ / $(K_3[Fe(CN)_6])$ como eletrólito suporte, velocidade de varredura de 100 mV/s.



Fonte: LEITE, Diego Ricardo da Silva (2015)

Observando-se a tabela 1, verifica-se que os picos redoxes apresentam comportamento de quase reversibilidade. De acordo com as variações I_{pa}/I_{pc} , a concentração de 6% apresenta-se como a melhor em relação às demais pesquisadas baseadas nas condições de melhor reversibilidade (Bard, 1988). Desta forma, optou-se por trabalhar com concentrações próximas a 6% de CoPc.

Tabela 1 - Variação dos picos anódicos e catódicos em função da concentração de CoCp e sua relação I_{pa}/I_{pc} .

CoPc (%) (p/p)	I_{pa}	I_{pc}	I_{pa}/I_{pc}
4,00	61,90	66,69	0,93
4,67	46,42	54,15	0,86
5,33	109,87	102,96	1,05
6,00	171,60	169,89	1,01
6,67	188,77	157,50	1,19

Fonte: LEITE, Diego Ricardo da Silva (2015)

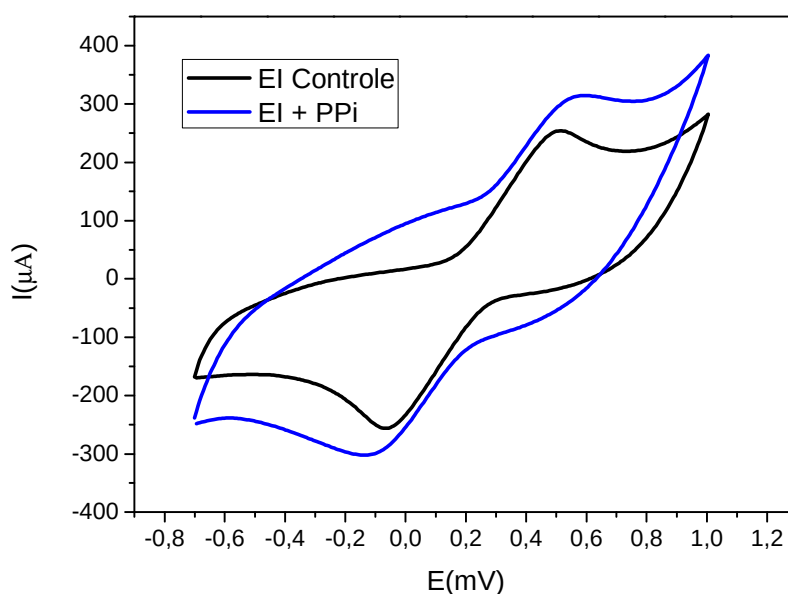
De acordo com a metodologia apresentada, tem-se que a composição em massa da tinta modificada produzida é cerca de: 94,5% de tinta de carbono comercial, 0,0063% de nanotubos de carbono e 5,5% de CoPc.

O percentual de NTC-COOH e CoPc utilizado são baixos, comparados ao percentual da tinta de carbono, indicando que a produção em escala deste eletrodo impresso é economicamente viável já que são os de mais altos custos.

O filme de polipirrol (PPI) na plataforma sensora, foi obtido por eletropolimerização utilizando ensaios de cronoamperometria. Os eletrodos limpos foram submetidos a medidas de potencial fixo 0,8 V durante 80 segundos. A avaliação do processo de eletropolimerização foi realizada pela técnica de voltametria cíclica com faixa de potencial de -0,7 V a 0,7 V em $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (0,005 M), com velocidade de varredura de 100 mV/s. As áreas eletroativas do eletrodo modificado em relação ao eletrodo limpo apresentaram aumento significativo, o que indica um aumento na transferência

eletrônica demonstrando que a eletropolimerização do PPI foi eficaz (figura 8), em virtude do polímero utilizado apresentar caráter condutor.

Figura 8 - Voltamograma cíclicos mostrando (1) em preto, EI controle após a limpeza e (2) VC em azul, EI com filme de PPI. Os VC foram obtidos em célula eletroquímica usando 5 mM de $K_4[Fe(CN)_6]$ / $(K_3[Fe(CN)_6])$ como eletrólito suporte, velocidade de varredura de 100 mV/s.



Fonte: LEITE, Diego Ricardo da Silva (2015)

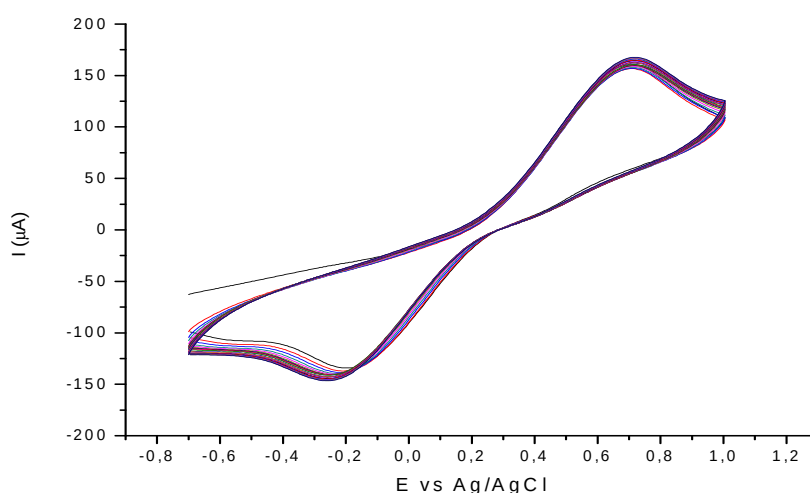
O aumento da área pode ser correlacionado com a oxidação do monômero de PPI e interação deste com os NTC-COOH presentes. Neste processo, acredita-se que a carga aniônica do PPI oxidado é equilibrada pela interação com os grupos carboxílicos dos nanotubos (TAM & HIEU, 2011).

5.1.1 Estudo de estabilidade do filme de PPI

A estabilidade do filme de PPI sobre a superfície sensora foi estudada submetendo-se o eletrodo impresso modificado à voltametria cíclica em duas etapas: 20 ciclos sucessivos com velocidade de varredura fixa (100 mV/s) e

variações de velocidade que foram de 10 a 120 mV/s. Os voltamogramas obtidos para os 20 ciclos estudados não apresentaram deslocamentos significativos de I_{pa} e I_{pc} nem dos potenciais de oxidação e redução, indicando que o filme apresenta estabilidade como pode ser visto na figura 9. O coeficiente de variação (CV) também foi calculado. O valor obtido tanto para I_{pa} quanto para I_{pc} foi de 1%. Estes valores estão dentro do valor ótimo citado na literatura ($CV \leq 5$) (Dias et al., 2013). Assim, o filme de PPI sobre o EI modificado com NTCs-COOH e CoPc é estável do ponto de vista eletroquímico.

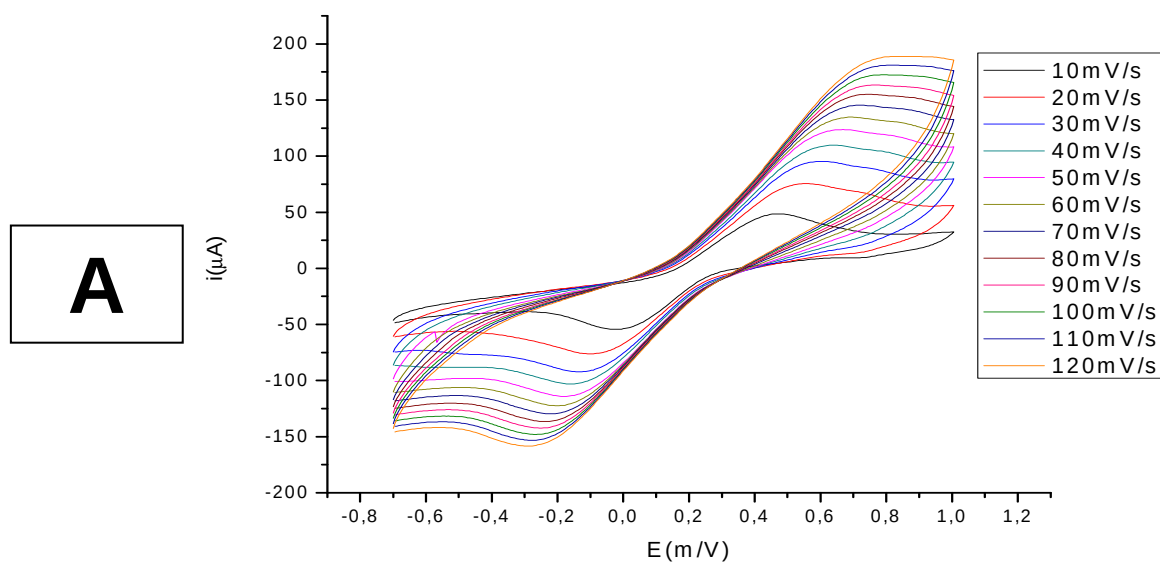
Figura 9 – VC consecutivos registrados em 20 ciclos a uma velocidade de varredura de 100 mV/s em solução de $K_4[Fe(CN)_6]$ / $(K_3[Fe(CN)_6])$.



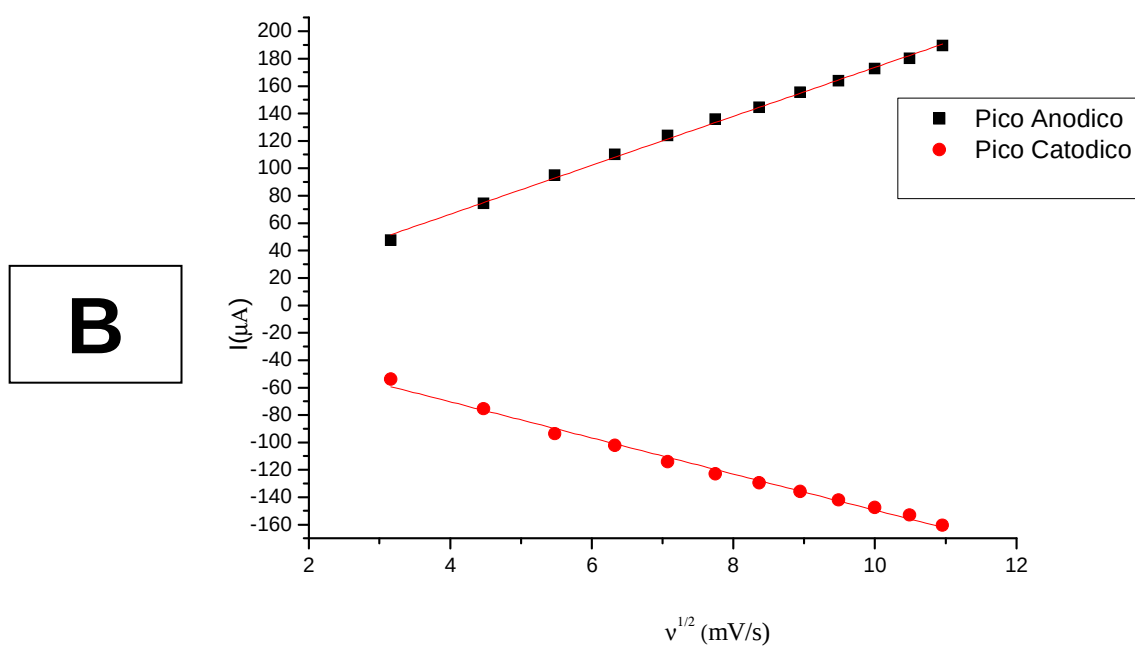
Fonte: LEITE, Diego Ricardo da Silva (2015)

As reações eletroquímicas ocorridas na interface eletrodo-eletrólito dependem do potencial de eletrodo que a superfície está submetida. Nesse trabalho foi realizado o estudo do comportamento eletroquímico do polímero sobre a superfície de carbono nanoestruturado. Para tal, variou-se as velocidades de varredura de 10 a 120 mV/s sobre o sistema e obteve-se os VCs (figura 10 A).

Figura 10 – (A) VC sob diferentes velocidades de varredura aumentando de 10 a 120mV/s do mais interno ao mais externo em solução de $K_4[Fe(CN)_6]$ / $(K_3[Fe(CN)_6])$. (B) Curvas de I_{pa} e I_{pc} em função da raiz quadrada da velocidade de varredura em solução de $K_4[Fe(CN)_6]$ / $(K_3[Fe(CN)_6])$.



Fonte: LEITE, Diego Ricardo da Silva (2015)



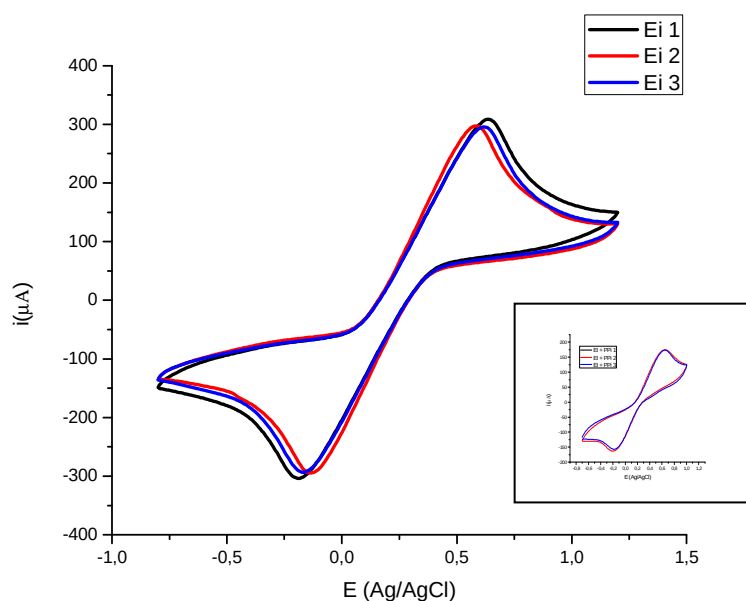
Fonte: LEITE, Diego Ricardo da Silva (2015)

Analisando-se as variações dos picos anódicos e catódicos em função da raiz quadrada de velocidade de varredura, observou-se que as duas curvas obtidas foram lineares, com coeficiente de variação para as correntes de pico de 0,01% e 0,1% respectivamente (anódico e catódico), demonstrando que o processo eletroquímico é controlado por difusão. Adicionalmente, observou-se que o crescimento dos picos anódicos e catódicos foram proporcionais entre si, indicando que o sistema filme-eletrodo mostrou comportamento reversível (figura 10 B).

5.1.2 Estudos de reprodutibilidade

O estudo de reprodutibilidade foi realizado avaliando-se em triplicata eletrodos diferentes, na mesma faixa potencial (figura 11). Para analisar a reprodutibilidade do EI sem o filme de PPI, bem como dos EI contendo o filme de PPI os coeficientes de variação para as correntes dos picos anódicos e catódicos foram calculados (tabela 2).

Figura 11 - Estudo de reprodutibilidade: Voltamogramas dos eletrodos não modificado com o filme de PPI e voltamogramas do eletrodo modificado com o filme de PPI.



Fonte: LEITE, Diego Ricardo da Silva (2015)

Tabela 2 - Análise estatística da reprodutibilidade em função dos picos anódicos e catódicos dos EI sem PPI e EI com PPI.

Eletrodo	M Ipa	M Ipc	DP Ipa	DP Ipc	CV Ipa	CV Ipc
EI sem PPI	297,26	298,41	4,434	3,550	3,2%	3,2%
EI com PPI	356,56	358,15	0,055	0,034	2%	2%

Fonte: LEITE, Diego Ricardo da Silva (2015). M Ipa (média do pico anódico), M Ipc (média do pico catódico), DP Ipa (desvio padrão do pico anódico), DP Ipc (média de desvio padrão do pico catódico), CV Ipa (coeficiente do pico anódico), CV Ipc (coeficiente do catódico).

Para o EI com o filme de PPI o coeficiente de variação tanto para Ipa quanto para Ipc foi 2%, enquanto que para o EI sem o filme de PPI o coeficiente de variação foi 3,2% para Ipa e Ipc. Estes valores estão dentro do limite considerável adequado na literatura ($CV \leq 5,0$).

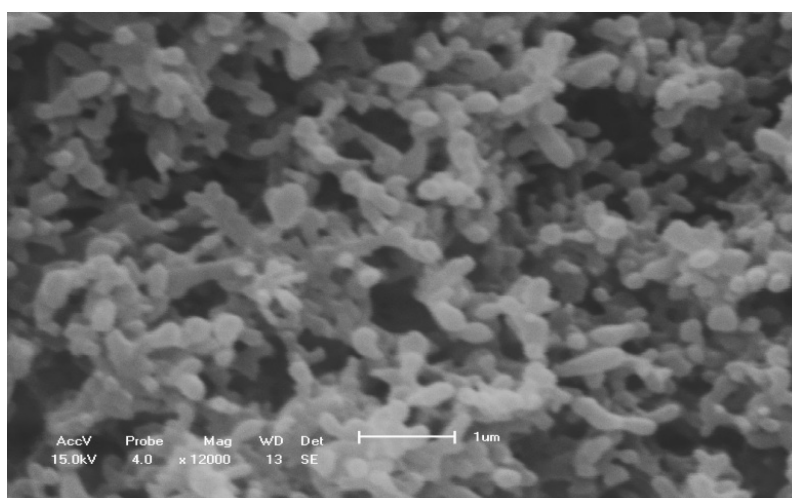
Com os dados supracitados confirma-se que há uma boa reprodutibilidade dos eletrodos, sobretudo pós-inserção do filme de PPI. Assim confirmou-se também uma boa estabilidade depois que os eletrodos foram submetidos à eletropolimerização para obtenção do filme de PPI.

5.2 Análise Morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens obtidas por MEV foram utilizadas para caracterização morfológica do filme de PPI na superfície do EI. Na figura 12 (A), observa-se a micrografia da superfície do EI com o filme de PPI recobrindo-a. É possível verificar que a síntese polimérica foi eficiente através da constatação da estrutura típica de filmes de PPI. Na figura 12 (B), observa-se pela micrografia da superfície que houve baixa produção de pirroles. Os pirroles são estruturas “enoveladas”, advindas de defeitos na formação dos polímeros ou má distribuição dos monômeros do PPI, tais estruturas geram uma diminuição da capacidade de condução de elétrons pela plataforma sensora (JAKAB, 2007).

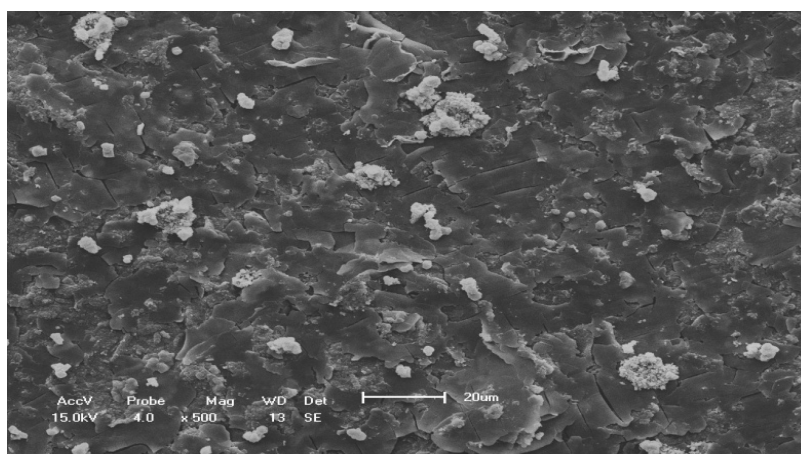
Figura 12 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura.

A



Fonte: LEITE, Diego Ricardo da Silva (2015). Imagem de MEV com resolução de 12000X o aumento da superfície

B



Fonte: LEITE, Diego Ricardo da Silva (2015). Imagem de MEV com resolução de 4000X o aumento da superfície

A baixa concentração de pirroles formados na superfície do filme de PPI, indica que o método de eletropolimerização aplicado neste trabalho é eficiente e corrobora com os resultados eletroquímicos obtidos, em que o filme de PPI apresenta propriedades condutoras desejáveis.

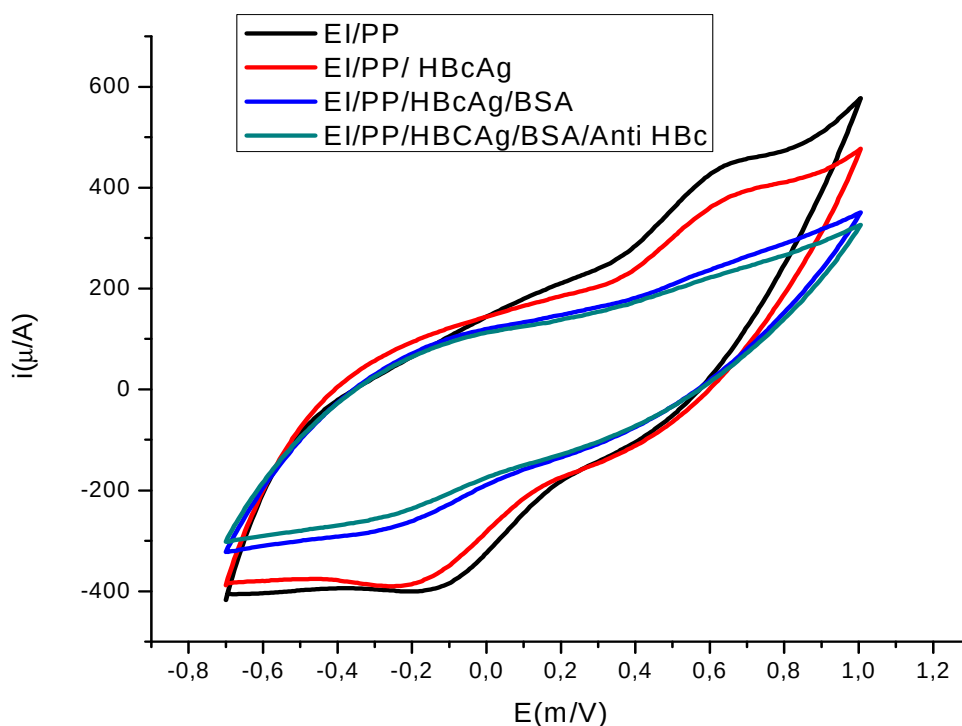
5.3 Imobilização do HBc-Ag

A utilização de polímeros condutores para modificação de superfícies eletródicas associadas com nanotubos de carbono funcionalizados tem sido bem relatada; os sensores produzidos com essa associação apresentam melhor desempenho analítico em relação aos que são produzidos apenas com a presença do polímero (Yáñez-Sedeño et.al. 2010).

A ativação dos nanotubos de carbono com EDC e NHS por 1 hora, promove a ligação amida dos grupos carboxílicos dos NTC com os grupos aminas contidas na cauda de histidina dos HBcAgs permitindo imobilização estável da biomolécula de interesse.

No que concerne a esse trabalho, a molécula imobilizada foi o antígeno HBcAg para captura dos antígenos anti-HBc. Após imobilização do HBcAg, foi realizado um bloqueio de ligações não específicas, incubando-se o eletrodo em uma solução de BSA (0,1% p/v) por uma hora. Para imobilização do HBc-Ag à detecção do Anti-HBc, observou-se decréscimo sucessivo da área eletroativa em relação aos voltamogramas do eletrodo modificado, devido a natureza isolante das biomoléculas (HBcAg, BSA e anti-HBc). Evento explicado pela contínua deposição de material na superfície sensora, visto que estes dificultam a transferência eletrônica (figura 13).

Figura 13 – VC das áreas eletroativas das etapas do imunossensor, mostrando sucessivos decréscimos da área eletroativa. Os eletrodos foram submetidos a velocidade de varredura de 100 mV/s em sonda redox de $K_4[Fe(CN)_6]$ / ($K_3[Fe(CN)_6]$).

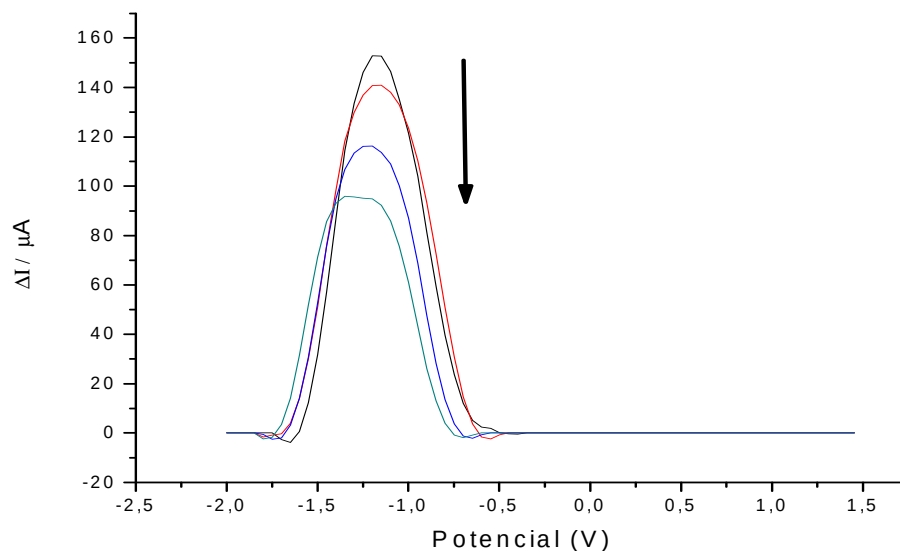


Fonte: LEITE, Diego Ricardo da Silva (2015)

5.4 Resposta do Imunossensor

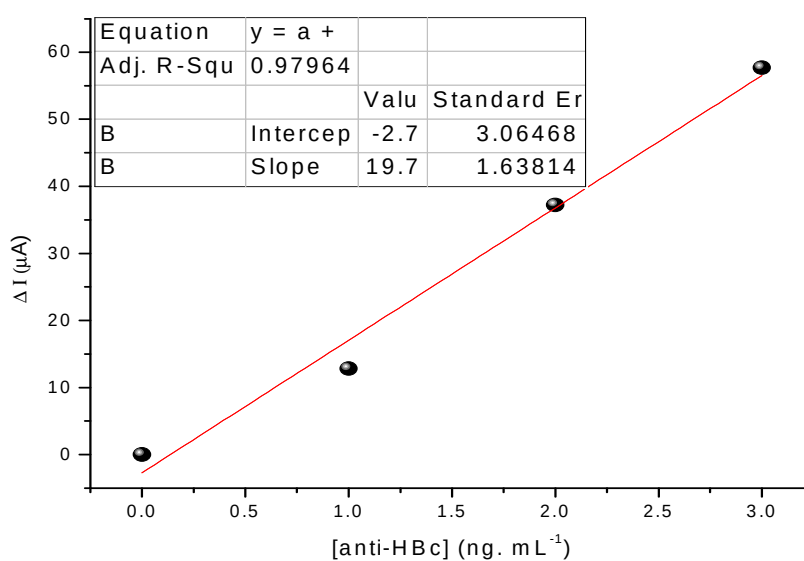
Para verificar a eficácia da resposta analítica do imunossensor, este foi desafiado com amostras de anti-HBc nas concentrações de 1 ng/mL preparadas em tampão PBS incubados sucessivamente por 30 minutos em uma câmara úmida à temperatura ambiente. As medidas de VOQ com variações dos picos de amplitude mostram diferenças significativas após as sucessivas incubações (Figura 14 A). Foi obtida uma resposta linear proporcional às concentrações de anti-HBc (figura 14 B), cuja equação foi “[I(μA)] = - 2,7 + 19,7 [anti-HBc (ng/mL)]”, alcançando um coeficiente de correlação de 0,984 (n=4; p<0,05).

Figura 14 – (A) VOQ das respostas analíticas do imunossensor ao anti HBc. A indicação das setas mostra a direção das sucessivas incubações com decaimento de corrente (1 a 3).



Fonte: LEITE, Diego Ricardo da Silva (2015)

Figura 14 – (B) Ajuste linear da resposta de corrente de pico anódico das VOQ em relação à concentração de anti HBc (ng/mL).



Fonte: LEITE, Diego Ricardo da Silva (2015)

Este resultado mostra que o imunossensor desenvolvido apresenta sensibilidade diagnóstica na ordem de ng/mL, mostrando ser útil na detecção sorológica de anti-HBc, visto que os níveis dos anticorpos em soro para HBV encontram-se na mesma ordem de grandeza da sensibilidade imunossensora, assim não necessitando de pré-tratamento (concentração ou diluição) das amostras, o que é vantagem para uma proposta *point-of-care*. Entretanto, para aplicação do sistema proposto para detecção em rotina clínica, mais estudos precisam ser realizados e outras substâncias antagonistas precisam ser testadas para melhor padronização dos ensaios.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Diante dos resultados apresentados pode-se concluir que:

- 1) O percentual de 6% de ftlaocianina de cobalto sobre a tinta condutora (contendo nanotubos de carbono carboxilados) foi a ideal em comparação as demais estudadas (4%, 4,6%, 5,3% e 6,67%);
- 2) A plataforma sensora nanoestruturada baseada em filme de PPI apresentou uma boa estabilidade e reprodutibilidade eletroquímica, com CVs para I_{pa} e I_{pc} dentro do valor ideal citado na literatura ($\leq 5\%$), bem como os DP para I_{pa} e I_{pc} respectivamente $\leq 5,5$ (valores referidos na literatura);
- 3) Com a imobilização com HBcAg à superfície sensora, foi possível detectar anti-HBc na ordem de ng/mL. Esta plataforma sensora apresenta-se promissora para aplicação em imunossensor livre de marcação, constituindo-se num método sensível, simples e pouco custoso.

Como perspectivas, pretende-se realizar mais estudos para melhor padronização da plataforma sensora e do filme de PPI para amostras complexas em soro, sangue e outros fluidos biológicos, bem como aplicar o imunossensor para detecção de antígenos de superfície para aumentar a especificidade do diagnóstico da infecção por HBc.

REFERÊNCIAS

ALBERTI A, CAVALLETTO D, CHEMELLO L, BELUSSI F, FATTOVICH G, PONTISSO P, et al. Fine specificity of human antibody response to the Pre S1 domain of hepatitis B virus. **Hepatology**. pag 199-203.1990.

ALCÂNTARA, M. M. **Tese de Mestrado**, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, 2004.

ARYA, S. K., SINGH, S. P., MALHOTRA, B. D., Electrochemical Techniques in Biosensors, **Handbook of Biosensors and Biochips**, cap. 22, New Delhi, Índia, Jhon Wiley & Sons, Ltd., 2007.

BAUGHMAN, R. H., ZAKHIDOV, A. A. & DE HEER, W. A. Carbon nanotubes – the route toward applications. **Science**, 297: 787, 2002.

BRUCKNER-LEA, C.J. Biosensor Systems for Homeland Security, **Interface**, vol13, pag. 36-41, 2004.

CAI, J., CIZEK, K., MCAFERTY, K., CAMPBELL, C. G., ALLEE, D.R., VOGT, B. D., LA BELLE, J., WANG, J. Flexible Thick-Film Electrochemical Sensors: Impact of Mechanic Bending and Stress on The Electrochemical Behavior. **Sensors and Actuators B Chemical**, pag. 379-385, 2009.

CHIANG, I. W., BRINSON, B. E., HUANG, A. Y., WILLIS, P. A., BRONIKOWSKI, M. J., MARGRAVE, J. L., SMALLEY, R. E. & HAUGE, R. H. Purification and characterization of single-wall carbon nanotubes (SWNTs) obtained from the gas-phase decomposition of CO (HiPco process). **Journal Physic and Chemical. B**, vol.105, pag. 8297, 2001.

DIAS, A. C. M. S. et al. A sensor tip based on carbon nanotube-ink printed electrode for the dengue virus NS1 protein. **Biosensors and Bioelectronics**, v.44, pag. 216-221, 2013.

FRADEN, J. Handbook of Modern Sensors-Physics. Designs and Applications. **Springer-Verlag**, New York, 3 ed, 2004.

GERARD, M., CHAUBEY, A. MALHORTA, B. D. **Biosensor and Bioelectronic**. vol. 17, pag. 345. 2002.

HARUNA, Y., HAYASHI, N., KATAYAMA K., YUKI N., KASAHARA A., SASAKI Y., et al. Expression of X protein and hepatitis B virus replication in chronic hepatitis. **Hepatology**. vol.13, pag. 417-421, 1991.

HONEY CHURCH, K. C., HART, J. P. Screen-printed electrochemical sensors for monitoring metal pollutants. **Trends Analogy Chemical.**, Amsterdam, vol. 22, pag. 456-469, 2013.

HONEY CHURCH, K. C., HAWKINS, D. M., HART, J. P., COWELL, D. C. Voltammetric behavior and trace determination of copper at a mercury-free screenprinted carbon electrode. **Talanta**, Amsterdam, vol 57, pag 565–574, 2012.

HONEY CHURCH, K. C., HART, J. P., COWELL, D. C., ARRIGAN, D. W. M. Voltammetric studies of lead at calixarene modified screen-printed carbon electrodes and its trace determination in water by stripping voltammetry. **Sensors Actuators B**, Lausanne, vol 77, pag. 642-652, 2011.

HONEY CHURCH, K. C., HART, J. P., KIRSCH, N. Voltammetric, chromatographic and mass spectral elucidation of the redox reactions of 1-hydroxypyrene occurring at a screen-printed carbon electrode. **Electrochimical Acta**, Oxford, vol. 49, p. 1141–1149, 2014.

JAKAB, E., MÉSZÁROS, E., OMASTOVÁ, M. Thermal decomposition of polypyrroles. **Journal of Thermal Analysis & Calorimetry**; Vol. 88, pag. 515. 2007.

JANG J., NAM Y., YOON H.: Fabrication of polypyrrole–poly (N-vinylcarbazole) core–shell nanoparticles with excellent electrical and optical properties. **Advanced Materials**, 17, 1382–1386, 2005.

KURAI K, IINO S, KOIKE K, MITAMURA K, ENDO Y, OKA H. Serum titers of pre-S(2) antigen in patients with acute and chronic type B hepatitis: relation to serum aminotransferase activity and other hepatitis B virus markers. **Hepatology**. vol. 2, pag. 175-179, 1989.

LASCHI, S., PALCHETTI, I., MASCINI, M. Gold-based screen-printed sensor for detection of trace lead. **Sensors Actuators B**, Lausanne, vol. 114, pag. 460–465, 2014.

LEE W. M. Hepatitis B virus infection. **England Journal Medicine**. vol. 24, 1733-1745, 1997.

LEI, Y., CHEN, W., MULCHANDANI, A.; **Analitic Chimical Acta**. 568, 200, 2006.

LIN K. W., KIRCHNER J.T. Hepatitis B. **Am Physician**. vol. 69(1):pag. 75-82, 2004.

LIDA, V. H., SILVA, T. J. A., SILVA, A. S. F., SILVA, L. F. F., ALVES, V. A. F., **Jornal Brasileiro de Patologia Médica**. vol. 41, pag. 29, 2005.

LIMA, R. S., NUNES, G. S., NOGUER, T., et al. Biossensor Enzimático para Detecção de Fungicidas Ditiocarbamatos. Estudo Cinético da Enzima Aldeído Desidrogenase e Otimização do Biossensor. **Química Nova**, vol. 30, pag. 9-17, 2007.

LIU, M., WEN, Y., LI, D., et al., A Stable Sandwich-Type Amperometric Biosensor based on Poly (3,4-ethylenedioxythiophene) – Single Walled Carbon Nanotubes/ ascorbate Oxidase/ Nafion Films for Detection of L-ascorbic Acid; **Sensors and Actuators: Chemical**, vol. 159, pag. 277-285, 2011.

LOK A. S., MCMAHON B. J. Chronic hepatitis B. **Hepatology**. vol. 6, pag. 1225-1241, 2011.

LOWE, C. R. Overview of Biosensor and Bioarray Technologies. **Handbook of Biosensors and Biochips**, cap. 1, New Delhi, India, John Wiley & Sons, Ltd., 2007.

MASAWAT, P., LIARUANGRATH, S., SLATER, J. M. Flow injection measurement of lead using mercury-free disposable gold-sputtered screen-printed carbon electrodes (SPCE). **Sensors Actuators B**, Lausanne, vol. 91, pag. 52–59, 2013.

MASHETER, A. T., ABIMAN, P., WILDGOOSE, G. G., WONG, E., XIAO, L., REES, N. V., TAYLOR, R., ATTARD, G. A., GARY, A., BARON, R., CROSSLEY, A., JONES, J. H.. Investigating the reactive sites and the anomalously large changes in surface pKa values of chemically modified carbon nanotubes of different morphologies. **Journal of Material and Chemical**, vol. 17:pag. 2616, 2007.

MERKOÇI, A., PUMERA, M., LLOPIS, X., PÉREZ; B., DEL VALLE. New materials for electrochemical sensing VI: Carbon nanotubes. **Trends in Analytical Chemistry**, vol. 24 pag. 826, 2005.

METTERS, J.P., KADARA, R.O., BANKS, C.E. New directions in screen printed electroanalytical sensors: an overview of recent developments. **Analyst**, 139: 1067-76, 2011.

MILLER, R.H., KANEKO, S, CHUNG, C.T., GIRONES, R., PURCELL, R.H. Compact organization of the hepatitis B virus genome. **Hepatology**. pag. 322-327, 1989.

MOZAZ, S. R, MARCO, M. P., ALDA, M. J. L., BARCELÓ, D. **Pure Application Chemical**. vol. 76, pag. 723, 2004.

NEWMAN, J. D. , TURNER, A. P. F. , Historical Perspective of Biosensor and Biochip Development., **Handbook of Biosensors and Biochips**, cap. 3, New Delhi, Índia, Jhon Wiley & Sons, 2007.

PARRA V., DOBULANS, R., FONAVALS, E., LATVELS, J.; BOUVET M. A Novel Gas Sensor Transducer Based on Phthalocyanine Heterojunction Devices. **Sensors**, 2007.

PEREIRA, A.C.; SANTOS, A.S.; KUBOTA, L.T. Tendências em modificações de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, vol. 25, pag.1012-1021, 2002.

PETIT M.A., ZOULIM F., CAPEL F., DUBANCHET S., DAUGUET C., TREPO C. Variable expression of preS1 antigen in serum during chronic hepatitis B virus infection: na accurate marker for the level of hepatitis B virus replication. **Hepatology**. vol. 11, pag 809-14, 1990.

PUNBUSAYAKUL, N., TALAPATRA, S., CI, L., SURAREUNGCHAI, W. Double-walled carbon nanotube electrodes for electrochemical sensing. **Electrochemical and Solid-State Lett.**, vol. 10, n. 13, 2013.

NASCIMENTO, R. F., SELVA, T. M. G., RIBEIRO, W. F., BELIAN, M. F., ANGNES, L., NASCIMENTO V. B. Flow-injection electrochemical determination of citric acid using a cobalt(II)–phthalocyanine modified carbon paste electrode. **Talanta**, vol. 105, pag. 354–359. 2013.

REZAEI, B., MAJIDI, N., RAHMANI, H., KHAIAMIAN, T. Eletrochemical impedimetric immunosensor for insulin like growth factor-1 using specific

monoclonal antibody-nanogold modified electrode. **Biosensor and Bioelectronics**, vol. 26, pag. 2130-2134, 2011.

RICCARDI, C. S., COSTA, P. I., YAMANAKA, H. **Química Nova**, vol. 25, pag. 316-324, 2002.

RICHARDSON, BURNS; ENDRINCKS, S. M.; MARTIN, J. L..Eletrochemical Polymerization of conductin polymers in livin neural tissue. **Jounal Neural Engeenneer**, vol. 4, 2007.

RODRÍGUEZ-MÉNDEZ, APETREI, C. M. L., DE SAJA, J. A. **Electrochemical Acta**, vol. 56, 2011.

SACHER, R. A., SCHREIBER, G.B., KLEINMAN S.H. Prevention of transfusion-transmitted hepatitis. **Lancet**. vol. 29, pag 331-342, 2000.

SKOOG, D.A., HOLLER, E.J., CROUCH, S.R.Principles of Instrumental Analysis.**Thomson**, USA, 6 ed, 2007.

SKOOG, D.A., WEST, D.M., HOLLER, F.J. Fundamentals of Analytical Chemistry. **Saunder College Publishing**; Orlando, Flórida, EUA, 1996.

SLIMANE, A. B., CHEHIMI, M.M., VAULAY M. J. Polypyrrole-coated poly(vinyl chloride) powder particles: surface chemical and morphological characterisation by means of X-ray photoelectron spectroscopy and scanning electron microscopy. **Colloid and Polymer Science**, vol. 282, n. 4, pag. 314–323, 2004.

THEVENOT, D. R., TOTH, K., DURST, R. A., et al. Technical Report Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification , **Biosensors and Bioelectronics**, vol.16,n 1-2, pag.121-131, 2001.

TSAI, D., KUMAR, A. S., ZEN, J. A highly stable and sensitive chemically modified screen-printed electrode for sulfide analysis. **Analitic Chimical Acta**, Amsterdam, vol. 556, n. 1, pag. 145–150, 2015.

TSOUTI, V., BOUTOPOULOS, C., ZERGOTI, I., CHATZANDROULIS, S. Capacitive microsystem for biological sensing. **Biosensor and Bioeletronics**, vol. 27, pag. 1-11, 2011.

VENDRAME, Z.B. Eletrodos Modificados e não modificados na determinação de compostos sulfurados – um estudo comparativo. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Santa Maria, 183 p. 2004.

WANG, J. Nanomaterial based Electrochemical Biosensors. **The Analyst**, vol.130, n.4, pag. 421-426, 2005.

YÁÑEZ-SEDEÑO, P., PINGARRÓN, J.M. Electrochemical sensing based on carbon nanotubes. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, vol. 29, pag. 938-953, 2010.

ZHANG, X., CUI, Y., LV, Z., LI, M., MA, S., CUI, Z., KONG, Q. Carbon nanotubes, Conductive Carbon Black and Graphite powder based paste electrodes. **International Journal of Eletrochemical Science**, vol. 6, pag. 6063-6073, 2011.

ANEXO- Artigo



DESENVOLVIMENTO DE SENSOR IMPRESSO NANOESTRUTURADO MODIFICADO COM FTALOCIANINA DE COBALTO PARA APLICAÇÃO EM IMUNOSSENSORES

Diego Ricardo da Silva Leite¹, Rosa Amália Fireman Dutra²

¹Mestrando em Engenharia Biomédica pela Universidade Federal de Pernambuco

²Professora Doutora da Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Engenharia Biomédica

RESUMO

Atualmente, têm-se buscado métodos que viabilizem um diagnóstico eficaz, prático, rápido e de baixo custo na detecção de doenças que se revelem atrativos para os serviços de saúde pública. Nesse contexto, os imunossensores têm apresentado respostas promissoras, revelando-se como métodos analíticos práticos, rápidos e econômicos. Recentemente, a utilização de nanomateriais de alótropos de carbono, destacando-se os nanotubos de carbono (NTC), têm resultado em melhoria na sensibilidade por aumentar transferência eletrônica, sobretudo quando aliados a polímeros condutores. O objetivo deste trabalho foi desenvolver plataforma nanoestruturada para aplicação em imunossensores. Como objeto de estudo, foi detectado anticorpos contra o nucleocapsídeo do vírus da hepatite B (HBV), visto que este marcador é o mais importante no controle e vigilância de bolsas de sangue em serviços hemoterápicos. No presente trabalho, eletrodos de tinta de carbono serigrafados sobre substrato de polietileno tereftalato (PET) foram modificados por 0,0063% de nanotubos de carbono (NTC-COOH) e 6% em concentração de ftalocianina de cobalto (CoPc) que foram recobertos com filmes de polipirrol (PPI). O filme foi obtido por cronoamperometria (0,8V, 80s) usando soluções de 0,1 M de pirrol (Pi) em meio ácido. Foi observada uma boa reprodutibilidade e estabilidade dos eletrodos sobretudo pós-inserção do filme quando caracterizado eletroquimicamente. Além disso, as imagens de microscopia eletrônica mostraram uma baixa produção de pirroles. Os sensores desenvolvidos com a associação de nanotubos de carbono funcionalizados apresentaram melhor desempenho analítico em relação ao controle (sem NTC). A imobilização do antígeno do núcleo capsídeo da hepatite B (HBc-Ag) foi confirmada por decréscimo da área eletroativa dos voltamogramas cíclicos. A resposta aos anticorpos anti-HBc foi evidenciada por técnica de voltametria de onda quadrada, mostrando que a plataforma desenvolvida é promissora para aplicação em sensor para hepatite.

Palavras-chave: eletrodos impressos, nanotubos de carbono; polipirrol; imunossensor eletroquímico; hepatite B; ftalocianina de cobalto.

ABSTRACT

Currently, they have been sought methods that enable effective diagnosis, practical, fast and low-cost in detecting diseases that may prove attractive to public health services. In this context, immunosensors have shown promising responses, revealing himself as analytical methods of practical, fast and economical. Recently, the use of carbon allotropes of nanomaterials, highlighting carbon nanotubes (CNT), have resulted in improved sensitivity by increasing wire transfer, especially when combined with conductive polymers. The aim of this study was to develop nanostructured platform for immunosensors application. As study object was detected antibodies against the nucleocapsid of hepatitis B virus (HBV), as this marker is the most important in the control and surveillance of blood bags in haemotherapeutic services. In this study, carbon ink electrodes screen printed on the substrate polythene terephthalate (PET) have been modified for 0.0063% of carbon nanotubes (CNT-COOH) and 6% concentration of cobalt

phthalocyanine (CoPc) were coated with polypyrrole films (PPy). The film was obtained by chronoamperometry (0.8 V, 80 s) using 0.1 M solution of pyrrole (Py) in acidic. Was observed a good reproducibility and stability particularly after insertion of the film electrode when electrochemically characterized. Furthermore, electron microscopy images showed a low production pyrroles. The sensors developed in association with functionalized carbon nanotubes showed better analytical performance compared to the control (without NTC). The immobilization of the capsid antigen hepatitis B core (HBc-Ag) was confirmed by decreasing the area of the electroactive cyclic voltammograms. The response to anti-HBc antibody was evidenced by technical square wave voltammetry, showing that the platform is developed promising for application to sensor hepatitis.

Keywords: printed electrodes, carbon nanotubes; polypyrrole; electrochemical immunosensor; Hepatitis B; cobalt phthalocyanine.

INTRODUÇÃO

O termo biossensor, é empregado a dispositivos capazes de fornecer um sinal analítico usando um elemento de reconhecimento biológico o qual, está em contato direto com o elemento de transdução. Sendo o biossensor formado basicamente por dois elementos intimamente associados, que são: o componente biológico ou biorreceptor e o transdutor (THEVENOT *et al.*, 2001).

Os eletrodos, que são um dos elementos que constituem os biossensores, tem um papel fundamental, pois é sobre os mesmos ocorrem todos os processos de interface eletroquímica, imobilização de amostras biológicas e detecção de analitos – alvo (DIAS *et al.* 2013).

Eletrodos impressos (do inglês – “Screen-printed electrodes”) atualmente se revelam como uma alternativa de sucesso frente aos eletrodos convencionais, por apresentar vantagens como: serem sistemas mais simples, menores, compactos e descartáveis, gerando diminuição das etapas de limpeza entre as análises eletroquímicas, envenenamento da superfície e ofertando modos simples, viabilizando o desenvolvimento de sensores portáteis para aplicação diagnóstica em saúde (ZHANG, 2011; DIAS *et al.* 2013).

Além das variadas vantagens acima mencionadas, os eletrodos impressos (EI) suportam várias formas de modificação na sua superfície sensora. Nos últimos anos, a

introdução de nanomateriais e/ou reagentes específicos tem despertado o interesse para estudos de melhoria da sensibilidade e seletividade dos EI (TSOUTI, 2011; ZHANG, 2011).

A escolha do material para modificação do eletrodo é um aspecto fundamental para boa eficácia do imunossensor. Esta matriz deve apresentar características eletroquímicas apropriadas como alta taxa de transferência eletrônica e também ser adequado para o método de imobilização selecionado (REZAEI, 2011).

A importância da escolha do material do eletrodo de trabalho também se deve ao fato de que as respostas obtidas estão relacionadas com reações redox que ocorrem na superfície ou na interface eletrodo - solução. Desta maneira, o analito interage com a superfície eletródica, resultando em menos espécies iônicas presentes na amostra que são oxidadas ou reduzidas, resultando detecção de interação antígeno-anticorpo livre de interferências (GUIMARD, GOMEZ & SCHIMIDT, 2007).

A utilização de nanomateriais na elaboração de matrizes sensoras tem sido amplamente estudadas. Dentre os nanomateriais, os nanotubos de carbono são amplamente aplicados por apresentarem propriedades eletroquímicas que auxiliam na melhoria da condução da transferência eletrônica, na estabilidade e na interação entre o analito e a plataforma sensora. Os nanotubos de carbono são conceitualmente constituídos de folhas

de grafeno enroladas de formato cilíndrico com arranjos hexagonais de carbono, variando o tamanho de seu diâmetro de nanômetros a centímetros (BAUGHMAN, 2012; PUNBUSAYAKUL, 2013).

Na confecção de eletrodo modificado, a Ftalocianina de cobalto, tem mostrado gerar uma boa transferência de elétrons, e assim gerando, uma reação ainda mais eletrocatalíticas quando em contato com uma sonda redox não – tampão (NASCIMENTO, 2013).

As hepatites virais são causadas por vírus hepatotrópicos (A, B, C, D, E), e apresenta amplo espectro clínico, variando desde formas assintomáticas, anictéricas, ictericas típicas, até quadros de insuficiência hepática aguda grave (fulminante) (Lin, 2004).

Na maior parte dos casos as hepatites, mostram-se assintomáticas independentemente do tipo de vírus, quando apresenta sintomatologia, é caracterizada por fadiga, mal-estar, náuseas, dores abdominais, anorexia e icterícia. Quando atinge a cronicidade, em geral, decorre de quadro assintomático, com manifestações clínicas apenas nos estágios mais avançados da doença. O diagnóstico para hepatite viral inclui a realização de exames laboratoriais demorados, custosos e que requerem muitas etapas, a fim de caracterizar a doença e qual a sua gravidade (Lin, 2004).

A possibilidade de construção de sensores com características desejadas como sensibilidade e especificidade diagnóstica e reprodutibilidade controlada tem levado a possibilidade de construir imunossensores para aplicação em amostras reais como soro, sangue total, etc. Neste contexto, qualidade de custo-efetividade mostram que o diagnóstico da hepatite B no Brasil constitui-se em possibilidade analítica desejada.

Diante do exposto, este estudo teve por objetivo o desenvolvimento de uma plataforma sensora com características de rápida resposta,

baixo custo e facilidade de produção em larga escala.

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo experimental no qual se utilizou os reagentes: Tinta de carbono, ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$), ferrocianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$), dimetilformamida (DMF), as ftalocianina de cobalto (CoPc) com grau de pureza de 97%, EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethyl amino propyl)-carbodiimide) e NHS (N-Hydroxy succinimide), Albumina sérica bovina (BSA – do inglês “*bovine serum albumin*”) e os monômeros do pirrol (Pi) com grau de pureza de 98% foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados com grupos carboxílicos (NTCs-COOH), grau de pureza de 95%, comprimento médio de 1,5 μm e diâmetro aproximado de 10 nm, foram obtidos da Dropsens (ESP). Antígeno e anticorpos contra o nucleocapsídeo da hepatite B (HBcAg) e (anti-HBc) foram adquiridos Abcam (Cambridge, UK).

O tampão fosfato salino (PBS) (0,01 M; pH 7,4) foi utilizado para todas as diluições usadas nas amostras biológicas. Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada ultra pura obtida através de sistema Millipore Milli-Q® (EUA) com resistividade maior que 18 M Ω .cm. Os reagentes químicos utilizados em todos os experimentos foram de grau analítico.

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Metrohm- Autolab®4.9 (Utrecht- theNetherlands), acoplado a um computador com o programa GPES 4.9 para controle de potencial, aquisição e tratamento de dados. Para as análises eletroquímicas, foi utilizado um sistema tri-eletródico composto por um eletrodo impresso de tinta de carbono com o eletrodo de trabalho, um eletrodo de fio helicoidal de platina como eletrodo auxiliar e um eletrodo Ag/AgCl_(KCl sat), como eletrodo de referência. Todos os experimentos

foram realizados em uma célula eletroquímica com volume de 15 mL, e à temperatura ambiente (25°C). Os dados para construção dos gráficos e levantamento das curvas analíticas foram processados pelo *software* OriginLabTM, versão 8.0.

A obtenção da tinta de carbono modificada com NTC –COOH se deu da seguinte maneira: Inicialmente, 1 mg NTC-COOH foi disperso em uma solução de 5mL de DMF. Esta solução foi agitada em banho ultrassônico durante 1 hora. Após este procedimento, 100µl da dispersão de NTC-COOH foram adicionados a 300mg de tinta de carbono, segundo metodologia otimizada *previamente no nosso laboratório* (DIAS et al. 2013).

Quanto ao preparo do eletrodo impresso modificado com CoPc temos que considerando que a quantidade de CoPc acrescida à tinta de carbono afeta as propriedades eletroanalíticas do eletrodo, diferentes concentrações de CoPc foram testadas.

Após a homogeneização manual da mistura de tinta de carbono com NTC-COOH por 30 minutos, uma quantidade adequada de CoPc foi incorporada à tinta nanoestruturada.

Em seguida, a tinta produzida foi aplicada com auxílio de uma espátula sobre um substrato retangular (0,5 x 1,5 cm) de polivinil tereftalato (PVC). Sobre o PET foi colado um adesivo (molde) contendo o formato do eletrodo de trabalho (figura 1). Após a impressão, o eletrodo confeccionado foi levado para estufa a 40 °C por 30 minutos para secagem. Diferentes percentuais (p/p%) de CoPc misturados à tinta nanoestruturada foram testados de modo a obter melhor resposta eletrocatalítica. Esta foi otimizada a partir da análise das amplitudes de correntes dos picos anódicos (Ipa) e picos catódicos (Ipc) obtidos pela técnica de voltametria cíclica.

O filme de PPI foi obtido por eletropolimerização utilizando a técnica de cronoamperometria (CA). Uma solução aquosa contendo 0,1 M de monômeros de Pi foi misturada [1:1] a 0,1 M em H₂SO₄. O EI previamente

limpo foi imerso em uma célula eletroquímica (10 mL) e submetido a um potencial 0,8 V durante 80 segundos em cronoamperometria.

Para limpeza, os EI (eletrodos impressos) foram submetidos a um procedimento eletroquímico que constou de realização de voltametria cíclica, em solução de KCl a 1 M, com potenciais de -2 V a 2 V e velocidade de 100mV/s com 40 ciclos.

Com objetivo de investigar a contribuição do filme de PPI, um estudo paralelo foi realizado utilizando a metodologia camada por camada, onde o Pi foi inicialmente eletropolimerizado e posteriormente os NTC dispersos foram adsorvidos sobre a superfície do Eletrodo Impresso.

Sobre a imobilização do HBc-Ag e resposta analítica do imunossensor temos que Após a modificação da superfície sensora, 5 µl de HBc-Ag (100 µg/ml) foram depositados na superfície do EI modificado, mantida em repouso por 1 hora em câmara úmida à temperatura ambiente. Após esse período, foram realizadas análises por voltametrias cíclicas e de onda quadrada. 5µl de uma solução de BSA (1:1) foi depositada sobre a superfície com o antígeno imobilizado para bloqueio de ligações inespecíficas, por 30 minutos. Após a caracterização da etapa, 5 µl de anti-HBc (1ng/ml) foi depositado na superfície para análise da reação antígeno-anticorpo.

Para análise morfológica sensora, o EI foi submetido a micrografias por técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). O microscópio utilizado foi o modelo SS-550 *superscan*, (Shimadzu) que instalado no Departamento de Química Fundamental (DQF) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Para as micrografias, os eletrodos impressos em PET foram fixados em porta amostra utilizando fita de carbono e em seguida foram metalizados com ouro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto a Otimização da concentração de CoPc na tinta de

impressão observou-se que os picos redoxes apresentaram comportamento de quase reversibilidade. De acordo com as variações I_{pa}/I_{pc} , a concentração de 6% apresenta-se como a melhor em relação às demais pesquisadas baseadas nas condições de melhor reversibilidade. Desta forma optou-se por trabalhar com concentrações próximos de CoPc.

De acordo com a metodologia apresentada, tem-se que a composição em massa da tinta modificada produzida é cerca de: 94,5% de tinta de carbono comercial, 0,0063% de nanotubos de carbono e 5,5% de CoPc.

O percentual de NTC-COOH e CoPc utilizado são baixos, comparados ao percentual da tinta de carbono, indicando que a produção em escala deste eletrodo impresso é economicamente viável já que são os de mais altos custos.

A estabilidade do filme de PPI sobre a superfície sensora pode ser descrita por voltamogramas que indicaram em duas etapas (velocidade de varredura e variação de velocidades) desse estudo, que o filme apresenta estabilidade (figuras 2 e 3). O coeficiente de variação (CV) também foi calculado. Os valores mostraram para I_{pa} 1% e o I_{pc} foram 1%. Estes valores estão dentro do valor ótimo citado na literatura ($CV \leq 5$) (Dias et al., 2013). Assim, o filme de PPI sobre o EI modificado com NTC-COOH e CoPc é estável do ponto de vista eletroquímico.

O estudo de reprodutibilidade foi realizado avaliando-se em triplicata com eletrodos diferentes, na mesma faixa potencial. Para analisar a reprodutibilidade do EI sem o filme de PPI, bem como dos EI contendo o filme de PPI o coeficiente de variação foi calculado tanto para o eletrodo com PPI quanto para o eletrodo sem o PPI. Os valores mostrados foram que, com PPI o I_{pa} e o I_{pc} deram 2% respectivamente e os valores sem o filme de PPI resultaram 3,2%. Estes valores estão bem abaixo dentro do valor ótimo citado na literatura ($CV \leq 5,0$).

Com os dados supracitados confirma-se que há uma boa reprodutibilidade dos eletrodos, sobretudo pós-inserção do filme de PPI. Assim confirmou-se também uma boa estabilidade depois que os eletrodos receberam por eletropolimerização os polímeros de PPI.

A utilização de polímeros condutores para modificação de superfícies eletródicas associadas com nanotubos de carbono funcionalizados tem sido bem relatada; os sensores produzidos com essa associação apresentam melhor desempenho analítico em relação aos que são produzidos apenas com a presença do polímero (Yáñez-Sedeño et.al. 2010). A ativação dos nanotubos de carbono com EDC e NHS por 1 hora, promove a ligação amida dos grupos carboxílicos dos NTC com os grupos amins contidos na cauda de histidina dos HBC Ags permitindo imobilização estável da biomolécula de interesse. No que concerne a esse trabalho, a molécula imobilizada foi o antígeno HBC-Ag para captura dos antígenos anti-HBC. Após imobilização do HBC Ag, foi realizado um bloqueio de ligações não específicas, incubando-se o eletrodo com uma solução de BSA (0,1% p/v) por uma hora. Para imobilização do HBC-Ag à detecção do Anti-HBC, observou-se decréscimo sucessivo da área eletroativa em relação aos voltamogramas do eletrodo modificado, devido a natureza isolante das biomoléculas (HBC-Ag, BSA e anti-HBC). Evento explicado pela continua deposição de material na superfície sensora, visto que estes dificultam a transferência eletrônica (figura 4).

Para verificar a eficácia resposta analítica do imunossensor, este foi desafiado com amostras de anti-HBC nas concentrações de 1 ng/mL preparadas em tampão PBS incubados sucessivamente por 30 minutos em uma câmara úmida à temperatura ambiente. As medidas de VOQ com variações dos picos de amplitude mostram diferenças significativas após as sucessivas

incubações (figura 5). Foi obtida uma resposta linear proporcional às concentrações de anti-HBc, cuja equação foi $[I(\mu A)] = -2,7 + 19,7 [\text{anti-HBc (ng/mL)}]$, alcançando um coeficiente de correlação de 0,984 ($n=4$; $p<0,05$) (figura 6). Este resultado mostra que o imunossensor desenvolvido apresenta sensibilidade diagnóstica na ordem de ng/mL, mostrando ser útil na detecção sorológica de anti-HBc, visto que os níveis dos anticorpos em soro para HBV encontram-se na mesma ordem de grandeza da sensibilidade imunossensora, assim não necessitando de pré tratamento (concentração ou diluição) das amostras, o que é vantagem para uma proposta *point-of-care*. Entretanto, para aplicação do sistema proposto para detecção em rotina clínica, mais estudos precisam ser realizados e outras substâncias antagonistas precisam ser testadas para melhor padronização dos ensaios.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados pode-se concluir que o percentual de 6% de ftlaocianina de cobalto sobre a tinta condutora (contendo nanotubos de carbono carboxilados) foi a ideal em comparação às demais estudadas (4%, 4,6%, 5,3% e 6,67%);

A plataforma sensora nanoestruturada baseada em filme de PPI apresentou uma boa estabilidade e reprodutibilidade eletroquímica, com CV para I_{pa} e I_{pc} dentro do valor ideal citado na literatura ($\leq 5\%$), bem como os DP para I_{pa} e I_{pc} respectivamente $\leq 5,5$ (valores referidos na literatura);

Com a imobilização com HBc Ag à superfície sensora, foi possível detectar anti-HBc na ordem de ng/mL. Esta plataforma sensora apresenta-se promissora para aplicação em imunossensor livre de marcação, constituindo-se num método sensível, simples e pouco custoso.

Como perspectivas, sugere-se realizar mais estudos para melhor

padronização da plataforma sensora e do filme de PPI para amostras complexas em soro, sangue e outros fluidos biológicos, bem como aplicar o imunossensor para detecção de antígenos de superfície para aumentar a especificidade do diagnóstico da infecção por HBc.

REFERÊNCIAS

BAUGHMAN, R. H.; ZAKHIDOV, A. A. & DE HEER, W. A.; Carbon nanotubes – the route toward applications. **Science**, 297: 787, 2012.

DIAS, A. C. M. S. et al. A sensor tip based on carbon nanotube-ink printed electrode for the dengue virus NS1 protein. **Biosensors and Bioelectronics**, v.44, p.216-221, 2013.

LIN KW, KIRCHNER JT. Hepatitis B. **Am Fam Physician**. Jan 1;69(1):75-82, 2004.

NASCIMENTO, R. F.; SELVA, T. M. G.; RIBEIRO, W. F.; BELIAN, M. F.; ANGNES, L.; NASCIMENTO V. B. Flow-injection electrochemical determination of citric acid using a cobalt(II)-phthalocyanine modified carbon paste electrode. **Talanta** 105; 354–359. 2013.

PUNBUSAYAKUL, N.; TALAPATRA, S.; CI, L.; SURAREUNGCHAI, W. & AJAYAN, P.M. Double-walled carbon nanotube electrodes for electrochemical sensing. **Electrochem. and Solid-State Lett.**, 10: 13, 2013.

REZAEI, B.; MAJIDI, N.; RAHMANI, H.; KHAIAMIAN, T.; Eletrochemical impedimetric immunosensor for insulin like growth factor-1 using specific monoclonal antibody-nanogold modified electrode. **Biosensor and Bioelectronics**, 26: 2130-2134, 2011.

THEVENOT, D.R., TOTH, K., DURST, R. A., et al., Technical Report Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification, **Biosensors and Bioelectronics**, v.16, n.1-2, pp.121-131, 2001.

TSOUTI, V.; BOUTOPOULOS, C.; ZERGOTI, I.; CHATZANDROULIS, S. Capacitive microsystem for biological sensing. **Biosensor and Bioelectronics**, 27: 1-11, 2011.

YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J.M. Electrochemical sensing based on carbon

nanotubes. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, p. 938-953, 2010.

ZHANG, X.; CUI, Y.; LV, Z.; LI, M.; MA, S.; CUI, Z.; KONG, Q. Carbon nanotubes, Conductive

Carbon Black and Graphite powder based paste electrodes. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 6, p. 6063-6073, 2011.

ANEXOS

Figura 1 - Imagem do eletrodo modificado com tinta de carbono

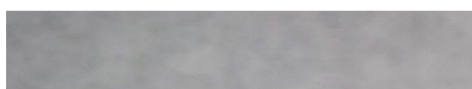


Figura 2 - VC consecutivos registrados em 20 ciclos a uma velocidade de varredura de 100 mV/s em solução de $K_4[Fe(CN)_6]$ / ($K_3[Fe(CN)_6]$)

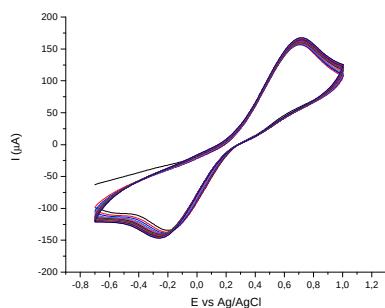


Figura 3 - VC sob diferentes velocidades de varredura aumentando de 10 a 120mV/s do mais interno ao mais externo em solução de $K_4[Fe(CN)_6]$ / ($K_3[Fe(CN)_6]$)

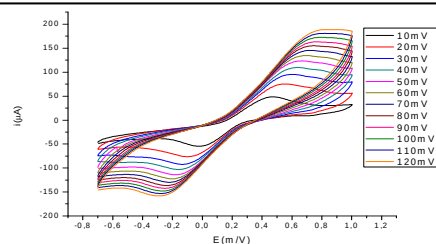


Figura 4- VC das áreas eletroativas das etapas do imunossensor, mostrando sucessivos decréscimos da área eletroativa. Os eletrodos foram submetidos a velocidade de varredura de 100 mV/s em sonda redox de $K_4[Fe(CN)_6]$ / ($K_3[Fe(CN)_6]$)

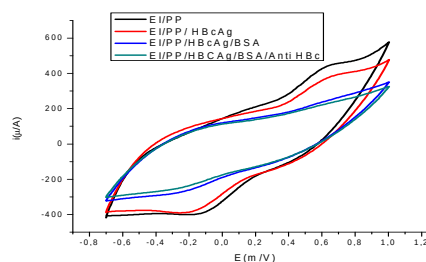


Figura 5- VOQ das respostas analíticas do imunossensor ao anti HBc. A indicação das setas mostra a direção das sucessivas incubações com decaimento de corrente

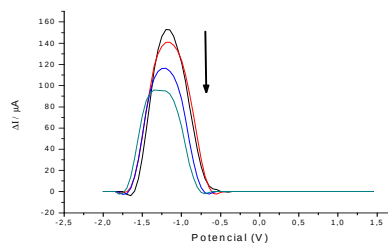


Figura 6- Ajuste linear da resposta de corrente de pico anódico das VOQ em relação à concentração de anti HBc (ng/mL)

