UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

JÉSSIKA FERNANDA FERREIRA RIBEIRO

PLATAFORMA BIOSSENSORA ELETROQUÍMICA BASEADA EM ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADA POR PONTOS QUÂNTICOS

RECIFE

2016

JÉSSIKA FERNANDA FERREIRA RIBEIRO

PLATAFORMA BIOSSENSORA ELETROQUÍMICA BASEADA EM ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADA POR PONTOS QUÂNTICOS

Dissertação de Mestrado apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, área de concentração: Bioengenharia.

Orientação: Profª Dr.ª Adriana Fontes
Co-orientação: Profª Dr.ª Lêda Cristina da Silva

RECIFE
2016

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

B484p Ribeiro, Jéssika Fernanda Ferreira.
Plataforma biossensora eletroquímica baseada em eletrodo de carbono vítreo modificada por pontos quânticos/ Jéssika Fernanda Ferreira Ribeiro., 2016.
84folhas, Il., Abre.; Sigl. e Tabs.

Orientadora: Profª Dr.ª Adriana Fontes.
Coorientadora: Profª Dr.ª Lêda Cristina da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação de Engenharia Biomédica, 2016.
Inclui Referências e Apêndices.

1. Engenharia Biomédica. 2. Bioconjugação. 3. Biossensor. 4. Eletroquímica. 5. Imunoglobulina. 6. Resistência à Transferência de Carga. I. Fontes, Adriana (Orientadora). II. Silva, Lêda Cristina da (Coorientador). III. Título.

UFPE

610.28 CDD (22. ed.) BCTG/2016-161

JÉSSIKA FERNANDA FERREIRA RIBEIRO

PLATAFORMA BIOSSENSORA ELETROQUÍMICA BASEADA EM ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADA POR PONTOS QUÂNTICOS

Essa dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Aprovado em: 29 de Fevereiro de 2016

Banca Examinadora:

_____

Prof.ª Dr.ª Adriana Fontes
Departamento de Biofísica e Radiobiologia – UFPE (Orientadora)

_____

Prof. Dr. Renato Evangelista de Araujo
Departamento de Eletrônica e Sistemas – UFPE (Titular – Membro Interno)

_____

Prof. Dr. Euzébio Skovroinski
Departamento de Química Fundamental – UFPE (Titular – Membro Externo)

Coordenador do PPGEB: _____
Prof.ª Dr.ª Rosa Amália Fireman Dutra

RECIFE

2016

AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa de minha vida chega ao fim, e nesse momento a memória chega a falhar de quantas vezes e a quantas pessoas, situações e a vida, eu disse: Obrigada! Além dos motivos que foram os mais variados... Mas vamos lá!

A **DEUS** pela abençoada oportunidade de ampliar os horizontes da inteligência e por me fazer acreditar que com ele tudo é possível;

Aos meus pais **Helena e Sebastião** e meu irmão **Jackson** por toda a dedicação, paciência, amor, cuidado e ensinamentos. Vocês são meus maiores exemplos!

À orientadora **Adriana Fontes**, pela confiança, atenção, paciência, incentivo, oportunidade e compreensão. Tudo será levado com muito carinho pela estrada da vida...

À co-orientadora **Lêda Cristina**, por incentivar os "primeiros passos" de minha vida acadêmica sempre com toda confiança e dedicação. Que são únicos!

À colaboradora **Rosa Dutra**, pelos ensinamentos durante todo o mestrado, e por abrir as portas do LAPED, o qual foi de fundamental importância para meu aprendizado.

Ao colaborador e amigo **Rogério Tavares**, pela dedicação incondicional durante todo desenvolvimento do trabalho. Meu carinho e gratidão!

Às amigas de todas as horas, **Marília e Erika** pelas conversas, conselhos, risadas, cafés, açaís... Vocês são os bens mais preciosos que a vida me presenteou!

Aos amigos e companheiros de trabalho diário do grupo LVIE-UFPE: **Karla, Imerson, Adriana**, **Emanuella, Otávio, Cecília, Marlon e Dayrine**, pelos momentos de cooperação, conversas alegres, brincadeiras, cafés, viagens... Vocês se tornaram a extensão da minha família!

Em especial a **José Rodrigo,** pela dedicação durante o desenvolvimento do trabalho, carinho, apoio, atenção, paciência e compreensão tão apreciados em todos os momentos e por estar sempre ao meu lado (literalmente!)

Aos colegas de laboratório de Biofísica Química, grupo NanoBio, **Paulo Euzébio, Isabela e Wadja**, que me ajudaram, deram sugestões, e que fizeram contribuir para a minha pesquisa

À FACEPE pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para meu trabalho ou para meus dias serem mais agradáveis...

RESUMO

Com o avanço da nanotecnologia, o uso de nanopartículas (NPs) metálicas, e semicondutoras, no desenvolvimento de biossensores vem aumentando nos últimos anos. Sua utilização vem proporcionando um aumento da área superficial, promovendo uma imobilização mais efetiva de biomoléculas, e espécies eletroativas, a fim de melhorar a sensibilidade de detecção do biossensor. Dentre essas NPs, estão os pontos quânticos (PQs), nanocristais com propriedades ópticas e semicondutoras únicas, as quais podem ser moduladas por seu tamanho. Os PQs podem ser utilizados em plataformas para biossensores eletroquímicos através de sua imobilização como intermediários entre o bioreceptor e a superfície do eletrodo. Nesse contexto, esse trabalho objetivou empregar e avaliar a utilização de PQs de CdTe carboxilados em uma plataforma biossensora eletroquímica baseada em eletrodo de carbono vítreo modificado com polipirrol aminado. Posteriormente, o anticorpo IgG (Imunoglobulina G Humana) foi imobilizado e a plataforma foi aplicada na detecção do anti-IgG. A imobilização dos PQs e do IgG foi avaliada de forma covalente e por adsorção. No primeiro caso, o eletrodo modificado pelo pirrol aminado foi imerso por 24 horas em uma solução contendo 2 mmol L^{-1} de EDC e 5 mmol L^{-1} de Sulfo-NHS para a formação de ligações amidas entre os PQs e a superfície modificada. Antes da imobilização do IgG, foram realizados estudos de conjugação em meio homogêneo a partir do ensaio fluorescente em microplaca (EFM). Esse estudo foi realizado a fim de correlacionar a conjugação nos meios homogêneo/heterogêneo e desenvolver um método com fins de aprimorar com maior rapidez a imobilização de biomoléculas na plataforma biossensora. Dessa forma, após o EFM, a superfície modificada por PQs foi avaliada frente a diferentes quantidades de IgG, EDC e Sulfo-NHS, adquiridas através da melhor e pior condição da EFM. A partir do resultado do EFM, foi adotada como melhor condição a do sistema com a maior quantidade de EDC e Sulfo-NHS e menor concentração de IgG, o qual apresentou um aumento relativo da fluorescência de 960%, enquanto que a pior condição foi obtida a partir da menor quantidade de agentes de acoplamento e de IgG, com aumento relativo da fluorescência de 80%. Todas as etapas de modificações do eletrodo foram monitoradas por voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). Para o eletrodo de carbono vítreo modificado com polipirrol aminado, as análises eletroquímicas não apresentaram grandes variações em relação ao eletrodo limpo. Já com a imobilização dos PQs de CdTe carboxilados, os resultados indicaram uma redução no processo de transferência de carga, evidenciado através da diminuição e do deslocamento da corrente de pico na região de oxidação da voltametria cíclica, e do aumento do semicírculo apresentado nos dados da impedância eletroquímica. Posteriormente, a voltametria cíclica na presença do anticorpo IgG apresentou também uma diminuição e um deslocamento gradual das correntes de pico catódicas e anódicas, indicando a imobilização dessa biomolécula na superfície do eletrodo. As análises de EIE foram coerentes com as da VC. Foi observada correlação entre as avaliações no eletrodo e na EFM, indicando que a melhor condição no EFM será uma escolha efetiva para a plataforma. Os resultados também indicaram que os PQs e IgGs foram imobilizados preferencialmente de forma covalente. As avaliações preliminares também indicaram que a interface modificada por pirrol aminado e PQs carboxilados foi capaz de detectar anti-IgGs na faixa de ng mL^{-1}, revelando-se como um potencial para ser utilizada na detecção de biomarcadores de diagnóstico.

PALAVRAS-CHAVE: Bioconjugação, Biossensor, Eletroquímica, Imunoglobulina, Resistência à Transferência de Carga, Polipirrol Aminado, Pontos Quânticos Carboxilados.

ABSTRACT

The use of metallic, and semiconductor, nanoparticles (NPs) for developing biosensors has been expanding in recent years. NPs can provide an increase of the biosensors' surface area, by promoting a more effective immobilization of biomolecules, as well as electroactive species, in order to improve the sensitivity of these devices. Among these NPs, there are the quantum dots (QDs), nanocrystals with unique optical and semiconductor properties that can be applied in electrochemical biosensors platforms as intermediaries between bioreceptors and the electrode surface. Thus, in this context, this study aimed to evaluate and employ carboxyl-coated CdTe PQs in an electrochemical platform based on a vitreous carbon electrode modified by amino functionalized polypyrrole. Subsequently, the IgG (human immunoglobulin G) antibody was immobilized on the platform that was tested by detecting anti-IgG biomolecules. The QDs, as well as the IgG, immobilization was evaluated by covalent coupling and by adsorption. In the first case, the electrode modified by polypyrrole was immersed, for 24 hours, in a solution containing 2 mmol L^{-1} of EDC and 5 mmol L^{-1} of Sulfo-NHS to promote amide bonds between the modified surface and QDs. Before IgG immobilization, conjugation experiments were also performed in homogeneous medium by using the fluorescent microplate assay (FMA). This study was conducted to correlate the conjugations in homogeneous/heterogeneous media in order to develop a method for improving more quickly the biomolecules' immobilization on the biosensor platform. Thus, after the EFM, the electrode modified by QDs was evaluated by using different amounts of IgG, EDC and Sulfo-NHS, acquired from the best and the worst condition of FMA. From the result of the FMA, it was adopted as the best system that one composed by the greatest amount of EDC and Sulfo-NHS and by the lower concentration of IgG (which had a relative fluorescence increase of 960%), while the worst condition was obtained by the one that used the lower amounts of coupling agents and IgG (with relative increase in the fluorescence of 80%). All stages of the electrode modifications were monitored by cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The electrochemical analysis for the vitreous carbon electrode modified with amino functionalized polypyrrole showed no differences compared to the clean electrode. However, after the immobilization of CdTe carboxylate QDs, the results showed a decrease in the charge transfer process. Subsequently, the cyclic voltammetry in the presence of the IgG antibody also presented a decrease and a gradual displacement of the cathodic and anodic peak currents, indicating the immobilization of this biomolecule on the electrode surface. EIS analyses were consistent with those performed by VC. A correlation was observed between the evaluations in the electrode and the FMA, indicating that the best condition in the FMA is an effective choice for the platform. The results also indicated that QDs and IgGs were preferably immobilized by covalent coupling. Preliminary evaluations have also indicated that the platform, modified by amino functionalized pyrroles and carboxyl-coated QDs, was able to detect anti-IgG in the range of ng mL^{-1}, showing to be a potential platform for the detection of diagnostic biomarkers.

KEYWORDS: Bioconjugation, Biosensor, Carboxyl-coated Quantum Dots, Electrochemical, Immunoglobulin, Polypyrrole Amino Functionalized, Resistance Charge Transfer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do eletrodo de oxigênio Clark aplicado como biossensor.....17

Figura 2. Esquema de um típico biossensor.....18

Figura 3. Classificação dos biossensores em relação ao biorreceptor (enzimáticos, genossensores e imunossensores) e ao transdutor (eletroquímico, calorimétrico e óptico), dando destaque ao biossensor eletroquímico.....20

Figura 4. Esquema de um processo de transferência de carga (elétron) entre espécie eletroativa e a superfície do eletrodo, em que é caracterizado o método de detecção indireta 24

Figura 5. Célula eletroquímica contendo os eletrodos de trabalho (WE) eletrodo de referência (RE) e eletrodo auxiliar (CE).....25

Figura 6. Princípio esquemático da voltametria cíclica (VC). (a) potencial variando com tempo (t) e (b) voltamograma cíclico de um sistema redox reversível (dois processos faradáicos, oxidação e redução).....26

Figura 7. Representação da interface eletrodo de trabalho-solução para um sistema com sonda eletroquímica ($Fe(CN)_6^{4-}/Fe(CN)_6^{3-}$) por um cicuito.....27

Figura 8. Representação dos dados de impedância. Em (a) diagrama de Nyquist, que é a parte imaginária (-Z'') em função da parte real (Z'), e (b) diagrama de Bode, em que são apresentados os valores absolutos da impedância (|Z|) ou ângulo de fase (θ) em função de *f*.....28

Figura 9. Exemplos de nanomateriais. Em particular cada um deles apresentam características únicas e vantagens na aplicação de modificação de superfícies para biossensores, proporcionando principalmente um aumento da área superficial do sensor.....32

Figura 10. Os diagramas esquemáticos mostram *band gaps* e portadores de carga em materiais sólidos sendo classificados em isolantes, semicondutores ou condutores, dependendo da energia de banda proibida (E_g) entre as bandas de condução e de valência. As bandas de valência são abaixo das bandas de condução para cada tipo de material, e ocupação de elétrons é representado por sombreado preto.....35

Figura 11. A diminuição do tamanho das nanopartículas, em regime de confinamento quântico, acarreta em níveis discretos.....36

Figura 12. Representação de pontos quânticos, emitindo fluorescência em diversas regiões do espectro de luz visível, relacionada com a variação do tamanho dos nanocristais. Quanto menor o tamanho da partícula mais deslocado para o azul será a sua emissão, já quanto maior o tamanho, mais deslocada para o vermelho.....37

Figura 13. Estrutura de um PQ representado pelo núcleo da nanopartícula que é recoberto por uma camada de passivação (casca). Na superfície do nanocristal estão moléculas que conferem grupos funcionais ao PQ que interagem com a molécula alvo por meio de conjugações.....38

Figura 14. Fórmulas estruturais dos agentes estabilizantes carboxilados e aminados utilizados para obtenção de PQs: (a) Ácido mercaptoacético (AMA) ou ácido Tioglicólico, (b) ácido 3-mercaptopropiônico (AMP), (c) ácido mercaptosuccínico (AMS), (d) cisteína (CIS) e (e) cisteamina (CISTM).....39

Figura 15. Aplicação de PQs de CdSe/ZnS em biossensor baseado em FRET com estreptavidina-rodamina.....41

Figura 16. Equipamentos e procedimentos eletroquímicos utilizados na caracterização do sistema.....43

Figura 17. Técnicas eletroquímicas para modificação da superfície de carbono vítreo com polipirrol aminado.....44

Figura 18. Espectros de absorção e emissão dos pontos quânticos.....45

Figura 19. Esquema da imobilização dos pontos quânticos sobre a superfície polimerizada.....46

Figura 20. Método baseado em ensaio de fluorescência em Microplaca (EFM) 47

Figura 21. Conjugação do Anticorpo IgG utilizando a maior e menor concentração de agentes de acoplamento.....48

Figura 22. Esquema da imobilização por ligação covalente do anticorpo IgG sobre a superfície nanoestruturada.....49

Figura 23. Esquema da imobilização do anticorpo IgG sobre a superfície de CV e a superfície polimerizada por adsorção.....49

Figura 24. Esquema da detecção do anti-anticorpo IgG sobre a superfície bloqueada com TRIS.....50

Figura 25. Perfil eletroquímico da interface carbono vítreo em solução de 1 mmol L^{-1} de $FeK_4(CN)_6/FeK_3(CN)_6$ em KCl 0,1 mol L^{-1} a T = 25 ºC: (a) voltamograma cíclico a v = 0,1 V s^{-1}, (b) $I_{p,a}$ e $I_{p,c}$ vs. $v^{1/2}$, juntamente aos resultados de (c) espectroscopia de impedância eletroquímica (E_{rms} = 10 mV vs. referência), segundo a representação de Nyquist.....52

Figura 26. (a) Voltamograma cíclico da superfície de carbono vítreo em solução de 10 mmol L^{-1} de PY_{Am} em HNO_3 e 1 mmol L^{-1} de PY em HNO_3 0,1 mol L^{-1} a T = 25 ºC, (b) Esquema da proposta do mecanismo de eletropolimerização do PY, baseado na formação de iniciador cátion radical em uma reação como processos químicos e eletroquímicos sucessivos.....54

Figura 27. Caracterização da eletropolimerização do P_{Am} sobre carbono vítreo em solução de 1 mmol L^{-1} de $FeK_4(CN)_6/FeK_3(CN)_6$ em KCl 0,1 mol L^{-1} a T = 25 ºC. (a) voltamograma cíclico com $I/v^{1/2}$ vs. *E*, (b) espectroscopia de impedância eletroquímica (E_{rms} = 10 mV vs. referência): Representação de Nyquist. Todos os experimentos de polimerização foram realizados em solução HNO_3 0,1 mol L^{-1} a T = 25 ºC.....55

Figura 28. Perfil eletroquímico da interface superfície/PPY_{Am}/PQs-AMS em solução de 1 mmol L^{-1} de $FeK_4(CN)_6/FeK_3(CN)_6$ em KCl 0,1 mol L^{-1} a T = 25 ºC. Em (a) voltamogramas cíclicos a v = 0,1 V s^{-1}, (b) espectroscopia de impedância eletroquímica (E_{rms} = 10 mV vs. referência), segundo a representação de Nyquist.....56

Figura 29. Perfil voltamétrico da interface superfície/Ac-IgG e superfície/PPY_{Am}/Ac-IgG em solução de 1 mmol L^{-1} de $FeK_4(CN)_6/FeK_3(CN)_6$ em KCl 0,1 mol L^{-1} a T = 25 ºC, a v = 0,1 V s^{-1}.....58

Figura 30. Perfil eletroquímico da interface superfície/PPY_{Am}/PQ-AMS/Ac-IgG em solução de 1 mmol L^{-1} de $FeK_4(CN)_6/FeK_3(CN)_6$ em KCl 0,1 mol L^{-1} a T = 25 ºC da condição **c)**, 24 horas. Em (a)voltamogramas cíclicos a v = 0,1 V s^{-1}, (b) espectroscopia de impedância eletroquímica (E_{rms} = 10 mV vs. referência), segundo a representação de Nyquist.....60

Figura 31. Espectroscopia de impedância eletroquímica (E_{rms} = 10 mV vs. referência), da interface superfície/PPY_{Am}/PQs-AMS/Ac-IgG em solução de 1 mmol L^{-1} de $FeK_4(CN)_6/FeK_3(CN)_6$ em KCl 0,1 mol L^{-1} a T = 25 ºC da condição a), segundo a representação de Nyquist.....61

Figura 32. Espectroscopia de impedância eletroquímica da interface superfície/PPY_{Am}/PQs/Ac-IgG/anti-IgG/ (diferentes concentrações) em solução de 1 mmol L^{-1} de $FeK_4(CN)_6/FeK_3(CN)_6$ em KCl 0,1 mol L^{-1} a T = 25 ºC.....61

LISTA DAS TABELAS

Tabela 1. Variações de EDC e Sulfo-NHS e anticorpo para conjugação homogênea do sistema.....48

Tabela 2. Variação de R_{ct} e C na caracterização da eletropolimerização do PPY_{Am}.....55

Tabela 3. Resultado do EFM Conjugado covalente de PQs/IgG. Média do sinal se refere à média da triplicata para cada sistema (u.a unidades arbitrárias).....59

Tabela 4. Valores de R_{ct} na detecção do anti-IgG.....62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMS - Ácido mercaptosuccínico

BC - Banda de Condução

BV - Banda de Valência

bBSA - Soro Albumina Bovina Biotinilada

Cd^{2+} - Cádmio

CdSe/ZnS - Seleneto de Cádmio/Sulfeto de Zinco

CNTs - *Carbon Nanotubes* (Nanotubos de Carbono)

EDC - N-ethyl-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

ECV - Eletrodo de Carbono Vítreo

Eg - *Bandgap*

EIE - Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

EFM - Ensaio Fluorescente em Microplacas

FL - Fluorescência

FRET- *Förster* (*Fluorescence*) *Resonance Energy Transfer*

IgG - Imunoglobulina G

PPY_{Am} - Polipirrol Aminado

QCM - *Quartz Crystal Microbalance* (Microbalança de Cristal de Quartzo)

PQs - Pontos quânticos

SAMs - *Self-Assembled Monolayers* (Monocamadas Auto Organizadas)

SPR - *Surface Plasmon Resonance* (Ressonância de Plasmon de Superfície)

Sulfo-NHS - Sulfo N-hidroxisulfosuccinimida

SWCNTs - *Single Walled Carbon Nanotubes* (Nanotubos de Carbono de Parede Simples)

VC -Voltametria Cíclica

WCNTs - *Multiple Walled Carbon Nanotubes* (Nanotubos de Carbono de Múltiplas Paredes)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14

2 OBJETIVOS 16

2.1 OBJETIVO GERAL 16

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 16

3 REFERENCIAL TEÓRICO 17

3.1 BIOSSENSORES 17

3.2 CLASSIFICAÇÃO DOS BIOSSENSORES 19

3.2.1 Classificação quanto ao elemento biológico 20

3.2.2 Classificação quanto à natureza do transdutor 22

3.3 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS 23

3.3.1 Técnicas eletroquímicas 24

3.3.2 Imobilização do biorreceptor ao transdutor eletroquímico modificado 29

3.4 NANOTECNOLOGIA E BIOSSENSORES 31

3.4.1 Nanomateriais 31

3.4.2 Pontos Quânticos 34

3.4.3 Aplicações de pontos quânticos em biossensores 39

4 MATERIAIS E MÉTODOS 43

4.1 EQUIPAMENTOS E MEDIDAS ELETROQUÍMICAS 43

4.2 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE CARBONO VÍTREO COM POLIPIRROL AMINADO 44

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS PONTOS QUÂNTICOS 44

4.4 IMOBILIZAÇÃO DOS PONTOS QUÂNTICOS SOBRE A SUPERFÍCIE POLIMERIZADA 45

4.5 ESTUDOS DE MICROPLACAS APLICADOS À IMOBILIZAÇÃO DO ANTICORPO IgG AOS PONTOS QUÂNTICOS 46

4.6. IMOBILIZAÇÃO DO ANTICORPO SOBRE A SUPERFÍCIE MODIFICADA COM PONTOS QUÂNTICOS 48

4.7 DETECÇÃO DO ANTI-ANTICORPO (Anti-IgG) 50

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 51

5.1. COMPORTAMENTO DA SONDA ELETROQUÍMICA DIANTE DA SUPERFÍCIE DE CARBONO VÍTREO 51
5.2 ELETROPOLIMERIZAÇÃO DO 2-(1H-PIRROL-1-IL)ETANOAMINA (PY_{Am}) 53
5.3 IMOBILIZAÇÃO DOS PQs-AMS SOBRE A INTERFACE SUPERFÍCIE/PPY_{Am} 56
5.4 IMOBILIZAÇÃO DO ANTICORPO IgG 57
5.4.1 Imobilização do anticorpo IgG – Ligação inespecífica 57
5.4.2 Estudos de EFM 58
5.4.3 Imobilização do anticorpo IgG sobre superfície/PPY_{Am}/PQs-AMS 59
5.5 DETECÇÃO DO ANTI-IgG 61
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 63
7 PERSPECTIVAS 64
8 REFERÊNCIAS 65
9 APÊNDICES 75
9.1 REPRESENTAÇÕES DOS GRÁFICOS DE Z' VS. *f* 76
9.2 RESUMO EXPANDIDO ESCRITO NO MODELO DO CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA 79
9.3 PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS 84

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de novos métodos de terapia e diagnóstico tem contribuído para a redução da incidência de doenças responsáveis por elevados índices de mortalidade. No entanto, mesmo nos tempos atuais, ainda é um objetivo a busca por sistemas para diagnósticos ainda mais eficientes que forneçam respostas rápidas, precisas, com sensibilidade e especificidade. Dentro desse contexto, os biossensores apresentam-se como fortes candidatos devido às suas propriedades inerentes, pois eles vêm demonstrando ser dispositivos com capacidade de fornecer respostas com sensibilidade e especificidade para detecção, além de portabilidade e baixo custo de confecção quando comparados a outras técnicas, tais como: ELISA, ECLIA ou Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (VO-DINH e CULLUM, 2000; DUTRA et al., 2010).

O funcionamento de um biossensor se baseia na conversão direta de uma reação química ou biológica em um sinal elétrico permitindo não só medições em tempo real, como também portabilidade. Para tal, é usado um elemento bioativo acoplado, na maioria dos casos, a um transdutor, permitindo a detecção quantitativa (usualmente na faixa de $\mu g\ mL^{-1}$) e específica de substâncias químicas ou biológicas, como por exemplo, açúcares e anticorpos. Diferentes tipos de transdução podem ser usados para a conversão da resposta química/biológica em um sinal elétrico, determinando assim o tipo de biossensor, por exemplo: óptico, piezelétrico, calorimétrico ou eletroquímico. Os biossensores eletroquímicos podem por sua vez ser classificados em amperométricos, impedimétricos, potenciométricos, dentre outros (VO-DINH e CULLUM, 2000).

Em especial, o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos é uma das áreas de maior e mais rápido crescimento, principalmente, devido aos novos desafios impostos por amostras de interesse industrial, clínico e ambiental. As técnicas eletroanalíticas são capazes de fornecer limites baixos de detecção e caracterizar os sistemas de interesse através de propriedades elétricas que são modificadas a partir da interação do analito com uma célula eletroquímica. Uma vantagem deste método é que as células eletroquímicas são frequentemente específicas para um estado de oxidação particular e sua instrumentação é de relativo baixo custo, permitindo também portabilidade (CASTILHO, 2003; FREIRE et al., 2003).

Nessa perspectiva, o aprofundamento de pesquisas visando aperfeiçoamentos na

elaboração desses dispositivos, depende de uma variedade de fatores, dentre eles da modificação de sua superfície, utilizando, por exemplo, nanopartículas (tais como: as poliméricas, metálicas e semicondutoras), as quais vêm proporcionando um aumento da área superficial do sensor, promovendo assim uma imobilização mais efetiva de moléculas biológicas (bem como de espécies eletroativas) podendo melhorar, dessa forma, a sensibilidade de detecção do biossensor (WANG e HU, 2009; MOREIRA, 2011).

Atualmente, uma nova classe de nanopartículas, os pontos quânticos (PQs), vem sendo avaliada para biossensores. Os PQs são nanocristais fluorescentes de semicondutores de tamanhos nanométricos (nanocristais) que apresentam diâmetros da ordem de 2 a 10 nm, (1 nm = 10^{-9} m), e exibem propriedades físico químicas que são significativamente diferentes, quando comparadas aos mesmos cristais em escala macroscópica. Os PQs vêm sendo especialmente aplicados como novos fluoróforos para diagnóstico e compreensão de processos celulares em Ciências da Vida (MICHALET et al., 2005; BRUCHEZ et al., 2008; MICHALET et al., 2008; SANTOS et al., 2008). Como os PQs são ainda menores que muitas nanopartículas de ouro e nanotubos de carbono, sua utilização pode levar a um aumento ainda maior da área superficial nos eletrodos. A síntese de PQs também é de menor custo quando comparada a de nanopartículas de ouro, e mais simples e limpa quando comparada a de nanotubos de carbono. Além disso, devido às suas propriedades elétricas e ópticas, os PQs podem ser explorados em plataformas biossensoras tanto ópticas como eletroquímicas. Essas são algumas razões que têm levado os pesquisadores a investigarem a utilização de PQs em biossensores (ANDRADE, 2006; SANTOS e FONTES, 2008). Como os trabalhos com PQs em biossensores, especialmente nos eletroquímicos, surgiram recentemente, o papel dessa nanopartícula nessas plataformas sensoras não está ainda definido. Isso porque, há vários fatores que podem influenciar nesse contexto a fim de desenvolver dispositivos mais efetivos, tais como: tipo de semicondutor que compõe a nanopartícula, tipo de eletrodo utilizado, tipo de agente estabilizante/funcionalizante empregado na síntese dos PQs, modificações realizadas no eletrodo e até mesmo o tamanho da nanopartícula. Assim, esse projeto pretende empregar os PQs, e investigar o seu papel, em uma plataforma biossensora eletroquímica baseada em eletrodo de carbono vítreo modificado com polipirrol aminado e PQs de CdTe carboxilados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Empregar e avaliar a utilização de PQs de CdTe carboxilados em uma plataforma biossensora eletroquímica baseada em eletrodo de carbono vítreo modificado com polipirrol aminado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

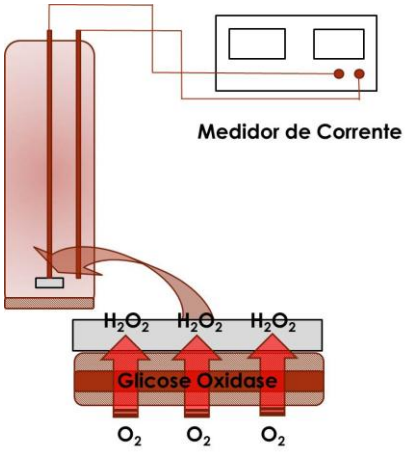
1. Modificar a superfície do eletrodo de carbono vítreo com polímeros derivados do polipirrol, funcionalizados com grupos aminas, e caracterizá-la por técnicas eletroquímicas;
2. Imobilizar PQs de CdTe carboxilados sobre a superfície previamente preparada com polipirrol aminado e caracterizá-la;
3. Realizar estudos de bioconjugação, de PQs ao anticorpo IgG (Imunoglobulina G Humana), em meio homogêneo, através do método de ensaio fluorescente em microplaca (EFM), desenvolvido pelo grupo de pesquisa em Nanotecnologia Biomédica;
4. Utilizar as condições de bioconjugação do meio homogêneo em meio heterogêneo, a fim de correlacioná-las para se obter um método mais rápido de aprimoramento da imobilização de biomoléculas na plataforma biossensora;
5. Imobilizar o anticorpo IgG na superfície modificada (eletrodo/polímero/PQs) e caracterizá-la por voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica;
6. Detectar o anti-IgG, a fim de testar plataforma biossensora.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 BIOSSENSORES

No ano de 1956, o pesquisador L. C. Clark desenvolveu um eletrodo de oxigênio, que permitiu monitorar a variação da concentração do analito (O_2) através da medição da corrente elétrica do sistema (eletrodo de oxigênio). Este tipo de sensor foi estudado pelos anos seguintes com foco em outros gases, como no exemplo da detecção de CO_2, proposta por W. Severinghaus. No entanto, foi em 1962, através da união de L. C. Clark e W. Lyons, que foi apresentada a primeira descrição de um biossensor com aplicação na detecção de moléculas de glicose (**Figura 1**).

Figura 1. Esquema do eletrodo de oxigênio proposto por Clark e aplicado como biossensor.



Fonte: RIBEIRO., 2015.

Esse dispositivo era constituído pela imobilização da enzima glicose oxidase à superfície de um eletrodo de platina, através de uma membrana de acetato de celulose. Desse modo, era possível através da reação da glicose, com a enzima e O_2 no meio, formar o H_2O_2 (**Eq. 1**). Essa última substância sofre processo eletroquímico (redução do peróxido de hidrogênio) na superfície do eletrodo permitindo correlacionar a intensidade da corrente elétrica observada com a concentração do analito (**Eq. 2**).

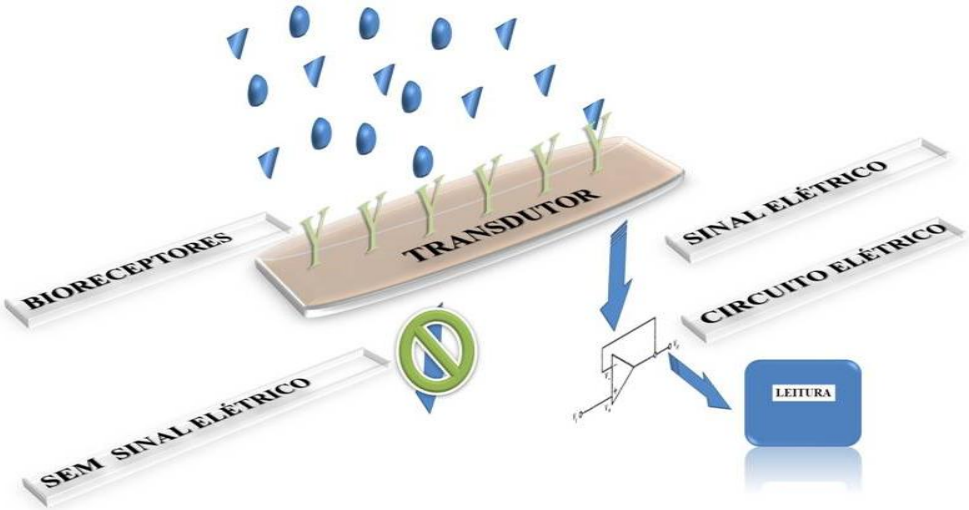
$$C_6H_{12}O_6 + H_2O + O_2 + \text{Glicose Oxidase} \rightarrow C_6H_{12}O_7 + H_2O_2 \qquad \textbf{(Eq. 1)}$$

$$H_2O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow 2H_2O \qquad \textbf{(Eq. 2)}$$

Foi então que surgiu o conceito de um dispositivo voltado para detectar moléculas biológicas, conhecido por biossensor amperométrico, em que (no exemplo em questão) a concentração da glicose está associada diretamente a intensidade da corrente mensurada. Este sistema foi sensivelmente melhorado posteriormente por Updark e Hicks pela imobilização da mesma enzima em gelatina. Guilbault e Montalvo, em 1969, desenvolveram o primeiro biossensor potenciométrico para determinação da ureia, no qual utilizavam a enzima urease em gel de poliacrilamida sobre um eletrodo de vidro sensível ao íon amônio (NH_4^+), mostrando que a urease imobilizada ao gel possuía uma elevada atividade. E, foi por volta de 1972, que a *Yellow Springs Instruments* lançou o primeiro biossensor comercial. Ao longo dos anos, variados tipos de biossensores foram desenvolvidos para os mais diversos tipos de aplicações, que vão desde a área de análises clínicas até o setor agrícola (CLARK e LYONS, 1962; GUILBAULT e MONTALVO, 1969; FILHO e CAPELATO, 1991; KARUBE e MONURA, 2000).

Atualmente, pode-se definir os biossensores como dispositivos capazes de converter processos físico-químicos ou biológicos, específicos em um sinal quantitativo ou semi-quantitativo. Essa característica está associada à estrutura do biossensor, que é dividida em três partes: (a) elemento biorreceptor, (b) transdutor e (c) sistema de processamento do sinal (**Figura 2**).

Figura 2. Esquema de um biossensor típico.



Fonte: SILVA et al., 2015.

O biorreceptor é o componente biologicamente ativo, que em outras palavras, interage de maneira específica com o analito, gerando uma alteração em um ou mais parâmetros físico-químicos. O biorreceptor pode ser uma enzima, anticorpos, fragmentos de DNA, organelas, células ou até microorganismos. Dessa forma, o receptor é responsável pelo reconhecimento específico do analito do biossensor. Já o transdutor é o elemento que converte as alterações causadas pela interação (analito-biorreceptor) em sinal elétrico. Esse componente deve apresentar uma forte correlação com as propriedades envolvidas no processo, sejam elas térmicas, gravimétricas, ópticas ou elétricas (carga, potencial e corrente). Deste modo, a sensibilidade e precisão, na detecção pelo biossensor, estão associadas à faixa de linearidade (correlação) do transdutor para o respectivo processo envolvido. Por fim, o sistema de processamento de dados está associado à eletrônica, que permite converter o sinal elétrico gerado no transdutor em um número representativo da quantidade de analito no meio (VO-DINH e CULLUM, 2000; OLIVEIRA et al., 2013).

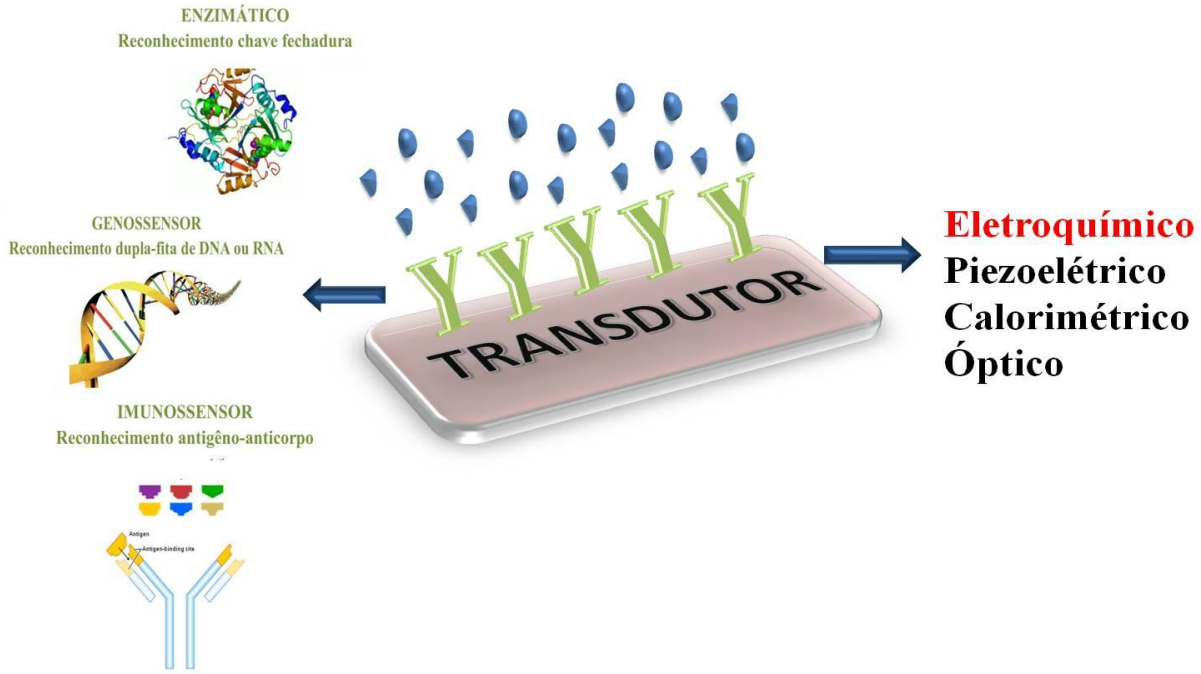
Dentre as várias características que estão relacionadas à utilização de um biossensor, destacam-se a especificidade, seletividade e capacidade de resposta que conduz a um curto tempo de análise, versatilidade, portabilidade e geralmente baixo custo, quando comparados a técnicas convencionais mais laboriosas, demoradas, caras e/ou não adequadas ao monitoramento *in situ*, como, ELISA (ensaio imunoadsorvente ligado à enzima), ECLIA (eletroquimioluminescência) e PCR (reação de cadeia de polimerase), dentre outras (LUONG et al., 2008).

3.2 CLASSIFICAÇÃO DOS BIOSSENSORES

A classificação desses dispositivos pode ser feita: (a) pelo tipo de elemento biológico, (b) pela natureza da transdução, ou (c) pela combinação dos dois anteriores, como observado na **Figura 3**. Quanto ao elemento biológico, os biossensores podem ser divididos em dispositivos: catalíticos, que utilizam células, tecidos e enzimas, ou de bioafinidade que se baseiam em antígeno-anticorpo, fragmentos de DNA, membranas ou ácidos nucléicos. A escolha da molécula biológica define a aplicação do biossensor, como no caso do biossensor de glicose que pode utilizar reações enzimáticas. Quanto ao tipo de transdução, os biossensores podem ser classificados em: piezoelétrico (gravimétrico), calorimétrico (variação de temperatura), óptico (avaliações de luminescência, elipsometria e ressonância de *plasmon* de superfície) ou eletroquímico (amperométricos, potenciométrico e condutimétrico). Sendo que, os dois últimos apresentam o maior número de citações de trabalhos científicos e também

produção comercial. Para a escolha desse transdutor se faz necessário o uso de três requisitos importantes: (a) o transdutor ser compatível com o material de interesse; (b) capacidade de detectar mínimas variações específicas decorrentes do processo biológico, e (c) que a mesma mantenha uma relação linear entre a variação da concentração do analito e sua conversão em sinal elétrico (TELES e FONSECA, 2008; CALIL e SILVA, 2009).

Figura 3. Classificação dos biossensores em relação ao biorreceptor (enzimáticos, genossensores e imunossensores) e ao transdutor (eletroquímico, piezoelétrico, calorimétrico e óptico), dando destaque ao biossensor eletroquímico.



Fonte: SILVA et al., 2015.

3.2.1 Classificação quanto ao elemento biológico

De acordo com o biorreceptor, os biossensores mais utilizados são os enzimáticos, genossensores e imunossensores. Os biossensores enzimáticos se baseiam no princípio de detecção de substâncias químicas geradas ou consumidas pela reação decorrente de uma enzima e seu analito. Por outro lado, os genossensores são desenvolvidos a partir de DNA ou RNA, ou fragmentos desses, imobilizados na superfície do sensor e capazes de viabilizar o seu reconhecimento molecular. Além destes, outros componentes biológicos, como, microorganismos (sensores microbianos), células de animais ou vegetais e cortes de tecidos, também podem ser usados. Por fim, existe uma classe de biossensores, os imunossensores,

que são baseados em uma reação imunológica específica, no qual o antígeno ou anticorpo é imobilizado na superfície do transdutor (RICCARDI, 2002; MOZAZ, 2004; ARORA et al., 2007; VELASCOGARCIA, 2009; OLIVEIRA et al., 2013).

Em se tratando ainda do elemento de reconhecimento e dos eventos originados a partir da ligação decorrente do receptor ao analito, os biossensores podem ser classificados em duas categorias, bioafinidade (ou biocomplexidade) e catalíticos. Os biossensores de bioafinidade funcionam baseados na interação entre o elemento de reconhecimento biológico e o elemento em análise. Esses biossensores envolvem antígenos, ou anticorpos, ligações proteicas ou receptores proteicos, formando um complexo com o ligante correspondente, sendo esse complexo bastante estável o que acarreta em um sinal de transdução. Já os biossensores catalíticos são baseados numa reação catalisada pelo componente biológico, o qual está presente em seu meio original sendo previamente isolado e produzido. Como exemplo desses elementos catalíticos são utilizados as células, enzimas e tecidos (RASOOLY, 2005; ANDRADE, 2006).

Nos últimos anos, os imunossensores são os exemplos mais explorados para receptores de bioafinidade, em que é considerada a especificidade molecular de reconhecimento de um antígeno a partir de anticorpos para formação de um complexo estável. Os anticorpos são glicoproteínas denominadas de Imunoglobulinas (Ig), que podem ser divididas em cinco classes diferentes (IgA, IgG, IgM, IgD e IgE). Dentre elas, o anticorpo IgG é o que se apresenta em maior quantidade no organismo. Apresentam ainda formato de Y, e são constituídas por duas cadeias peptídicas ligadas entre si por ligação dissulfeto. Além disso, possuem em sua estrutura, uma porção ($F(ab")_2$), fragmento de ligação ao antígeno que possui um grupo amino terminal o qual interage com o sítio de ligação do antígeno (RICCARDI et al., 2001; FIGUEIREDO, 2013).

Os imunossensores permitem a interação dos antígenos ou anticorpos na superfície do transdutor, como por exemplo, para o diagnóstico de patógenos. Um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento desses imunossensores é o fato da estrutura dos anticorpos e antígenos, rica em grupos aminas (**Figura 3**), facilitar a escolha do método de imobilização (detalhado na seção 3.3.1.) do elemento biológico ao transdutor. Existem dois tipos de anticorpos empregados para os imunossensores, os policlonais e os monoclonais. Os policlonais são aqueles que se originam a partir de diferentes linfócitos B, e reagem com vários epítopos do antígeno (várias partes de uma proteína) sendo obtidos através de imunização de um hospedeiro adequado. Já os monoclonais são produzidos por linhagem segregada e imortalizada de linfócitos B (linhagem celular resultante da fusão de uma única

célula B normal com uma linha imortalizada de tumor de células B). Os anticorpos monoclonais apresentam maior especificidade que os policlonais, e maior afinidade por um epítopo específico. Deste modo, é possível o controle de propriedades como sensibilidade, seletividade, reprodutibilidade e estabilidade do sistema (GIL e KUBOTA, 1999; RICCARD et al., 2002).

Diversos tipos de imunossensores podem ser construídos, de acordo com o tipo de transdutor empregado e podem ser classificados com base no princípio da detecção. Essa, por sua vez, pode ser realizada de maneira indireta, quando o sinal é obtido através de um marcador, por exemplo, uma enzima (normalmente a peroxidase), uso de moléculas fluorescentes ou complexos inorgânicos eletroativos, ou de maneira direta, quando o sinal obtido resulta apenas da interação antígeno-anticorpo. Os principais transdutores empregados nessa detecção são os eletroquímicos (amperométricos, condutimétricos e potenciométricos), ópticos e piezoelétricos (LUPPA et al., 2001; THÉVENOT et al., 2001; RICCARDI et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2013).

3.2.2 Classificação quanto à natureza do transdutor

Quanto ao tipo de transdutor, os biossensores podem ser classificados, como: (1) piezoelétricos (variação de massa); (2) calorimétricos (transferência de calor); (3) ópticos (baseados em FRET, do inglês *Föster Resonance Energy Transfer* e ressonância de plasma de superfície, SPR, do inglês *Surface Plasmon Resonance*) e (4) eletroquímicos (baseados na corrente elétrica, condutividade, resistência elétrica, entre outras). Os transdutores piezoelétricos, também chamados de gravimétricos, são sensores acústicos ou ressonantes que utilizam cristais piezoelétricos e possuem a propriedade de converter um sinal elétrico em deformações (vibrações) mecânicas e vice-versa, e ao final geram uma mudança de sinal elétrico proporcional à quantidade de analito de interesse. Os sensores piezoelétricos mais comuns são os de microbalança de cristal de quartzo (QCM). Os transdutores calorimétricos por sua vez, medem o calor de uma reação química no elemento sensor, a qual leva a um aumento de temperatura que pode ser relacionada à concentração do analito alvo. Já, os transdutores ópticos exploram as mudanças nas propriedades ópticas do material sensoativo assim que expostos ao analito de interesse. Esse material sensoativo pode ser um polímero que contenha espécies cromóforas imobilizadas, por exemplo. Essas mudanças usadas para transdução do sinal são baseadas principalmente na absorbância, refletância, luminescência,

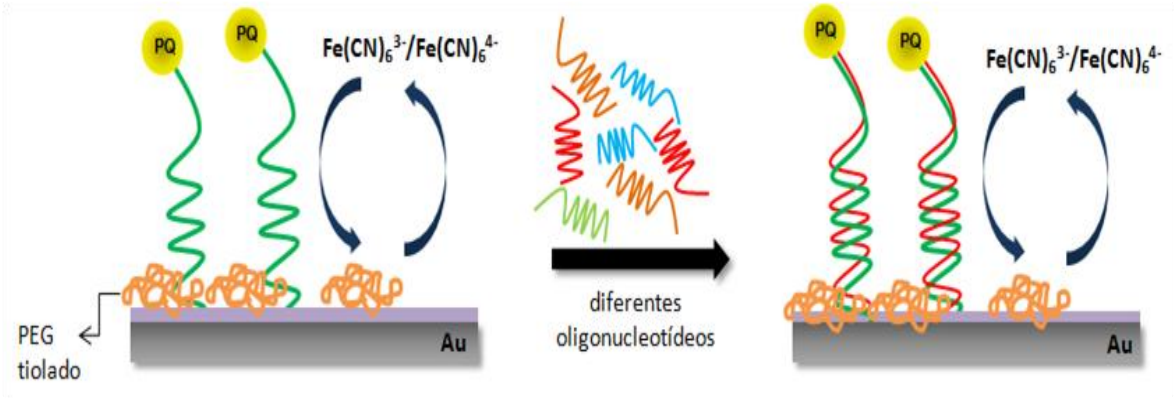
índice de refração e quimiluminescência, entre outros. Os transdutores eletroquímicos (detalhados na seção 3.3), que foram utilizados nesse trabalho, possuem a capacidade de medir as alterações elétricas do meio através da corrente, potencial e carga relacionadas a processos de reconhecimento biológico. Para o sinal ser captado e convertido em um sinal elétrico, o elemento biológico é fixado na superfície condutora (eletrodo, que em geral se constitui de materiais inertes - ouro, carbono vítreo, platina, dentre outros). Os transdutores eletroquímicos são bastante estudados, por apresentarem simplicidade nos testes analíticos e capacidade de detecção de concentrações muito baixas. Os transdutores podem ser subdivididos de três formas: (a) amperométricos, baseados na mensuração de corrente elétrica em função do processo de transferência de elétron das espécies eletroativas associadas à analito; (b) potenciométricos, relacionados com a variação do potencial elétrico a pequenas mudanças na concentração da molécula alvo e (c) condutimétricos, fundamentado na mudança da condutância do meio em consequência de uma reação biológica (GUILBAUT et al., 1992; KRÖGER e DANIELSSON, 1997; KRESS-ROGERS, 1998; ALFAYA e KUBOTA, 2002; HOCEVAR, 2011; MEDEIROS et al., 2012; SILVA, 2014).

3.3 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

Biossensores eletroquímicos, além de serem os pioneiros, são bastante práticos, por relacionarem os processos de reconhecimento biológico (mudança de concentração, transferência de elétron, etc) de maneira direta com propriedades elétricas (potencial, corrente ou carga). Quanto às subdivisões dos biossensores eletroquímicos, os condutimétricos são pouco utilizados, uma vez que, sofrem forte influência do meio (íons interferentes em solução). Os potenciométricos são mais usuais que a classe anterior por se basearem na relação entre a concentração e potencial do meio. De um modo geral, esses sistemas se baseiam em mudança da acidez do meio. Já os amperométricos apresentam uma grande versatilidade de aplicações, uma vez que, o processo de transferência de elétron entre a espécie eletroativa e superfície do eletrodo são sensíveis à concentração de um dado analito. Esse por sua vez, pode ser detectado por uma reação enzimática no meio (cargas geradas pelos produtos da reação e transferidas para a superfície do eletrodo), assim como exemplificado no esquema da **Figura 1**, caracterizando um método direto, ou por uma sonda eletroquímica (complexos inorgânicos), denominado de método indireto. Nesse último caso, o processo biológico é monitorado através de sua interferência na reação eletroquímica entre a sonda e a superfície, como por exemplo, um biossensor para detecção eletroquímica de

sequências de oligonucleotídeos utilizando pontos quânticos bioconjugados à oligonucleotídeos complementares, como observado na **Figura 4 (**PEREIRA et al., 2002).

Figura 4. Esquema de um processo de transferência de carga (elétron) entre a espécie eletroativa e a superfície do eletrodo, em que é caracterizado o método de detecção indireta.

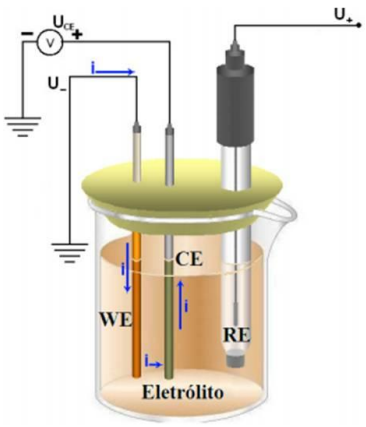


Fonte: Adaptada de KJÄLLMAN et al., 2010.

3.3.1 Técnicas eletroquímicas

As técnicas de investigação eletroquímicas variam bastante (voltametria linear, cíclica, e de pulso diferencial, espectroscopia de impedância eletroquímica, etc) e podem ser fundamentadas em processos baseados na aplicação de corrente direta (D.C.) ou alternada (A.C.). De modo geral, é aplicado um potencial ao sistema estudado e monitorada a corrente, ou do contrário, realizar um procedimento inverso (aplicar a corrente e monitorar o potencial). As medições experimentais são realizadas em uma célula eletroquímica contendo dois ou três eletrodos (**Figura 5**): (a) trabalho (WE), onde ocorrem os processos eletroquímicos de interesse; (b) referência (RE), que permite a aplicação de um potencial conhecido em relação ao eletrodo de trabalho e (c) auxiliar ou contraeletrodo (CE), utilizado para fluir a corrente do sistema, e em geral ocorrem processos eletroquímicos complementares para garantir a eletroneutralidade do sistema (PEREZ, 2000).

Figura 5. Célula eletroquímica contendo os eletrodos de trabalho (WE), eletrodo de referência (RE)e eletrodo auxiliar (CE).

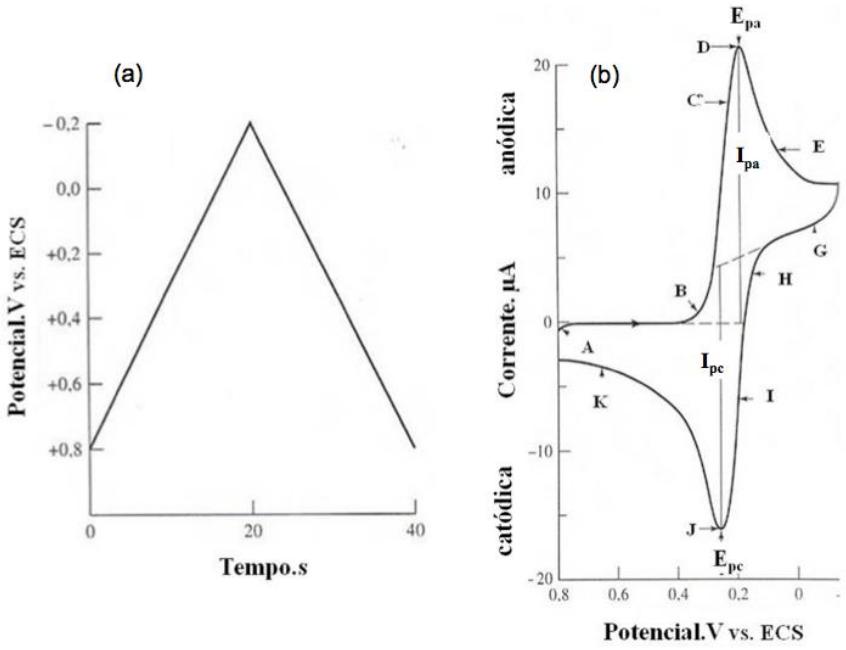


Fonte: Adaptada de PINTO., 2004.

As técnicas eletroquímicas são importantes ferramentas para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos, apresentando como vantagem a utilização de baixas quantidades de reagentes para análises e a facilidade em controlar as variáveis. Duas destas técnicas são a voltametria cíclica (VC - D.C.) e a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE -A.C.). A VC é o método eletroquímico mais versátil e simples, em que as informações em relação à concentração do analito resultam das avaliações da corrente em função do potencial aplicado ao eletrodo de trabalho. A corrente resultante é composta de duas frações: (a) faradáica (I_F), diretamente relacionada com a transferência de carga (ou elétron), e (b) capacitiva (I_C), que se relaciona à organização de moléculas e íons localizada na dupla camada do eletrodo (LOJOU e BIANCO, 2006; SILVA e MENEZES, 2014).

A aplicação de uma variação de potencial no sentido anódico ou catódico está associada a uma taxa de varredura constante, que é determinada até se obter um valor (potencial de inversão), para o qual o sentido da varredura é invertido (**Figura 6a**). O resultado, deste procedimento, é uma curva de corrente (I) em função do potencial (E), denominada de voltamograma cíclico (**Figura 6b**). Dessa forma, é feita uma associação visual entre um processo de transferência de carga (corrente faradáica) com o potencial. Os parâmetros mais importantes a serem observados e analisados, em um voltamograma cíclico, são os potenciais de pico catódico ($E_{p,c}$) e anódico ($E_{p,a}$) e das respectivas correntes de pico catódico ($I_{p,c}$) e anódico ($I_{p,a}$), onde a contribuição da corrente capacitiva são eliminadas por uso de linha de base, linhas pontilhadas da **Figura 6b** (BRETT e BRETT, 1993; BARD e FAULKNER, 2006; LOJOU e BIANCO, 2006; OLIVEIRA, 2008; HOLLER et al. 2009).

Figura 6. Princípio esquemático da voltametria cíclica (VC), (a) potencial variando com tempo (t) e (b) voltamograma cíclico de um sistema redox reversível (dois processos faradáicos, oxidação e redução).



Fonte: Adaptado de KISSINGER e HEINEMAN., 1983 e http://www.bas.co.jp/1113.html >. Acesso em: 23 set. 2015.

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) é um método bastante utilizado como técnica A.C. e, que ao contrário da VC, permite investigações não destrutivas, ou seja, é possível aplicar uma perturbação (E_{rms}, por exemplo) em torno de um potencial D.C. em que I_F (corrente Faradáica) é igual a 0 A. Sua versatilidade está associada à possibilidade de realizar o mesmo processo em um potencial D.C., em que existem reações faradáicas. Desse modo, esta ferramenta pode auxiliar na compreensão dos processos eletroquímicos envolvidos em superfícies modificadas química e eletroquimicamente (formação de SAMs, eletropolimerização, adsorção de proteína, etc). Assim como, em reações eletroquímicas ($I_F \neq 0$ A) que envolvem modificação na região de interface (sondas eletroquímicas, por exemplo). Entretanto, as interpretações físico-químicas do sistema dependem de modelos complexos, o que torna a técnica menos difundida que a VC. Por outro lado, a sensibilidade da técnica a mudanças na interface (espécie adsorvidas) é maior que a VC. Deste modo, a EIE pode ser utilizada como técnica complementar a VC, em que suas informações são associadas à estrutura da interface.

Experimentalmente, na EIE é aplicado um potencial A.C. sobre o eletrodo de trabalho em uma célula eletroquímica (**Figura 5**) e a corrente (I_{rms}) A.C. é então monitorada (**Eq. 3** e **4**). Essa técnica espectroscópica consiste na investigação dos fenômenos

eletroquímicos (transferência de carga ou processos capacitivos) em termos da variação da I_{rms} e θ, que é o ângulo de fase entre o potencial aplicado e a corrente lida, juntamente com os valores da frequência, *f* (PARK e YOO, 2003).

$$E(t) = E_{rms}\, sen(2\pi f t) \qquad \textbf{(Eq. 3)}$$

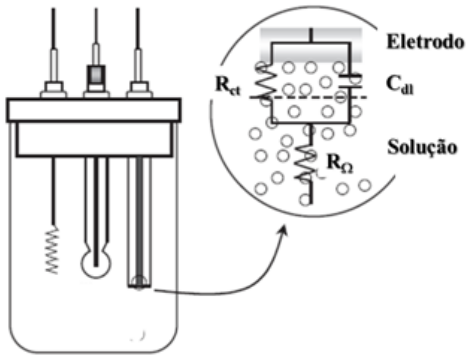
$$I(t) = I_{rms} sen(2\pi f t + \theta) \qquad \textbf{(Eq. 4)}$$

Por definição, podemos escrever as grandezas (I_{rms}, θ e *f*) em termo de uma função resistiva (denominada de impedância, Z(t)) como:

$$Z(t) = E(t)/I(t) \qquad \textbf{(Eq. 5)}$$

As análises de impedância (como na VC) podem ser feitas na presença de uma sonda eletroquímica ($Fe(CN)_6^{4-}/Fe(CN)_6^{3-}$), em que os modelos teóricos são bem sedimentados e podem ser descritos pelo circuito equivalente de Randles (**Figura 7**). Nessa representação a interface pode ser constituída por uma capacitância de dupla-camada (C_{dl}) em paralelo com a resistência de transferência de carga (R_{ct}), e a impedância de Warbug (W), que representa os processos de difusão das sondas redox na solução. Este elemento caracteriza a existência de uma resistência devido ao transporte de massa da espécie oxidada (ou reduzida) na interface eletrodo/solução que limita a passagem de corrente no processo faradáico. Este comportamento é caracterizado por um ângulo de fase de 45^o (RANDLES, 1948). Nesse contexto, mudanças na interface do eletrodo de trabalho, como moléculas imobilizadas, podem ser detectadas através da variação nos resultados em relação ao sistema sem modificação.

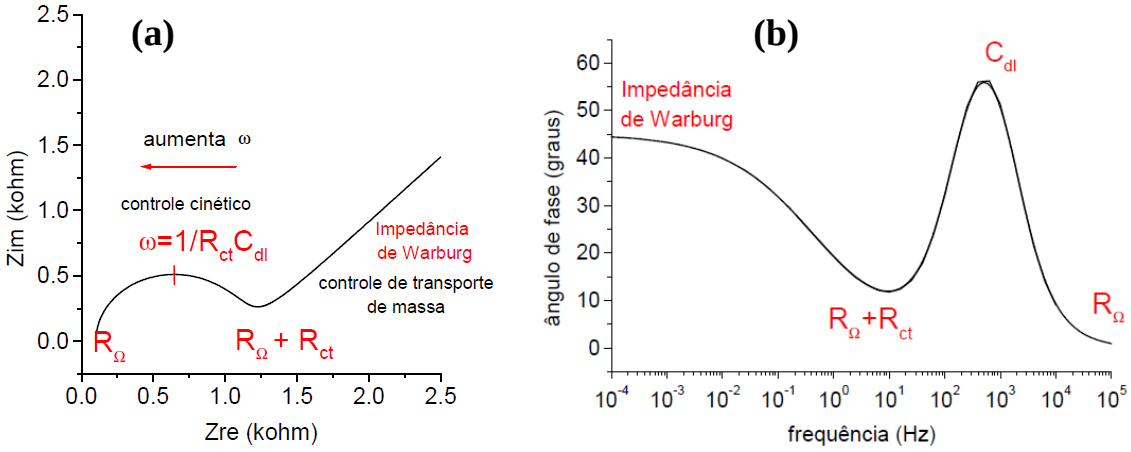
Figura 7. Representação da interface eletrodo de trabalho-solução para um sistema com sonda eletroquímica ($Fe(CN)_6^{4-}/Fe(CN)_6^{3-}$) por um circuito Randles.



Fonte: Adaptada de BRETT, 1996.

Existem duas formas de representação dos dados de impedância, visto na **Figura 8**. O diagrama de Nyquist, que é a parte imaginária (-Z") em função da parte real (Z') (**Figura 8a**) ou de Bode, em que são apresentados os valores absolutos da impedância (|Z|) ou ângulo de fase (θ) em função de f (**Figura 8b**) (KATZ e WILLNER, 2003; K'OWINO e SADIK, 2005; PARK e YOO, 2003).

Figura 8. Representação dos dados de impedância. Em (a) diagrama de Nyquist, que é a parte imaginária (-Z") em função da parte real (Z'), e (b) diagrama de Bode, em que são apresentados os valores absolutos da impedância (|Z|) ou ângulo de fase (θ) em função de f.



Fonte: Adaptada de UETA .,2002.

O gráfico de Nyquist tem um segmento inicial em semicírculo cujo diâmetro é dado pelos valores de R_Ω e R_{ct}, observado em altas frequências, que correspondem aos processos de transferência de elétrons e uma porção reta que representa os processos de transferência de elétrons limitados pela difusão (chegada e saída de elétrons na superfície), e que ocorrem em baixas frequências. A primeira região a descrição do semicírculo começa com um deslocamento no eixo x, devido a R_Ω, e passa por um máximo que é igual a $\omega=1/R_{ct}.C_{dl}$. O diâmetro do semicírculo corresponde à R_{ct} e seu tamanho aumenta com a espessura da camada formada pela modificação do eletrodo e pode ser usada para avaliar a cinética de formação da mesma. Diferentemente de R_Ω que permanece constante apesar das mudanças que estão ocorrendo na superfície do eletrodo. Na parte linear do gráfico ou na região de controle de transporte de massa se observa a impedância de Warbug. A inclinação da reta é igual a 1, se somente tiver a influência de Z_W. Os dados de impedância também podem ser representados através do gráfico de Bode (**Figura 8b)**, onde os valores de amplitude e ângulo de fase são adquiridos em relação aos valores de frequência. Nesse caso, o ângulo de fase para os componentes resistivos se aproxima de 0º, os capacitivos de 90º e para a impedância de Warbug de 45º (PARK e YOO, 2003; K'OWINO e SADIK, 2005).

3.3.2 Imobilização do biorreceptor ao transdutor eletroquímico modificado

Na tecnologia de biossensores, a imobilização do elemento biológico aparece como um dos fatores determinantes no desenvolvimento desses dispositivos, para os quais são importantes a estabilidade, o tempo de estocagem, a sensibilidade, a seletividade, o tempo de resposta pequeno e a reprodutibilidade. O bom funcionamento de um biossensor depende da escolha adequada desse método de imobilização, uma vez que envolve a manutenção da estrutura, função e atividade biológica. Aqui serão abordadas duas destas estratégias de incorporação da biomolécula ao transdutor eletroquímico: (a) adsorção (física ou química) e (b) ligação covalente entre o elemento biológico e o transdutor (OLIVEIRA et al., 2013; MOZAZ, 2014).

A adsorção física (fisiossorção) é baseada em interações eletrostáticas (cargas elétricas, dipolo-dipolo), hidrofóbicas (caráter hidrofóbico da superfície), forças de Van der Waals e/ou de London, enquanto que, a química (quimiossorção) está associada a ligações químicas. No caso eletrostático (fisiossorção), os grupos carboxílicos (cargas negativas, $-COO^-$) ou aminas (cargas positivas, $-NH_3^+$), presentes nas biomoléculas, interagem diretamente com a carga superficial do eletrodo. Este tipo de adsorção é fortemente dependente de propriedades físico-químicas da solução (força iônica, temperatura, etc) em que o biossensor vai ser aplicado, como por exemplo, o valor do pH (relacionado ao ponto isoelétrico da proteína) que pode promover dessorção do elemento biológico. Já na quimiossorção ocorre uma ligação química entre o biorreceptor e a superfície, que é uma ligação de natureza mais forte (maior energia) que a de fissiossorção, desfavorecendo o processo de dessorção. Entretanto, a quimiossorção pode levar à formação de monocamadas com baixa densidade de biomoléculas adsorvidas. Um exemplo, desse processo pode ser a formação de ligação entre grupos tióis, presentes nos elementos biológicos, e a superfície do eletrodo de ouro. Nesse contexto, apesar do método de adsorção ser simples, economicamente satisfatório e necessitar de pouca preparação (dispensa outros reagentes), apresenta limitações, como no caso da fisiossorção, que dependendo da molécula, ocorre de maneira fraca ou na quimiossorção, que pode se dar de maneira desordenada. Esse conjunto de fatores pode não garantir um sistema estável e reprodutível (BUCKO et al., 2012; SASSOLAS et al., 2012).

A ligação do tipo covalente ocorre por meio de agentes de acoplamento, os quais são mediadores da interação entre os grupos funcionais presentes no material biológico e os grupos funcionais da estrutura de suporte presente na superfície modificada do eletrodo (por exemplo -OH, $-NH_2$, -COOH, -SH). Podem ser formadas interações entre grupos

(carboxílicos e aminas, por amina-amina e até por amina-tiol) por via de ligação química. Para a ligação do tipo covalente, os agentes de acoplamento (ou ligação) mais utilizados são: (a) EDC(1-etil-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida e (b) Sulfo-NHS (N-hidroxisuccinimida). Esses agentes são altamente reativos promovendo formação de grupos amidas entre os funcionalizantes carboxílicos e aminas. Também, pode ser utilizado o glutaraldeído que faz ligações entre grupos amina de duas moléculas diferentes, promovida pela formação da base de Schiff. Além do glutaraldeído, é possível utilizar o Sulfo-SMCC para promover a ligação entre aminas presentes na superfície com sulfidrilas da biomolécula. Para que a imobilização do elemento biológico ocorra de maneira mais eficiente, as superfícies dos eletrodos podem ser funcionalizadas com os grupos ativos, sendo as estratégias mais comuns à utilização de SAMs (do inglês *self-assemble monolayer*s) e polímeros. O principal objetivo dessa modificação é controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução como maneira de alterar a reatividade e seletividade do sensor favorecendo assim o desenvolvimento de eletrodos para vários fins (HERMANSON, 2008).

Na utilização da SAMs sobre a superfície, o procedimento de imobilização geralmente envolve duas etapas separadas. Na primeira, ocorre a formação da SAMs, geralmente utilizando-se pequenas moléculas contendo tiol numa extremidade e um grupo funcional (carboxílico ou amina) na outra. A segunda etapa envolve a reação do elemento de reconhecimento com o grupo funcional da SAMs imobilizada na superfície modificada. A monocamada é orientada sobre a superfície do eletrodo e esta permite uma melhor ligação antígeno-anticorpo. Nesse contexto, todas as possibilidades, acima comentadas, podem ser aplicadas a tais sistemas, entretanto existe a limitação da superfície do eletrodo ser propícia à formação de SAMs. Para tanto, o eletrodo mais utilizado é o de ouro, que permite a formação dessas monocamadas automontadas através da adsorção química dessas pequenas moléculas contendo tiol, de forma reprodutível e ordenada (RICCI et al., 2012).

Outra possibilidade de funcionalização de eletrodos se dá por meio da formação de filmes poliméricos. Nesse caso as superfícies eletródicas mais utilizadas são [platina, ITO (óxido de índio e estanho), grafite, carbono vítreo, entre outros]. Em se tratando de modificações de superfícies eletroquímicas, os polímeros têm atraído interesse como matrizes para imobilização de biomoléculas. Assim, os polímeros servem como intermediários na interação entre receptor e analito, e na transdução do sinal. Essa estratégia tem sido utilizada no desenvolvimento de sensores para proteger a superfície dos eletrodos de impurezas, bloquear interferentes, imobilizar biocomponentes, incorporar mediadores e fornecer biocompatibilidade para que o elemento biológico não seja lixiviado para a solução. Dessa

forma, qualquer tipo de tecnologia nesse campo de conhecimento é dependente da compreensão das interações a nível molecular entre as espécies biológicas e a matriz polimérica. Existe uma variedade de polímeros utilizados para a modificação de superfícies eletródicas devido as suas propriedades eletroquímicas, tais como polianilina, politiofeno e o polipirrol que vem sendo investigado em várias aplicações. Uma das vantagens do polipirrol em relação aos outros polímeros é a possibilidade do uso de solventes e de diferentes contra-íons durante sua síntese, o que pode afetar também às suas propriedades. Esses polímeros podem ser sintetizados por via química ou eletroquímica, sendo a maneira mais comum a eletropolimerização, no qual o polímero é obtido na forma de um filme sobre a superfície do eletrodo, a partir da formação de monômeros. Essa técnica de eletropolimerização tem sido amplamente utilizada, a fim de produzir filmes de polímeros de boa qualidade em superfícies metálicas que podem ser utilizados para inclusão ou imobilização de nanomateriais, bem como de uma ampla variedade de espécies biológicas, podendo aumentar a condutividade e a sensibilidade para o sistema de biossensoriamento (PEREIRA et al., 2002; COSNIER, 2003; OLIVEIRA et al., 2013).

3.4 NANOTECNOLOGIA E BIOSSENSORES

A constante busca por dispositivos cada vez menores e com características específicas, tem sido um dos principais objetivos nas áreas tecnológicas e científicas do século XXI. Dessa forma, a nanotecnologia tem se tornado um dos campos mais importantes e pode ser definida como a ciência envolvida na concepção, síntese, caracterização e aplicação de materiais em escala de dimensões físicas nanométricas. Uma das vantagens dos nanomateriais é apresentar propriedades físico-químicas diferentes daquelas quando estão em escala macroscópica ou microscópica. Como relatado por Sahoo (2007), o prefixo "nano" corresponde à escala para a qual um nanômetro (1 nm) equivale a um bilionésimo de metro (10^{-9} m) e diante dessa dimensão é que foi proposto o nome de nanomateriais (CHAN, 2006; BERGMANN, 2008; PEREIRA, 2009; WANG, 2009; MARTINS e TRINDADE, 2012).

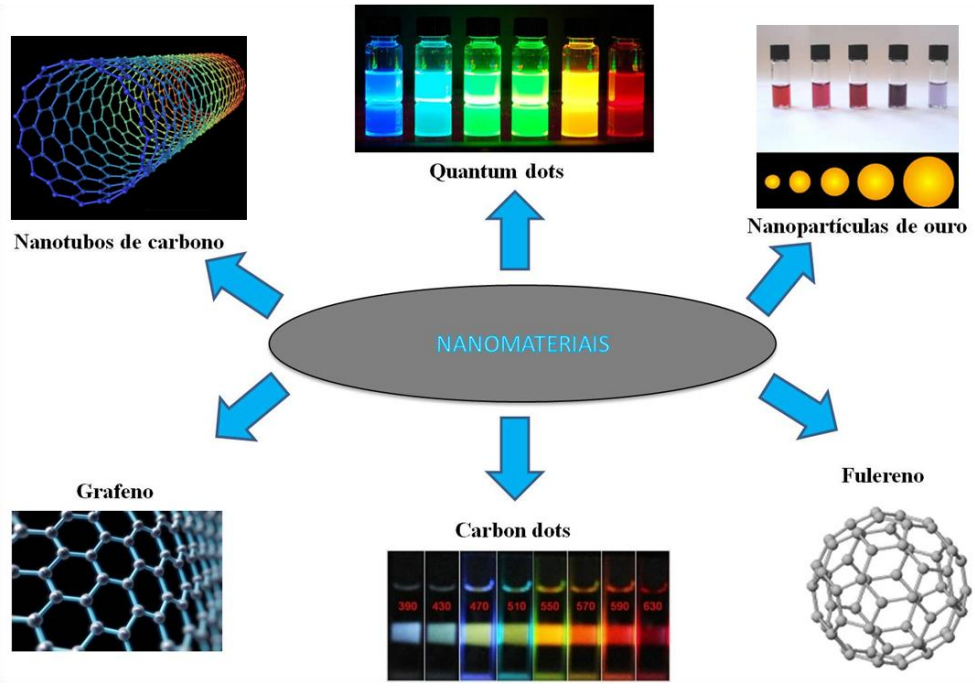
3.4.1 Nanomateriais

Quando os materiais têm pelo menos uma de suas dimensões físicas de 1 a 100 nm são chamados de nanomateriais. Um material com apenas uma dimensão na escala nanométrica é chamado nanofilme, com duas dimensões é denominado nanofio (por exemplo, os nanotubos

de carbono) e com três dimensões é chamado nanopartícula (por exemplo: fulerenos, dendrímeros ou pontos quânticos) (TISCHER et al., 2012).

As características destes nanomateriais, tais como, propriedades semicondutoras/condutoras ou sua alta resistência à tensão física, entre outras, vêm sendo exploradas para o aperfeiçoamento de biossensores. A utilização de alguns desses nanomateriais pode melhorar a sensibilidade do biossensor, promovendo um aumento da área reativa através da imobilização de biomoléculas de maneira mais eficiente. Dentre os nanomateriais que têm sido mais empregados em biossensores ganham destaque as nanopartículas metálicas (ouro, prata, entre outros), nanopartículas semicondutoras (pontos quânticos e *carbon dots*), outros nanomateriais a base de carbono (nanotubos de carbono, grafeno e fulerenos) e as nanopartículas poliméricas (**Figura 9**) (LIU e LIN, 2007; SAHOO et al., 2007; JUBETE et al., 2009).

Figura 9. Exemplos de nanomateriais. Em particular cada um deles apresentam características únicas e vantagens na aplicação de modificação de superfícies para biossensores, proporcionando principalmente um aumento da área superficial do sensor.



Fonte: RIBEIRO., 2015.

Um dos nanomateriais, que vem ganhando destaque e importância na nanotecnologia, é o nanotubo de carbono (CNT), o qual é um nanofio constituído por arranjos hexagonais de carbono, formando uma folha de grafeno, que se enrola para formar cilindros com diâmetros na ordem de nanômetros e comprimento variando de nanômetros a centímetros. Em relação a

sua estrutura, podem ser divididos em: nanotubos de carbono de parede simples (*single walled carbon nanotubes*, SWCNTs), que são formadas por folhas simples de grafeno, ou de múltiplas paredes (*multiple walled carbon nanotubes*, MWCNTs), que são formados por folhas de grafeno enroladas concentricamente) (LAHIFF et al., 2010; D'ORAZIO, 2011).

De acordo com Silva et al. (2013), os nanotubos de carbono têm atraído atenção devido às suas extraordinárias propriedades, incluindo a sua capacidade de mediar a transferência de elétrons, proporcionar um aumento da área do eletrodo e uma diminuição do tempo de resposta para biossensores, possibilitando assim alcançar boa sensibilidade com baixos limites de detecção. Além disso, eles têm atraído uma série de esforços na pesquisa básica, devido às suas propriedades físicas e químicas únicas, podendo ser aplicados para fins biomédicos, como entrega de drogas, nanoinjetores, fototerapia e produção de imagens artificiais (GOMES FILHO et al., 2013; KRUSS et al., 2013; FREITAS, et al., 2014).

Alguns trabalhos recentes vêm trazendo aplicações de nanotubos de carbono em biossensores. No trabalho relatado por Gomes Filho et al. (2013) foi proposto o desenvolvimento de um imunossensor utilizando nanotubos de carbono para a detecção de troponina T (TnT). Para isso, filmes de polietilenoimina foram utilizados para ancoragem dos nanotubos de carbono carboxilados e para a imobilização da anti-TnT sobre a superfície. Outro trabalho foi relatado por Garcia Aljaro et al. (2010) que desenvolveram um biossensor utilizando nanotubos de paredes múltiplas (MWCNTs) para detecção rápida de agentes patogênicos de *Escherichia coli* (sorotipo *E. coli* O157:H7) e do bacteriófago T7. Além dessas, outras aplicações para esse nanomaterial vêm sendo exploradas como as relatadas por Hedge (2009), tais como: suporte para eletrodos supercapacitivos, pontas para *cantilevers* de microscopia de força atômica (AFM) e retificadores eletrônicos, entre outros.

Outro nanomaterial que vem sendo bastante explorado é a nanopartícula de ouro, devido à sua fácil preparação, estabilidade, funcionalização química da superfície bem estabelecida e propriedades óptico-eletrônicas únicas. Suas propriedades ópticas vêm sendo exploradas em biossensores por SPR. Nesse caso, quando a luz é absorvida e espalhada por essas nanopartículas, oscilações coletivas dos elétrons livres presentes na sua superfície são geradas, as quais são chamadas *plasmons*. Essas oscilações são dependentes não só da constituição, do tamanho e da forma da nanopartícula, como também da constante dielétrica do meio e da distância entre as partículas. Já em relação às propriedades eletroquímicas, as nanopartículas de ouro apresentam uma pequena razão área/volume, que pode atribuir uma maior área superficial ao eletrodo, as quais aliadas às suas propriedades condutoras inerentes têm levado a várias aplicações em biossensores amperométricos (LUO et al., 2006).

Um trabalho recente utilizando essas nanopartículas foi relatado por Mashhadizadeh e Talemi (2014), em que foi desenvolvido um biossensor eletroquímico para detecção do vírus da hepatite B (HBV-DNA). As nanopartículas de ouro funcionalizadas foram eletrodepositadas em um eletrodo de ouro que posteriormente foi funcionalizado com uma monocamada automontada de mercapto-benzaldeído. Esse ácido foi aplicado como intermediário para imobilizar covalentemente, através do grupo amina, o DNA-HBV à superfície do eletrodo de ouro modificada. Outro trabalho foi relatado por Liu et al. (2014), que desenvolveram um genossensor *label-free* (livre de marcadores) eletroquímico, altamente sensível para detecção de microRNAs (miRNAs), que é importante para o diagnóstico e prognóstico do câncer, servindo como confiável biomarcador molecular.

Dentro desse contexto, a associação desses nanomateriais a métodos de diagnóstico e terapia, tem proporcionado o desenvolvimento de tecnologias mais eficientes, que sejam rápidas, sensíveis e úteis para a detecção, tratamento e prevenção de doenças, principalmente as que apresentam alta mortalidade. Recentemente, um tipo de nanopartícula que vem sendo estudada para aplicação em biossensores é o *quantum dot*, também chamado de ponto quântico (DRBOHLAVOVA et al., 2009; WALKEY et al., 2009; WANG et al., 2009; JUSTINO et al., 2013; CANCINO et al., 2014).

3.4.2 Pontos Quânticos

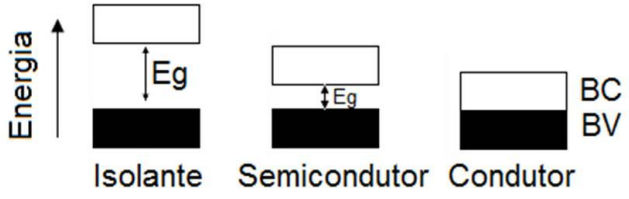
Dentre as nanopartículas que vêm sendo investigadas estão os nanocristais fluorescentes de semicondutores, chamados de pontos quânticos (PQs) ou *quantum dots* (QDs), os quais vêm atraindo interesse em diversas áreas, como, por exemplo, a de energia, medicina, informática, segurança, ambiente, indústria, dentre outras (MARTINS e TRINDADE, 2012).

Os PQs são cristais fluorescentes de semicondutores em escala nanométrica (nanocristais), com tamanhos que podem variar de 2 a 10 nm. Estes são constituídos de poucas centenas ou milhares de átomos e apresentam propriedades diferentes quando comparados aos mesmos cristais em escala macroscópica. Essas novas características físico-químicas que esses materiais semicondutores (já bem conhecidos na escala macroscópica) adquirem quando rescalonados nanometricamente, os fazem obter grande potencial para aplicações em diferentes áreas da pesquisa sendo, por exemplo, bastante utilizados como marcadores biológicos fluorescentes em Ciências da Vida para investigação de processos biológicos *in vitro* e *in vivo* (SILVA et al., 2010; FONTES e SANTOS, 2014).

Isso se deve ao fato destes apresentarem propriedades, tais como: (1) largo espectro de absorção, o que permite a excitação de diferentes PQs simultaneamente, somente com uma fonte de luz; (2) um estreito espectro de emissão, que propicia a análise multicolorida, sem que haja sobreposição espectral; (3) emissão de luz em diferentes regiões do espectro, variando-se apenas o tamanho da partícula, possibilitando sintonizar a emissão dos PQs em vários comprimentos de onda distintos, que podem ir desde regiões do azul até ao infravermelho próximo (NIR); (4) o efeito de fotodegradação da luminescência é cerca de 100 vezes menor nos PQs do que nos corantes orgânicos, o que permite que eventos sejam analisados em tempo real por longos períodos; (5) superfície ativa para conjugação com diversas biomoléculas, além de (6) apresentarem propriedades semicondutoras que vêm também sendo exploradas em dispositivos óptico-eletrônicos (MEDINTZ et al.; 2005, MICHALET et al., 2005; RESCH-GENGE et al., 2008; SUKHANOVA e NABIEV, 2008).

Os materiais de estado sólido podem ser divididos quanto à condutividade elétrica em: condutores, semicondutores e isolantes. A condutividade de um sólido pode ser descrita com base na diferença de energia entre a banda de valência (BV) totalmente ocupada por elétrons e uma banda de condução (BC) que não é ocupada por elétrons, embora a excitação térmica possa permitir que seja parcialmente ocupada, em casos específicos, como em materiais condutores. A separação entre as bandas ocorre por meio do *band gap* de energia (Eg) e é tipicamente expressa em elétron-volt (eV) e determina o mínimo de energia que deve ser fornecido para que os elétrons passem da BV para a BC, como mostra a **Figura 10**. Os semicondutores apresentam um *band gap* intermediário, sendo possível promover os elétrons para a BC, necessitando de uma Eg normalmente menor que 3 eV, neste caso, para alguns materiais é então possível utilizar a luz no visível, por exemplo, para que essa transição ocorra à temperatura ambiente (SMITH et al., 2004).

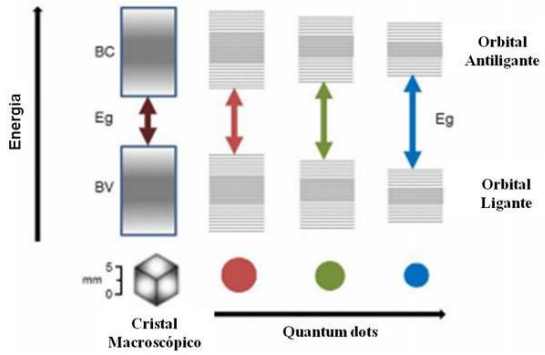
Figura 10. O diagrama esquemático mostra os *band gaps* (E_g) em materiais sólidos e sua classificação em isolantes, semicondutores ou condutores. As bandas de valência estão abaixo das bandas de condução para cada tipo de material, e a ocupação dos elétrons é representado por sombreado preto.



Fonte: Adaptado de SMITH et al., 2004.

Assim, quando os materiais semicondutores recebem alguma energia externa suficiente para promover um elétron da banda de valência (BV) para a banda de condução (BC), forma-se um par elétron-lacuna na rede cristalina. Este par elétron-lacuna é denominado de éxciton, e pode ser descrito, em analogia a um sistema hidrogenóide, por um raio excitônico de Bohr (r_B), que é característico para cada material semicondutor. A recombinação dos elétrons excitados na BC, com os buracos da BV gera uma emissão de radiação eletromagnética característica, chamada de fluorescência (MARTINS e TRINDADE; 2012). Dessa forma, quando as três dimensões de um cristal semicondutor são menores que o raio de Bohr pode se dizer que a estrutura se encontra em regime de confinamento quântico tridimensional e uma das consequências desse efeito é a presença de níveis discretos de energia (**Figura 11)**. Quando esse confinamento quântico é tridimensional, temos os pontos quânticos, e pela presença desses estados discretos, eles também são chamados de átomos artificiais (BRUS, 1994; MARTINS e TRINDADE, 2012).

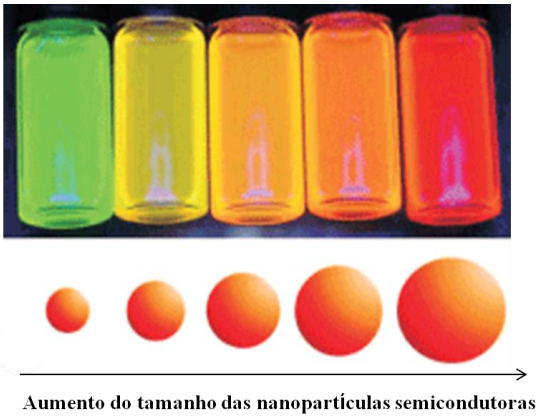
Figura 11. A diminuição do tamanho das nanopartículas, em regime de confinamento quântico, acarreta o aparecimento de níveis discretos de energia e no aumento do *band gap*.



Fonte: Adaptado de JONATHAN., 2003.

Além da discretização dos estados energéticos, o confinamento quântico também gera como consequência o alargamento do *band gap*, de acordo com a diminuição do tamanho dos PQs. Com isso é possível sintonizar a região do espectro eletromagnético que os PQs irão emitir, através do controle do tamanho do nanocristal. Assim, quanto menor a partícula de um dado semicondutor, maior é a Eg e mais próxima da região do azul (menores comprimento de onda) é sua emissão. Enquanto para partículas maiores, menor é Eg e devem apresentar luminescência mais para o vermelho (**Figura 12**) (SANTOS et al., 2008).

Figura 12. Representação de pontos quânticos, emitindo fluorescência em diversas regiões do espectro de luz visível, relacionada com a variação no tamanho dos nanocristais. Quanto menor o tamanho da partícula mais deslocado para o azul será a sua emissão, e quanto maior o tamanho, mais deslocada para o vermelho.

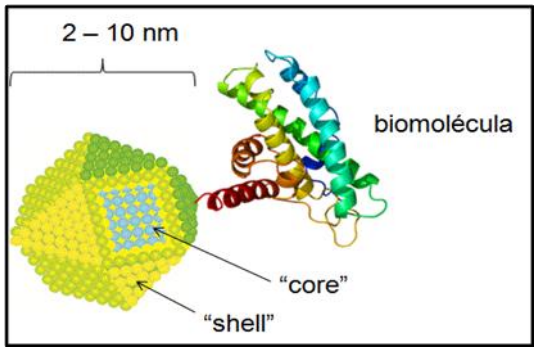


Fonte: Adaptado de SILVA et al., 2010.

Algumas vias de síntese estão disponíveis para obtenção desses nanocristais. Podem ser realizadas através do: (1) método *top-down*, que utiliza técnicas físicas em que os nanocristais podem ser crescidos por litografia, por exemplo, ou (2) método *bottom-up* que emprega técnicas de química coloidal. Esta última rota sintética é a mais utilizada para a produção de PQs, no qual as nanopartículas são formadas a partir dos átomos como precursores. Esse método de síntese química se baseia numa reação de precipitação controlada, feita em água ou solventes orgânicos, a fim de se obter nanocristais com tamanhos relativamente uniformes de forma controlada. Pontos quânticos de CdTe (Telureto de Cádmio) sintetizados em água por química coloidal, são os tipos de nanocristais mais utilizados nas aplicações biológicas. Na sua síntese, simplificadamente, a nucleação é a primeira etapa e ocorre quando há injeção rápida do precursor calcogênio (tal como o Telúrio) em uma solução homogênea de elevada concentração dos monômeros precursores (tal como o Cádmio), a pH controlado e seguida por um período de refluxo em temperatura próxima da ebulição da água. A concentração dos precursores e a velocidade de reação diminuem à medida que se formam os núcleos iniciais das nanopartículas. Essa etapa determina o número de nanocristais e, em grande parte, o seu tamanho médio, já que núcleos pré-formados crescem gerando nanopartículas isoladas, as quais vão crescendo por consumo dos reagentes. Nesse sistema é de grande importância a presença de um agente estabilizante, tal como o ácido mercaptossuccínico - AMS), que vai se ligar à superfície das nanopartículas, com finalidade de prevenir aglomeração de nanopartículas e precipitação (SILVA et al., 2010; MARTINS e TRINDADE, 2012).

Ao final da síntese, de QDs de CdTe por exemplo, o núcleo da nanopartícula está recoberto por uma "casca" (CdS), ou seja, o núcleo está passivado e os nanocristais resultantes apresentam uma estrutura física do tipo *core/shell* (núcleo/casca). A passivação refaz ligações não compartilhadas que possam existir na superfície do núcleo do nanocristal. Essas ligações são chamadas defeitos e podem reduzir a intensidade da fluorescência desses nanocristais, devido à formação de níveis intermediários de energia entre a BV e a BC. Dessa forma, os PQs apresenta uma nanoestrutura complexa, formados por várias camadas sendo: (1) o núcleo da nanopartícula responsável pela região da emissão; (2) a camada de passivação, responsável pela qualidade dessa emissão e a camada orgânica (mais externa), composta pelo agente estabilizante (também chamado funcionalizador), responsável pela estabilidade química e também por fazer a ponte com biomoléculas para investigações com especificidade bioquímica nos sistemas de interesse **(Figura 13)**. Essa camada orgânica favorece a possibilidade de conjugação do nanocristal às biomoléculas, tais como anticorpos, proteínas, enzimas ou lectinas, que vão dar um direcionamento biológico mais específico para essa nanopartícula (FONTES et al., 2012; MARTINS e TRINDADE, 2012; ANDRADE et al., 2013).

Figura 13. Estrutura de um PQ representado pelo núcleo da nanopartícula recoberto por uma camada de passivação (casca). Na superfície do nanocristal estão moléculas que conferem grupos funcionais ao PQ que interagem com a molécula alvo por meio de conjugações.

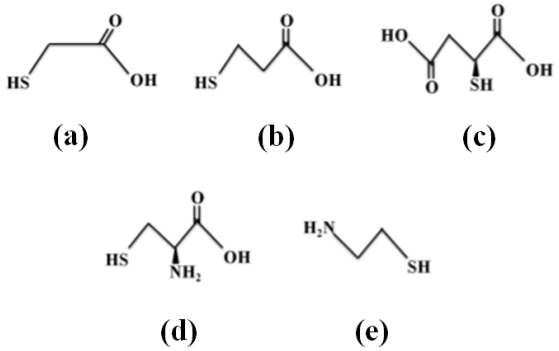


Fonte: Adaptado de MEDINTZ et al., 2004.

Na síntese aquosa dos PQs, tais como os de CdTe, são utilizados estabilizantes que apresentam grupamento tiol (–SH) em uma das extremidades. Moléculas contendo esses grupamentos são ótimos estabilizantes de nanopartículas, pois o enxofre ajudará compor a camada de passivação (se ligando, por exemplo a átomos de Cádmio não compartilhados da superfície) e o restante da molécula conferirá cargas (positivas ou negativas) às partículas, mantendo-as em suspensão, além de possuir grupos que podem ser ativados para conjugação

com biomoléculas. Dentre os agentes estabilizantes mais utilizados, estão: os carboxilados (ácido mercaptoacético (AMA) ou ácido tioglicólico (TGA), o ácido 3-mercaptopropiônico (AMP), o ácido mercaptosuccínico (AMS), e os aminados (L-cisteína (CIS) e a cisteamina (CISTM) que se ligam à superfície das partículas **(Figura 14)** com o objetivo de prevenir aglomeração de nanopartículas e precipitação e, desligam-se para não inibir o crescimento (SILVA et al., 2010 e MARTINS, 2012).

Figura 14. Fórmulas estruturais dos agentes estabilizantes carboxilados e aminados utilizados para obtenção de PQs: (a) Ácido mercaptoacético (AMA) ou ácido Tioglicólico, (b) ácido 3-mercaptopropiônico (AMP), (c) ácido mercaptosuccínico (AMS), (d) cisteína (CIS) e (e) cisteamina (CISTM).



Fonte: Adaptado de FILHO., 2013.

Dessa forma, os PQs têm atraído o interesse de pesquisadores e vêm sendo aplicados em: ensaios bioanalíticos; imagens *in vitro* de células a tecidos; imagens *in vivo* de pequenos animais; diagnóstico de câncer e outras doenças, e recentemente, até mesmo para modificação de superfícies em biossensores ópticos e eletroquímicos (SMITH et al., 2004; MEDINTZ et al., 2006; HUANG et al., 2010; FONTES et al., 2012; ANDRADE et al., 2013; WEGNER e HILDEBRANDT, 2015).

3.4.3 Aplicações de pontos quânticos em biossensores

Os PQs apresentam propriedades semicondutoras e ópticas, que vêm sendo exploradas há quase três décadas. Entretanto, nos últimos anos é que seu potencial para o desenvolvimento de biossensores começou a ser investigado. Esse interesse se deve ao fato desses nanocristais apresentarem algumas vantagens para a sua exploração, em biossensores ópticos e eletroquímicos, pois podem propiciar: (a) um aumento da área superficial do eletrodo, decorrente do tamanho reduzido desses nanocristais; (b) síntese mais limpa, simples e de menor custo, quando comparada a outros nanomateriais, como, por exemplo, os

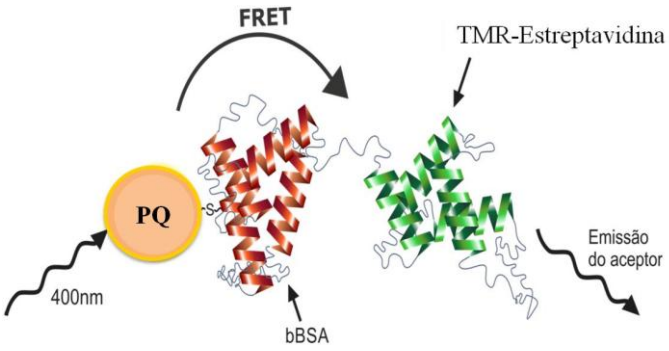
nanotubos de carbono; (c) imobilização de maneira mais organizada na superfície sensora, devido a sua forma isotrópica e (d) no final da síntese os PQs apresentam grupos funcionais (aminas e/ou carboxílicos) em sua superfície, possibilitando a conjugação com biomoléculas e com o transdutor (FRASCO e CHANIOTAKIS, 2009; SONG, 2011).

Nos biossensores ópticos, os PQs têm sido empregados através do fenômeno FRET. Lembrando que o FRET resulta na fluorescência de uma molécula aceptora (um anticorpo associado a um fluoróforo, por exemplo) quando uma molécula doadora (um antígeno associado a um fluoróforo, por exemplo) é excitada através de luz. FRET só ocorre se a molécula aceptora e a doadora estiverem a uma distância menor que 5 nm e se a fluorescência da molécula doadora tiver superposição com a absorção da molécula aceptora. Assim, no que se refere aos imunossensores, FRET só acontece quando o antígeno e anticorpo estiverem ligados, indicando assim a presença do analito, sendo o sinal de fluorescência observado proporcional à quantidade do mesmo. O uso de PQs como doadores em FRET oferece alguns benefícios em comparação aos fluoróforos convencionais: (1) uma vez que eles apresentam largo espectro de absorção, ajudam a otimizar a superposição da absorção dos aceptores com a fluorescência dos doadores; (2) pela mesma característica de seu espectro de absorção, PQs também possibilitam a excitação do doador longe do pico de absorção do aceptor (minimizando erros devido à excitação direta do aceptor) e (3) PQs habilitam a utilização de múltiplos aceptores ao seu redor aumentando a eficiência do FRET e, consequentemente a efetividade do biossensor (MEDINTZ et al., 2006; RESCH-GENGER et al., 2008; MA e SU, 2011).

Já nos biossensores eletroquímicos, os PQs, por serem feitos de semicondutores, podem também atuar de maneira semelhante aos nanotubos de carbono, ou seja, podem aumentar a área eletroativa do sensor. Neste contexto, esses nanocristais vêm sendo estudados em biossensores amperométricos e impedimétricos. Recentemente, a deposição de polímeros funcionalizados vem sendo utilizada em superfícies sensoras como uma forma de melhorar a imobilização dos PQs ao eletrodo e sua conjugação a biomoléculas. Dessa forma, se investiga a utilização das propriedades eletroquímicas dessas nanopartículas para converter informações físicas e químicas em um sinal analítico mensurável. O uso de PQs em biossensores ópticos já está mais estabelecido, no entanto, na área eletroquímica ainda encontra-se em desenvolvimento (FANG e HU, 2009; MEDEIROS et al., 2012; OROZCO, 2012).

As primeiras aplicações de PQs em biossensores ópticos foi baseada em FRET, tendo como trabalho pioneiro o de Willard e co-autores (2001). Os autores mostraram que a ligação específica entre a albumina de soro bovino biotinilada (bBsA) e a estreptavidina marcada com tetrametilrodamina (TMR) pode ser correlacionada, de maneira quantitativa, com a fluorescência por meio de FRET, como observado na **Figura 15**. De acordo com os resultados, a ligação entre o bBSA e a estreptavidina marcada resulta em uma mudança da intensidade de fluorescência em resposta à concentração (16 – 160 nmol L^{-1}).

Figura 15. Aplicação de PQs de CdSe/ZnS em biossensor baseado em FRET com estreptavidina-rodamina.



Fonte: Adaptado de WILLARD et al., 2001.

Outros estudos mostraram diferentes tipos de PQs para detectar ligação específica antígeno-anticorpo (WANG et al., 2002). Ma e Su (2011), em seu trabalho, relataram também PQs conjugados a sequências de nucleotídeos, onde estes participavam do processo de hibridização com uma sequência de interesse. Quando a hibridização ocorreu, uma mudança na fluorescência emitida foi observada, podendo ser considerado um potencial biossensor para análises de sequência de DNA.

Além disso, alguns trabalhos já relataram estudos iniciais envolvendo a aplicação de PQs em biossensores eletroquímicos. Hansen et al. (2006) utilizaram PQs de CdS (sulfeto de cádmio) para detecção de lisozima e de PbS (sulfeto de chumbo) de trombina, empregando aptâmeros. Outro exemplo, é o trabalho de Pinwattana et al. (2010), os quais desenvolveram um imunossensor eletroquímico baseado em PQs de CdSe/ZnS (seleneto de cádmio/sulfeto de zinco) para detecção da albumina de soro bovino fosforilada, que pode ser utilizado como um biomarcador. Para isso, os autores, conjugaram os PQs a anticorpos secundários anti-fosfoserina. Posteriormente, a proteína fosforilada foi adicionada a micropoços de poliestireno, e em seguida, o imunossensor com PQs conjugados a anti-fosfoserina foi colocado em contato para completar o reconhecimento imunológico e haver a mudança de

sinal por via eletroquímica. Os autores indicam que foi possível detectar a presença da albumina fosforilada utilizando PQs por análise eletroquímica.

Kjällman et al. (2010) investigaram o uso dos PQs associados às SAMs, sendo os PQs de CdTe ligados covalentemente às sondas para detecção de oligonuleotídeos (fragmento curto de uma cadeia simples de ácido nucleico) complementares utilizando como controle oligonucleotídeos não complementares. Este estudo focou a resposta de um sensor eletroquímico modificado com PQs de CdTe e DNA *hairpin* (estrutura em que ocorrem emparelhamento de pares de base intramoleculares). A detecção neste exemplo utilizou a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica. O sensor mostrou uma detecção confiável e sensível.

Além dessas aplicações citadas anteriormente, há uma tendência de usar as propriedades ópticas do biossensor em conjunto com as propriedades semicondutoras. Um exemplo é o trabalho de Li et al. (2012), que utilizaram trombina imobilizada por aptâmeros numa superfície de ITO (óxido de índio e titânio). Nesse trabalho, os PQs de CdSe foram depositados sobre o ITO, e em seguida, os grupos funcionais dos PQs foram ativados com EDC e NHS, e a superfície foi imersa em uma solução contendo os aptâmeros. Além disso, o trabalho permitiu o estudo das características ópticas dos PQs (intensidade de fluorescência), e de suas propriedades eletroquímicas, decorrente de sua característica semicondutora. Os resultados mostraram que o sensor baseado em aptâmeros tinha boa especificidade, estabilidade e reprodutibilidade para a trombina. Esses estudos são importantes pois mostram que os PQs têm potencial para serem utilizados em biossensores ópticos e eletroquímicos. Embora o uso dos PQs em biossensores ópticos esteja de certa forma consolidado, sua utilização em biossensores eletroquímicos e duais (ópticos/eletroquímicos) é recente e há ainda muito a ser investigado.

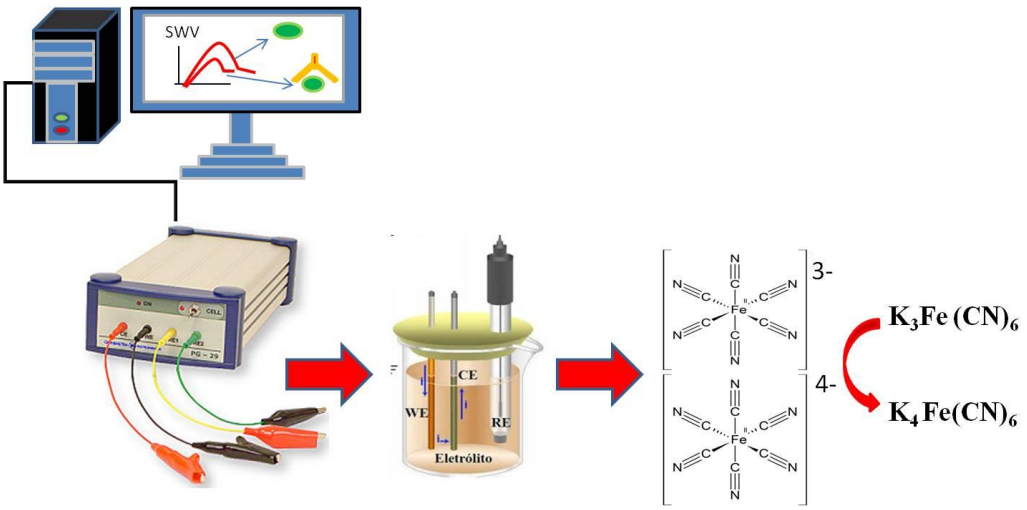
Dentro desse contexto, o presente trabalho objetivou utilizar esses pontos quânticos em superfícies eletródicas, a fim de investigar o seu papel nessas plataformas biossensoras eletroquímicas, através de sua imobilização em eletrodo de carbono vítreo modificado por polipirrol aminado, com posterior imobilização do anticorpo IgG para teste da plataforma.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS E MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

Os estudos eletroquímicos foram realizados em uma célula eletroquímica convencional de compartimento único com três eletrodos: um eletrodo de carbono vítreo (ECV), como eletrodo de trabalho, um fio de platina helicoidal como eletrodo auxiliar e um eletrodo de Ag/AgCl, em KCl 3 M, como referência. Foi utilizado um potenciostato/galvanostato Princeton Applied Research (PAR) VersaStat 3.0 acoplado a um microcomputador e controlado pelo software de aquisição de dados VersaStudio 2.41.2 e Metrohn Autolab PGSTAT128N. As caracterizações eletroquímicas foram realizadas em solução 0,1 mol L^{-1} de KCl (99%, Nuclear), contendo 1 mmol L^{-1} de $K_4Fe(CN)_6$ (98%, Vetec)/$K_3Fe(CN)_6$ (99%, Sigma-Aldrich), temperatura de 25 ºC e desareada com gás inerte (N_2), por no mínimo 10 min (**Figura 16**). Foram utilizadas técnicas de voltametria cíclica (VC) na faixa de potencial de – 0,3 a 0,7 V, velocidade de varredura (v) de 0,1 V s^{-1}, durante 2 ciclos, e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) realizada em um potencial estático aplicado ($E_{apl.}$) de 0,21 V, com perturbação (E_{rms}) de 10 mV (sendo $E_{apl.}$ o potencial de equilíbrio da interface ECV/polímero/Solução) na faixa de frequência de 10.000 a 0,1 Hz.

Figura 16. Equipamentos e procedimentos eletroquímicos utilizados na caracterização do sistema.

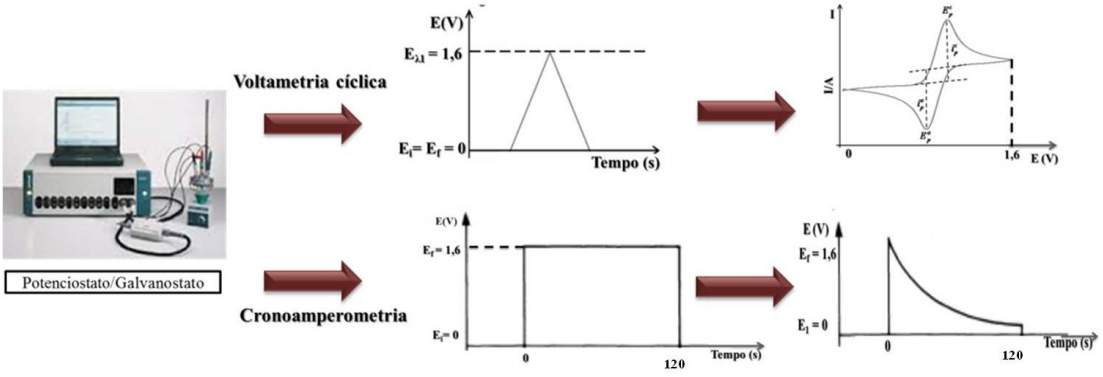


Fonte: RIBEIRO., 2015.

4.2 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE CARBONO VÍTREO COM POLIPIRROL AMINADO

Inicialmente, o ECV foi mecanicamente polido usando alumina (Al_2O_3) com 0,3 μm de diâmetro, em feltro (Fortel), durante 5 min, e lavado com água ultrapura (resistência de 18 MΩ, Purelab UHQ, Elga) para retirada do excesso de alumina da superfície e caracterizado eletroquimicamente por CV e EIE como descritas anteriormente. O processo de polimerização eletroquímica do 2-(1H-Pirrol-1-il) etanoamina (polipirrol aminado, PY_{Am}) sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo foi inicialmente estudado por voltametria cíclica, na região de potencial de 0 V a 1,6 V e, v = 0,01 V s^{-1} a fim de determinar a região em que ocorre o processo de polimerização. Posteriormente, o potencial de polimerização adquirido, foi aplicado para a técnica de cronoamperometria nas seguintes condições: **(a)** 10 mmol L^{-1} de PY_{Am}, por um tempo de 120 s; **(b)** 2 mmol L^{-1} de PY_{Am}, por um tempo de 120 s e **(c)** 2 mmol L^{-1} de PY_{Am}, por um tempo de 480 s, realizadas em HNO_3 0,1 mol L^{-1} a fim de testar a condição favorável para posterior imobilização da nanopartícula, representada no esquema da **Figura 17.** Após a formação do filme polimérico, a superfície modificada (ECV/PPY_{Am}) foi lavada com água ultrapura e transferida para outra célula eletroquímica e caracterizada por VC e EIE, como já descrito, sendo as análises realizadas em triplicata.

Figura 17. Técnicas eletroquímicas para modificação da superfície de carbono vítreo com polipirrol aminado.



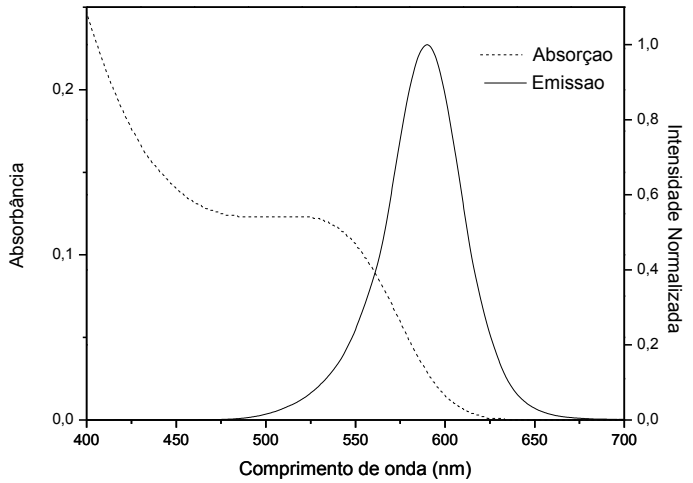
Fonte: RIBEIRO, 2015.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS PONTOS QUÂNTICOS

Os PQs de CdTe, estabilizados/funcionalizados com AMS, foram sintetizados e preparados pelo grupo de Nanotecnologia Biomédica através de metodologias já descritas (CABRAL et al., 2016). Após as sínteses, foram feitas as caracterizações ópticas dos PQs por

espectroscopias de absorção e de emissão, utilizando, respectivamente, o espectrofotômetro UV-Vis 1800 (Shimadzu) e o espectrofluorímetro LS 55 (Perkin Elmer), com excitação em 365 nm. A partir do primeiro máximo do espectro de absorção, pode-se ter uma estimativa do tamanho, bem como, da concentração dos nanocristais como descrito por Yu et al. (2003). Enquanto que, pelo espectro de emissão, pode-se calcular a largura à meia altura (FWHM, do inglês *full width at half maximum*), que revela informações sobre os defeitos de superfície dos PQs (DAGTEPE et al., 2007; ROGACH et al., 2007). Os PQs utilizados nesse trabalho apresentaram primeiro máximo em absorção em 530 nm, sendo o tamanho dos PQs de aproximadamente 3,0 nm. Estimou-se que a concentração das suspensões foi de aproximadamente: 7 x 10^{14} partículas mL^{-1} ou 7 µM. Já o espectro de emissão indicou um máximo em 589 nm com FWHM = 46 nm, como observado na **Figura 18.**

Figura 18. Espectros de absorção e emissão dos pontos quânticos.

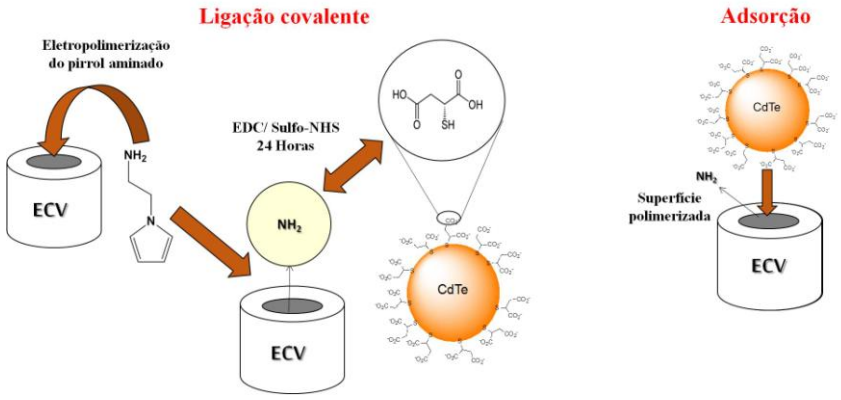


4.4 IMOBILIZAÇÃO DOS PONTOS QUÂNTICOS SOBRE A SUPERFÍCIE POLIMERIZADA

Os PQs foram imobilizados por meio do uso de agentes de acoplamento (ligação covalente) e diretamente sobre a superfície de carbono vítreo polimerizada (adsorção). No primeiro caso, o eletrodo de carbono vítreo modificado (ECV/PPY_{Am}) foi imerso em uma solução contendo 2 mmol L^{-1} de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e 5 mmol L^{-1} de sal de sódio N-hidroxisuccinimida (Sulfo-NHS), ambos da Sigma Aldrich, juntamente com 500 µL dos PQs (CdTe-AMS), por 24 horas, a fim de formar uma ligação amida entre os grupos carboxílicos presentes nos pontos quânticos e os grupos aminas presentes na superfície modificada pelo Polipirrol aminado. Para os estudos de adsorção o ECV e o ECV/PPY_{Am} foi imerso diretamente na suspensão dos PQs por 24 horas, como

mostra o esquema da **Figura 19**. Vale salientar que o pH da solução de PQs de CdTe com emissão no laranja foi previamente ajustado para aproximadamente 5,5 utilizando o próprio agente funcionalizante/estabilizante (AMS) diluído a 4,9% (m/v), e em seguida foram adicionados em colunas de ultrafiltração (10 kDa, Vivaspin, *GE Healthcare*) para serem lavados por centrifugação, 2500 RPM por 3 min, com o intuito de retirar o excesso de estabilizante da nanopartícula. A caracterização da plataforma (ECV/PPY_{Am}/PQs) foi realizada por voltametria cíclica e por EIE nas mesmas condições anteriores, sendo as análises realizadas em triplicata.

Figura 19. Esquema da imobilização dos pontos quânticos sobre a superfície polimerizada.



Fonte: RIBEIRO, 2015.

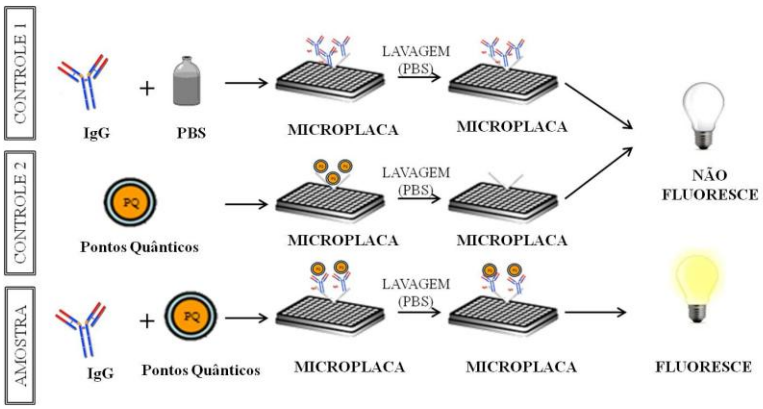
4.5 ESTUDOS DE MICROPLACAS APLICADOS À IMOBILIZAÇÃO DO ANTICORPO IgG AOS PONTOS QUÂNTICOS

Para a imobilização dos anticorpos à superfície nanoestruturada, foram realizados em paralelo, estudos da bioconjugação em meio homogêneo. Para isso, foi utilizado o método baseado em ensaio fluorescente em microplaca (EFM) desenvolvido pelo grupo (CARVALHO, 2014). O método de conjugação baseia-se na afinidade da proteína pela microplaca de poliestireno (microplaca preta, com 96 poços, Optiplate F HB - *PerkinElmer*). Assim, apenas os PQs que estiverem conjugados ao anticorpo ficarão aderidos na placa e emitirão sinal fluorescente, uma vez que o anticorpo sozinho se adere a microplaca, entretanto não fluoresce, já os PQs sozinhos não se aderem e são, portanto retirados durante a lavagem como exemplificado na (**Figura 20**). A medição foi feita no leitor de microplaca por fluorescência VICTOR2 HR4000 (*Perkin Elmer*).

Durante o processo, foram adicionados em cada poço, 200 µL de cada sistema [PQs com agentes de acoplamento (EDC e Sulfo-NHS), o anticorpo IgG (*human serum* - Sigma Aldrich) e os conjugados de PQs-IgG, em triplicata], e a placa foi incubada em banho-maria a 37 °C por 2 h. Após a incubação, os poços foram lavados três vezes com PBS (Tampão Fosfato Salino). As leituras dos sinais dos PQs-anticorpos, e seus controles, foram realizadas utilizando o filtro de excitação P405 (405 nm/5 nm) e filtro de emissão F595 (595 nm/30 nm), cw (*continous wave*) da lâmpada = 20000 e 1 s (*counting time*). A intensidade do sinal dos poços é proporcional ao número de conjugados aderidos à microplaca, assim, quanto mais alto for o sinal da fluorescência significa que mais eficiente foi a bioconjugação. O cálculo é feito pela diferença relativa das médias da fluorescência (FL) do bioconjugado em relação à média de FL de seus controles, como indica a (**Eq. 6**) abaixo:

$$FL\ Relativa\ (\%) = \frac{(FL\ Bioconjugado - FL\ Controles)}{FL\ Controles} x100 \qquad \textbf{(Eq. 6)}$$

Figura 20. Método baseado em ensaio fluorescente em microplaca (EFM).



Fonte: Adaptado de CARVALHO et al., 2014.

Onde, FL Bioconjugado refere-se à fluorescência média dos poços contendo PQs-anticorpo, já FL controles refere-se à fluorescência média dos controles de cada bioconjugado (anticorpo e PQs separadamente). De acordo com Carvalho et al. (2014) para haver conjugação os valores da FL Relativa devem ser maiores que 100% (valor estabelecido empiricamente), assim quanto maior o sinal, mais eficiente é a bioconjugação.

Como forma de otimizar o sistema, foram utilizadas variações de EDC e Sulfo-NHS, bem como do anticorpo, como visto na **Tabela 1**. Para todos os ensaios foram utilizados 1 mL de PQs na diluição de 1:7. Os PQs foram colocados em contato com as IgG por 24 h a 4 °C antes das análise serem realizadas.

Tabela 1. Variações de EDC e Sulfo-NHS e anticorpo IgG para conjugação homogênea do sistema.

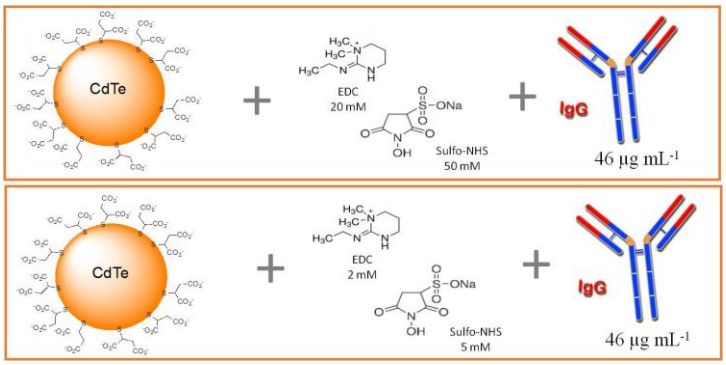
EDC e Sulfo-NHS	IgG
2 mmol L^{-1} e 5 mmol L^{-1}	46 µg mL^{-1} e 91 µg mL^{-1}
10 mmol L^{-1} e 25 mmol L^{-1}	46 µg mL^{-1}
20 mmol L^{-1} e 50 mmol L^{-1}	46 µg mL^{-1} e 91 µg mL^{-1}

A partir dessas variações foi possível testar as diferentes condições experimentais, a fim de correlacionar a conjugação no meio homogêneo e heterogêneo, e desenvolver um método objetivando otimizar com maior rapidez a plataforma biossensora, uma vez que o ensaio da microplaca permite o estudo de até 96 variações simultaneamente, o que não é possível com os eletrodos.

4.6. IMOBILIZAÇÃO DO ANTICORPO SOBRE A SUPERFÍCIE MODIFICADA COM PONTOS QUÂNTICOS

As condições de imobilização do anticorpo no eletrodo foram adquiridas por meio do estudo da microplaca, não só para correlacionar as análises, mas também objetivando ter um maior número de anticorpos IgG conjugados. A imobilização dos anticorpos foi avaliada de forma covalente (uso de EDC e Sulfo-NHS) e também por adsorção. Para os estudos por meio da ligação covalente foram utilizados as maiores e menores concentrações de EDC e Sulfo-NHS e a mesma concentração de IgG, representado na **Figura 2.**

Figura 21. Conjugação do Anticorpo IgG utilizando a maior e menor concentração de agentes de acoplamento

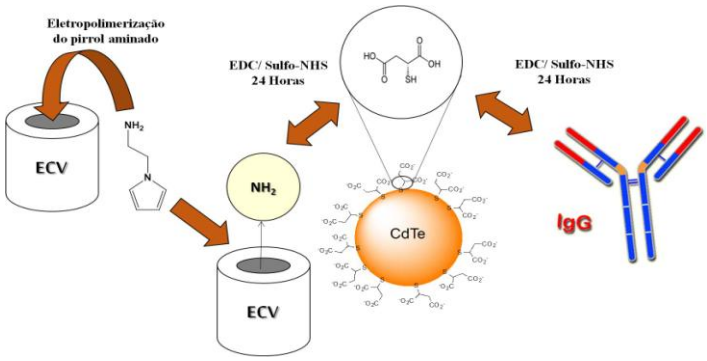


Fonte: RIBEIRO, 2015.

Nesse caso, a superfície modificada (ECV/PPY_{Am}/PQs) foi imersa em soluções contendo a menor concentração de EDC e Sulfo-NHS, 2 mmol L^{-1} e 5 mmol L^{-1}, ou a maior

concentração: 20 mmol L^{-1} e 50 mmol L^{-1}, e 46 µg mL^{-1} do anticorpo IgG, diluídos em solução de PBS, por um período de 24 h (baseados na **Tabela 1**). A imobilização foi decorrente da ligação covalente entre grupos carboxílicos dos PQs imobilizados na superfície do eletrodo e as porções do terminal amina do anticorpo IgG, como mostra o esquema representado na **Figura 22.**

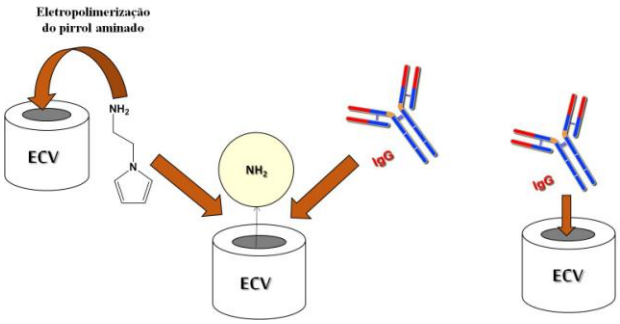
Figura 22. Esquema da imobilização por ligação covalente do anticorpo IgG sobre a superfície nanoestruturada.



Fonte: RIBEIRO, 2015.

Para estudos de adsorção o ECV foi imerso diretamente em 46 µg mL^{-1} do anticorpo IgG diluído em PBS, por 24 horas, sem o uso de EDC e Sulfo-NHS. A superficie modificada (ECV/PPY_{Am}) também foi imersa nessas mesmas condições de adsorção (**Figura 23**). As caracterizações nessa etapa também foram realizadas por VC e EIE, sendo as análises realizadas em triplicata

Figura 23. Esquema da imobilização do anticorpo IgG sobre a superfície de CV e a superfície polimerizada por adsorção.

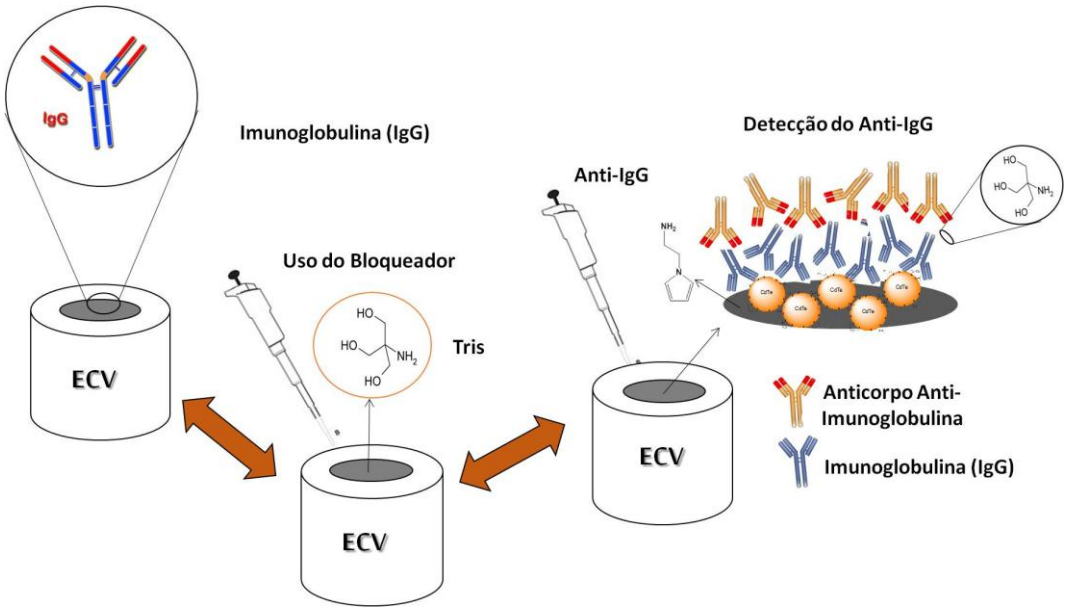


Fonte: RIBEIRO, 2015.

4.7 DETECÇÃO DO ANTI-ANTICORPO (ANTI-IgG)

Para verificar a eficiência da plataforma biossensora desenvolvida, previamente foi gotejado sobre a superfície modificada (ECV/PPY_{Am}/PQs/Ac), 10 µL de TRIS base (1mg mL^{-1}) (*Ultra Pure Grade*, 1 mM) como bloqueador de ligações inespecíficas entre o antígeno e os grupos funcionais presente nos PQs que possam estar ainda ativados. Dessa forma, o bloqueamento foi realizado para que a ligação entre o anticorpo IgG e o anti-IgG ocorra de maneira específica. Após o uso do TRIS, foram realizadas sucessivas medições, utilizando o anti-IgG (*anti-Human* IgG (H+L) fragmento da porção F(ab')2 - Sigma Aldrich). Para isso, foram gotejados 10 µL de anti-IgG (1 ng mL^{-1}), diluído em PBS sobre a superfície do eletrodo, a cada 30 minutos **(Figura 24),** sendo caracterizada por espectroscopia de impedância eletroquímica. Foram realizadas 6 incubações, em duplicata, a fim de testar a detecção.

Figura 24. Esquema da detecção do anti-anticorpo IgG sobre a superfície bloqueada com TRIS.



Fonte: RIBEIRO, 2015.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

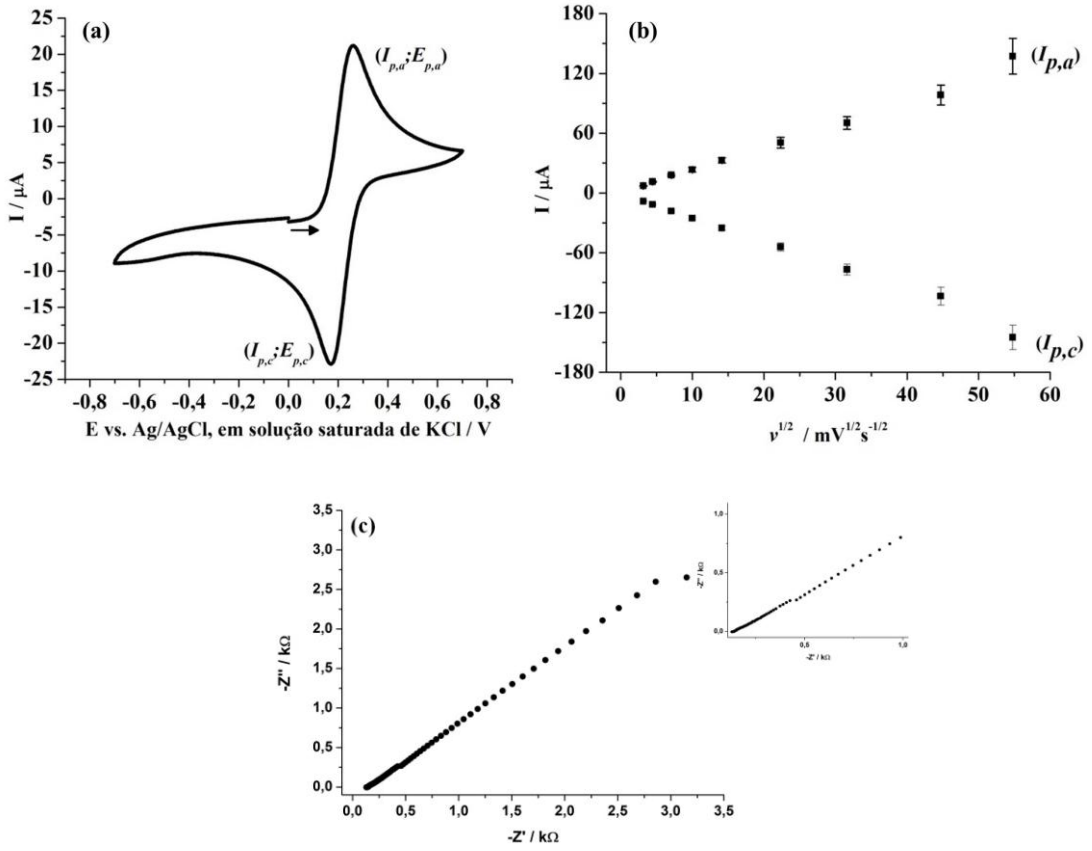
No presente trabalho, realizamos a imobilização, por uso de ligação covalente através do uso de agentes de acoplamento que permitem a formação de ligações amidas entre os grupos funcionais ativos, do anticorpo IgG à superfície de carbono vítreo (transdutor eletroquímico) modificada com PQs (CdTe-AMS) contendo grupos funcionais carboxílicos. Esse processo de imobilização foi realizado em etapas: (a) a superfície de carbono vítreo passou por uma eletropolimerização do monômero 2-(1H-Pirrol-1-il)etanoamina (PY_{Am}), seguido da (b) imobilização do CdTe-AMS, através do uso de EDC e Sulfo-NHS e por (c) imobilização do anticorpo IgG. Nessa última etapa, foi utilizada a metodologia de microplacas para buscar a melhor condição de imobilização do anticorpo IgG ao CdTe-AMS e utilizou-se os resultados obtidos em meio homogêneo (solução) às condições heterogêneas (interface superfície-solução). O uso de microplacas para encontrar condições ideais e/ou verificar a ocorrência de imobilização de PQs a proteínas, em meio homogêneo, foi desenvolvida pelo grupo em trabalhos anteriores (CARVALHO et al., 2014; CABRAL FILHO et al., 2015). Já a sua extrapolação para sistemas heterogêneos, vem criando uma perspectiva de redução do tempo de investigação em sistemas interfaciais, uma vez que a verificação fica limitada a disponibilidade de equipamento (eletrodo, potenciostato, etc) e ao preparo da superfície modificada (que pode variar entre 24 e 72 h). Todas as etapas de modificação da superfície estudada foram monitoradas por uso, de uma sonda eletroquímica (processo reversível de oxidação e redução de uma dada espécie eletroativa) já conhecida na literatura. O sistema escolhido foi o ferri/ferrocianeto de potássio ($[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$), o qual apresenta um processo reversível de transferência de elétrons que é controlado por difusão (transporte das espécies eletroativas do interior da solução para a superfície do eletrodo), segundo Bard e co-autores (BARD e FAULKNER, 2001).

5.1. COMPORTAMENTO DA SONDA ELETROQUÍMICA DIANTE DA SUPERFÍCIE DE CARBONO VÍTREO

A **Figura 25**, mostra o perfil eletroquímico (voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica) do sistema $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ diante da superfície de carbono vítreo. Para obtenção dos parâmetros associados aos processos de oxidação e redução, dos voltamogramas **(Figura 25a)**, foi utilizada uma linha de base para cada respectiva curva observada. Deste modo, foi possível determinar os valores da corrente $I_{p,a}$ e $I_{p,c}$, a razão entre

eles ($I_{p,a}/I_{p,c}$ ~ 1,057) e os valores da diferença entre os $E_{p,a}$ (0,255 V) e $E_{p,c}$ (0,176 V) de aproximadamente 0,079 V. Nos dois últimos casos, quando comparamos nossos valores aos da literatura ($I_{p,a}/I_{p,c}$ = 1 e $E_{p,a} - E_{p,c}$ = 0,057 V), concluímos que o tratamento aplicado à superfície de carbono vítreo não afeta o processo de transferência de carga. Essa consideração está associada a um erro relativo de aproximadamente 6% nos valores medidos de $I_{p,a}/I_{p,c}$, além disso, a diferença entre $E_{p,a} - E_{p,c}$, para o tipo de superfície estudada, apresenta uma dependência com o tratamento utilizado, sendo comum encontrar valores superiores a 0,070 V (NOEL e ANANTHARAMAN, 1985). Na análise da curva apresentada na **Figura 25b**, observamos o comportamento linear das correntes anódica ($I_{p,a}$) e catódica ($I_{p,c}$) em função de $v^{1/2}$ (raiz quadrada da velocidade de varredura, $mV^{1/2}s^{-1/2}$), o que indica um processo controlado por difusão que oferece informações sobre o transporte das espécies eletroativas à superfície. Esse comportamento é observado em superfícies eletródicas não modificadas (superfície limpa).

Figura 25. Perfil eletroquímico da interface carbono vítreo em solução de 1 mmol L^{-1} de $FeK_4(CN)_6/FeK_3(CN)_6$ em KCl 0,1 mol L^{-1} a T = 25 ºC: (a) voltamograma cíclico a v = 0,1 V s^{-1}, (b) $I_{p,a}$ e $I_{p,c}$ vs. $v^{1/2}$, juntamente aos resultados de (c) espectroscopia de impedância eletroquímica (E_{rms} = 10 mV vs. referência), segundo a representação de Nyquist.



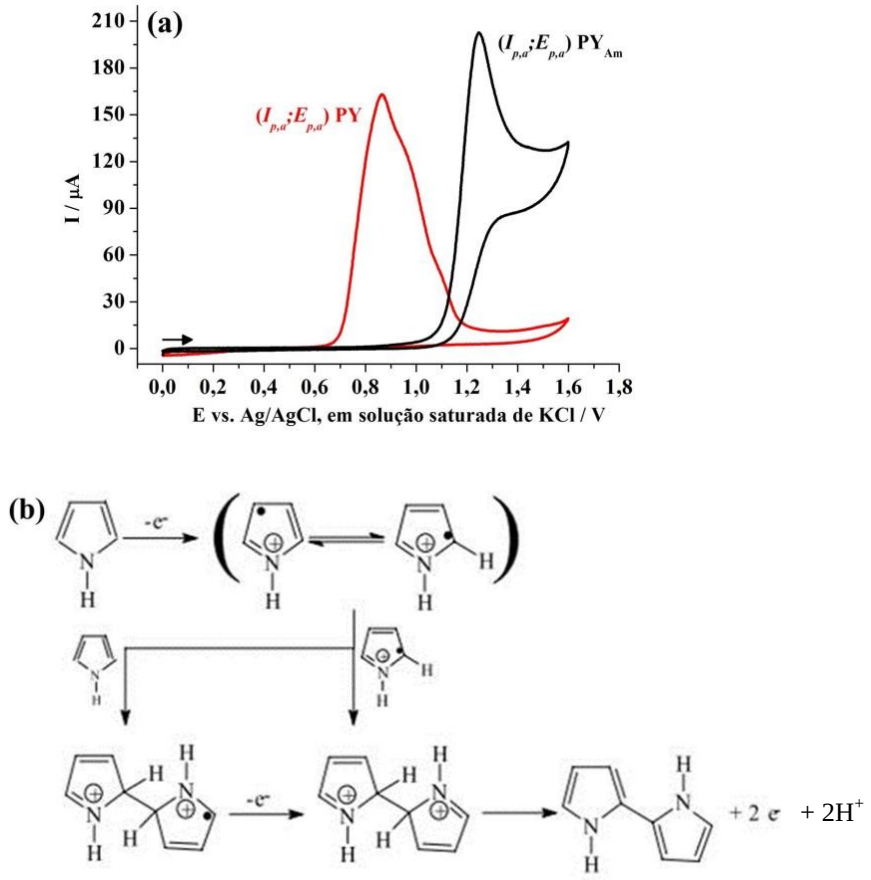
Dos dados de espectroscopia de impedância eletroquímica (**Figura 25c**), é possível extrair, por simulação do gráfico de Nyquist duas grandezas físicas: (1) a resistência de transferência de carga (R_{ct}), região onde o semicírculo toca a intersecção, e a capacitância (C) = $1/(2\pi fR)$, que é a constante de relaxação associada ao ponto de máximo do semicírculo. No entanto, o uso desse procedimento é limitado para sistemas controlados por difusão, com baixa resistência de transferência de carga (R_{ct}) e capacitância de dupla camada (**Figura 25c**), o que promove um erro relativo alto nessa determinação. Deste modo, não foram obtidos valores de R e C para esse sistema diante da sonda $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$. Porém, dentro de uma análise qualitativa, podemos observar que as tendências vistas na voltametria cíclica são reforçadas pelos dados de espectroscopia de impedância eletroquímica, vista a partir da ausência de semicírculo, dado o fato de que quase toda região é controlada por difusão (região linear do espectro) e que essa tem forte influência na região de transferência de carga (região não linear do espectro). Essas grandezas físicas também foram extraídas através do gráfico Z' vs. *f* e da derivada da curva -Z" vs. *f*, por meio da simulação ($Z'(f) = Z'(\infty) + Z'(\sim 0)e^{-(f/\tau)}$), que traz a resistência (R = Z'(~0), região de frequência em que existe platô) e o $\tau = 1/(2\pi f)$. A partir desses valores é possível também calcular a capacitância (C) do sistema por $C= 1/(2\pi fR)$ ver **Apêndices**. Nesse contexto, usaremos as grandezas, aqui determinadas ou comentadas, como referencial na caracterização eletroquímica dos processos de modificação da superfície.

5.2 ELETROPOLIMERIZAÇÃO DO 2-(1H-PIRROL-1-IL)ETANOAMINA (PY_{Am})

Na **Figura 26a** é possível observar o perfil voltamétrico do processo de polimerização eletroquímica do PY_{Am} sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo, e do monômero pirrol (PY). A partir do PY_{Am} foi possível determinar a região em que ocorre o processo de polimerização (0,90 - 1,50 V), apresentando o valor de $E_{p,a}$ c.a. de aproximadamente 1,3 V. Foram realizadas 10 curvas voltamétricas, no qual observou-se que a polimerização do pirrol aminado que ocorre no primeiro ciclo não apresenta um perfil irreversível, uma vez que, observamos apenas uma onda anódica (oxidação), não sendo possível visualizar o pico catódico (redução). Entretanto, seu perfil voltamétrico difere do monômero pirrol (PY), em que após a polimerização o $E_{p,a,}$ e a corrente tendem a zero. Segundo Okner et al., 2007, o processo de polimerização do PY ocorre por sucessivas reações eletroquímicas e químicas, em que a sua oxidação heterogênea forma o iniciador cátion radical ($P,Y^{+\bullet}$, **Figura 26b**). No presente trabalho, não foram abordados os aspectos relacionados aos mecanismos de

formação do polímero derivado do PY_{Am} (PPY_{Am}), uma vez que, o intuito é a aplicação do filme polimérico na posterior imobilização dos PQs por ligação covalente. Contudo, assumimos que ocorre um processo de polimerização similar ao PY (**Figura 26b**), mas com velocidades de reação diferentes.

Figura 26. (a) Voltamograma cíclico da superfície de carbono vítreo em solução de 10 mmol L^{-1} de PY_{Am} em HNO_3 e 1 mmol L^{-1} de PY em HNO_3 0,1 mol L^{-1} a T = 25 ºC. (b) Esquema da proposta do mecanismo de eletropolimerização do PY, baseado na formação de iniciador cátion radical em uma reação como processos químicos e eletroquímicos sucessivos.



A técnica de voltametria cíclica também foi usada para caracterizar a etapa de montagem da interface ECV/PPY_{Am}. No perfil voltamétrico (**Figura 27a**), observamos que os gráficos não apresentam grandes variações entre si, em termos dos valores de $I_{p,a}/I_{p,c}$ (~1,03) e $E_{p,a} - E_{p,c}$ (~0,070 V). Entretanto, nos dados de espectroscopia (**Figura 27b**), notamos uma tendência de aumento nos valores de R_{ct} e C (calculados a partir dos valores de ponto máximo do semicírculo), em comparação aos dados da superfície não modificada (superfície de CV). A partir disso, foi possível observar que nas condições experimentais de formação do polímero ocorreu um aumento dos valores de R_{ct} e C, assim como observada na **Tabela 2**. Esses dados também podem ser analisados através do gráfico Z' vs. *f* e da derivada da curva --

-*Z*" vs. *f*, ver em **Apêndices**, no qual se observa um aumento nos valores de R e τ (**Apêndices**), em comparação aos dados da superfície não modificada. A partir, dos valores obtidos, foi utilizada a condição experimental apresentada no sistema **(a)** 10 mmol L^{-1} de PY_{Am}, e tempo = 120 s, uma vez que apresentou baixa definição de R e C, o que pode ajudar nos processos de transferência de carga. Esse contexto pode ser observado segundo o modelo de Randler, pois assumimos que R é a resistência de transferência de elétrons e seu aumento está associado à formação de cadeias poliméricas de menor dimensão sobre a superfície (visto nos demais sistemas), o que pode dificultar na posterior imobilização da nanopartícula. Esse conjunto de indícios leva-nos a supor que, ocorre a formação do filme polimérico, mas ainda se tem uma baixa definição na região de frequência em que determinamos os parâmetros (R e C) a partir da impedância.

Figura 27. Caracterização da eletropolimerização do PPY_{Am} sobre carbono vítreo em solução de 1 mmol L^{-1} de $FeK_4(CN)_6/FeK_3(CN)_6$ em KCl 0,1 mol L^{-1} a T = 25 ºC. (a) voltamograma cíclico com $I/v^{1/2}$ vs. *E*, (b) espectroscopia de impedância eletroquímica (E_{rms} = 10 mV vs. referência): Representação de Nyquist. Todos os experimentos de polimerização foram realizados em solução HNO_3 0,1 mol L^{-1} a T = 25 ºC.

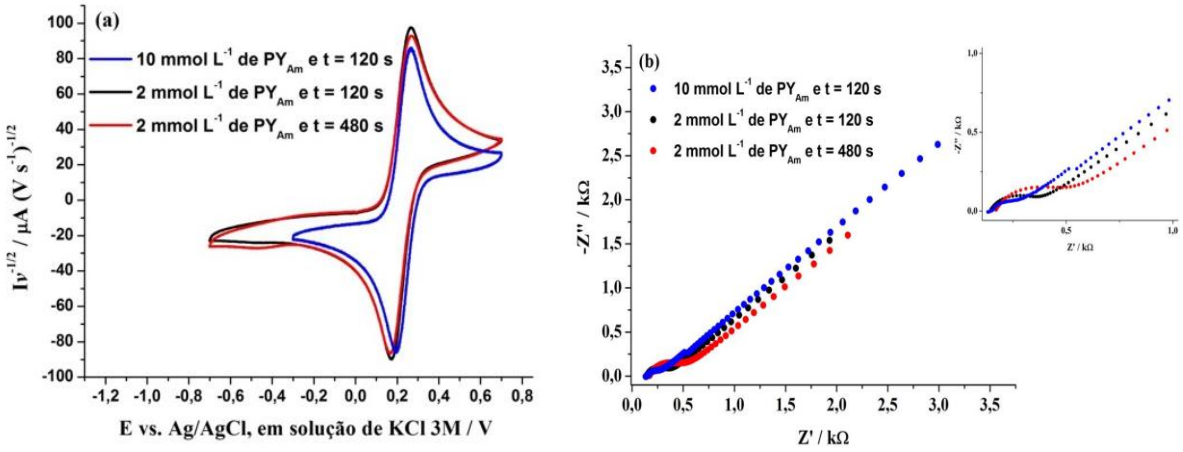


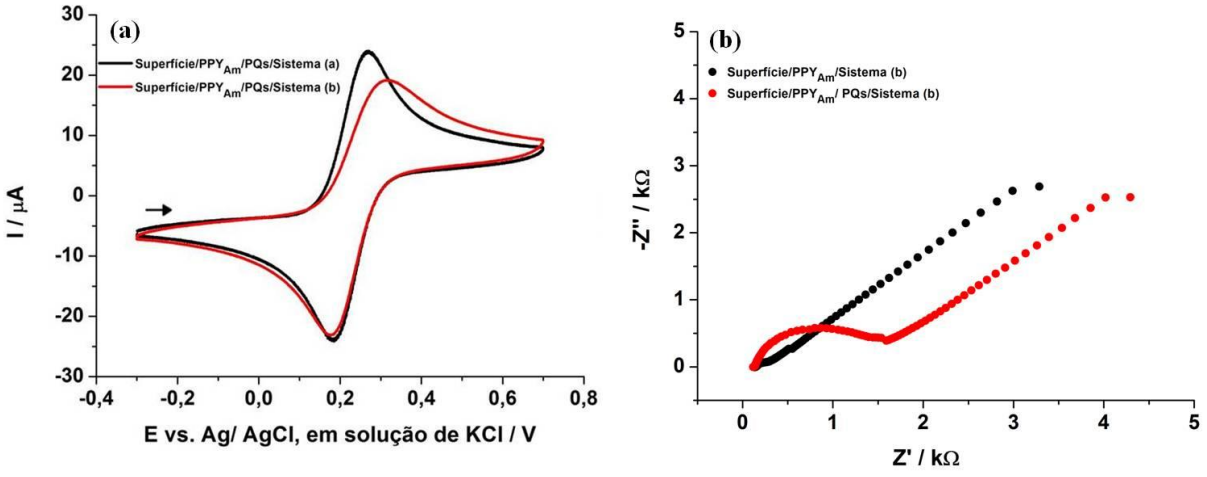
Tabela 2. Variação de R_{ct} e C na caracterização da eletropolimerização do PPY_{Am}.

Sistema	R_{ct} / Ω	C/ µF
10 mmol L^{-1} de PY_{Am}, e tempo= 120 s	-x	-x
2 mmol L^{-1} de PY_{Am}, e tempo= 120 s	582	3,4
2 mmol L^{-1} de PY_{Am}, e tempo= 120 s	862	9,3

5.3 IMOBILIZAÇÃO DOS PQS-AMS SOBRE A INTERFACE SUPERFÍCIE/PPY_{Am}

Para a imobilização dos PQs-AMS, testou-se duas possibilidades: (a) por fisiossorção (interação eletrostática) e (b) por ligação covalente (utilizando EDC e Sulfo-NHS como agentes de acoplamento), em que as proporções experimentais dos agentes de acoplamento foram determinadas em trabalhos anteriores (OLIVEIRA, 2014). Na **Figura 28** apresentamos o perfil voltamétrico dessas duas condições sobre a superfície polimerizada. No sistema **(a)** o perfil voltamétrico não apresenta grandes variações em comparação ao sistema anterior (superfície polimerizada), entretanto acreditamos que ocorre adsorção inespecífica dos PQs-AMS sobre a interface superfície/PPY_{Am}, devido às variações na diferença de potencial [$E_{p,a}$ (0,271 V) – $E_{p,c}$ (0,180 V) ~ 0,090 V] apresentando um aumento de 12%. Porém, baseado na pequena mudança sofrida pela corrente $I_{p,a}$ e $I_{p,c}$ (c. a. 23,7 e –21,7 μA, respectivamente) assumimos que o processo promove uma adsorção pouco efetiva. Já para o sistema **(b)**, as mudanças no perfil voltamétrico são mais expressivas, como no caso da $E_{p,a} – E_{p,c}$ (~0,150 V), para o qual observamos um aumento de c. a. 88% em relação ao sistema superfície/PPY_{Am}. As correntes também tendem a diminuir ($I_{p,a}$ ~ 18,0 μA e $I_{p,c}$ ~ –17,7 μA) em torno de 20%, sendo essa grandeza menos expressiva. Portanto, apesar dos dois processos ocorrerem, é a ligação covalente (entre a amina presente no pirrol e o ácido carboxílico dos PQs) que predomina na formação da interface superfície/PPY_{Am}/PQs-AMS.

Figura 28. Perfil eletroquímico da interface superfície/PPY_{Am}/PQs-AMS em solução de 1 mmol L^{-1} de $FeK_4(CN)_6/FeK_3(CN)_6$ em KCl 0,1 mol L^{-1} a T = 25 ºC. Em (a) voltamogramas cíclicos a ν = 0,1 V s^{-1}, (b) espectroscopia de impedância eletroquímica (E_{rms} = 10 mV vs. referência), segundo a representação de Nyquist.



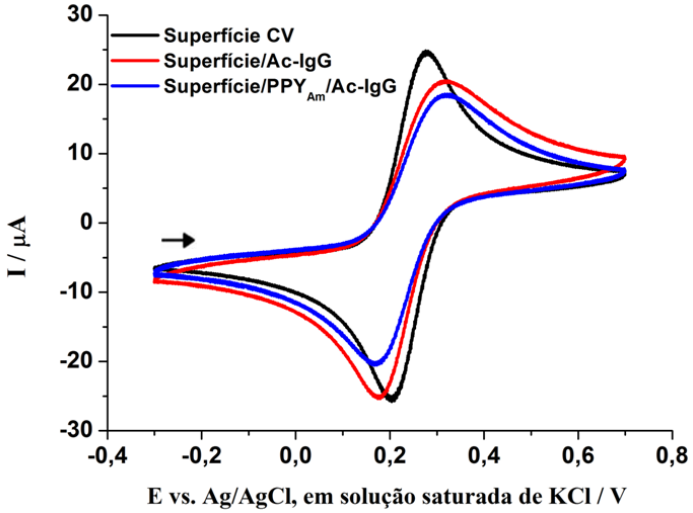
Para confirmação dos dados, foi realizada a espectroscopia de impedância eletroquímica, **Figura 28b,** para caracterizar superfície/PPY_{Am}/PQs-AMS do sistema **(b)**. No gráfico é possível observar que o sistema tem seu processo de transferência de carga dificultado pela presença do PQs-AMS, uma vez que proporcionou uma melhor definição nos espectros, o que permitiu a obtenção dos parâmetros R_{ct} = 1303 Ω e C = 1,3 μF, que serão utilizados como referência no estudo da imobilização do anticorpo IgG sobre superfície/PPY_{Am}/PQs-AMS. O **Apêndice**, traz também o valor do τ = 95,2 ms, adquirido a partir do gráfico. Em outro trabalho, que vem sendo desenvolvido pelo grupo, PQs de CdTe funcionalizados com cisteamina (PQs-CYS) estão sendo investigados em uma plataforma constituída por eletrodos de ouro modificados com monocamadas auto-organizadas (SAMs) de ácido mercaptopropiônico (AMP). Neste trabalho tem-se observado um comportamento diferente, pois nesse caso, a imobilização dos PQs-CYS sobre o sistema Au/AMP 24 h sugere um favorecimento do processo de transferência de carga, o qual no início é dificultado pela SAM de AMP segundo Oliveira (2014). No entanto, ainda não há um consenso se, e quanto, essas mudanças para mais ou para menos na transferência de carga vão refletir na detecção. Como a utilização de PQs em biossensores eletroquímicos é recente, até onde sabemos não há estudo dessa natureza na literatura.

5.4 IMOBILIZAÇÃO DO ANTICORPO IgG

5.4.1 Imobilização do anticorpo IgG – Ligação inespecífica

Com o intuito de estudar a possibilidade de fisiossorção do anticorpo IgG sobre as superfícies de carbono vítreo e modificada com PPY_{Am}, realizamos experimentos voltamétricos na ausência de agentes de acoplamento (**Figura 29**). Observamos que o sistema apresenta os valores de $E_{p,a} - E_{p,c}$ em torno de 0,142 V, em ambos os casos, e que difere, dos respectivos dados na ausência do anticorpo IgG, por volta de 92%. Isso leva a crer que o anticorpo IgG tem praticamente a mesma afinidade pela superfície de carbono vítreo e pelo eletrodo modificado por $PY_{am.}$

Figura 29. Perfil voltamétrico da interface superfície/Ac-IgG e superfície/PPY_{Am}/Ac-IgG em solução de 1 mmol L^{-1} de $FeK_4(CN)_6/FeK_3(CN)_6$ em KCl 0,1 mol L^{-1} a T = 25 ºC, a ν = 0,1 V s^{-1}.



Entretanto, para uma melhor compreensão de como ocorre a adsorção do anticorpo IgG, ainda se faz necessário o estudo de adsorção inespecífica para o sistema superfície/PPY_{Am}/PQs-AMS. Em paralelo foram realizados estudos em microplacas a fim de determinar as condições de conjugação da proteína, sendo posteriormente aplicadas essas mesmas condições ao sistema superfície/PPY_{Am}/PQs-AMS por meio de imobilização do anticorpo IgG por ligação covalente.

5.4.2 Estudos de EFM

A conjugação de PQs-AMS aos anticorpos foi avaliada por EFM, utilizando as concentrações descritas na seção 4. Os resultados do 1 Controle (anticorpos) e Controle 2 (somente PQs) mostraram um sinal médio de 252,6 e 212 unidades arbitrárias. Em relação aos testes observa-se que para a menor concentração de EDC e Sulfo-NHS, a conjugação apresentou uma fluorescência relativa de 80%. Ao adicionar mais agentes de acoplamento é possível observar que há um aumento dessa fluorescência relativa para 960% indicando que houve bioconjugação. Vale salientar que, segundo Carvalho et al., (2014) para ocorrer conjugação os valores da FL Relativa devem ser maiores que 100% (valor estabelecido empiricamente). Assim, quanto maior o sinal, mais eficiente é a bioconjugação. Os resultados podem ser observados na **Tabela 3.**

Tabela 3. Resultado do EFM- conjugado covalente de PQs/IgG. Média do sinal se refere à média da triplicata para cada sistema (u.a- unidades arbitrárias).

Sistemas	Média do sinal (u.a.)	FL Relativa (%)
Controles		
IgG	252,6	-
PQs (EDC/Sulfo)	212	-
Testes		
PQs[a]	425,3	80
PQs[b]	966,6	316
PQs[c]	2465	960
PQs[d]	1029,3	358
PQs[e]	2502	1013

Condições: a: 2 mmol L^{-1} EDC, 5 mmol L^{-1} Sulfo-NHS e 46 µg mL^{-1} IgG; **b**: 10 mmol L^{-1} EDC, 25 mmol L^{-1} Sulfo-NHS e 46 µg mL^{-1} IgG; **c**: 20 mmol L^{-1} EDC, 50 mmol L^{-1} Sulfo-NHS e 46 µg mL^{-1} IgG; **d:** 2 mmol L^{-1} EDC, 5 mmol L^{-1} Sulfo-NHS e 91 µg mL^{-1} IgG; e: 20 mmol L^{-1} EDC, 50 mmol L^{-1} Sulfo-NHS e 91 µg mL^{-1} IgG.

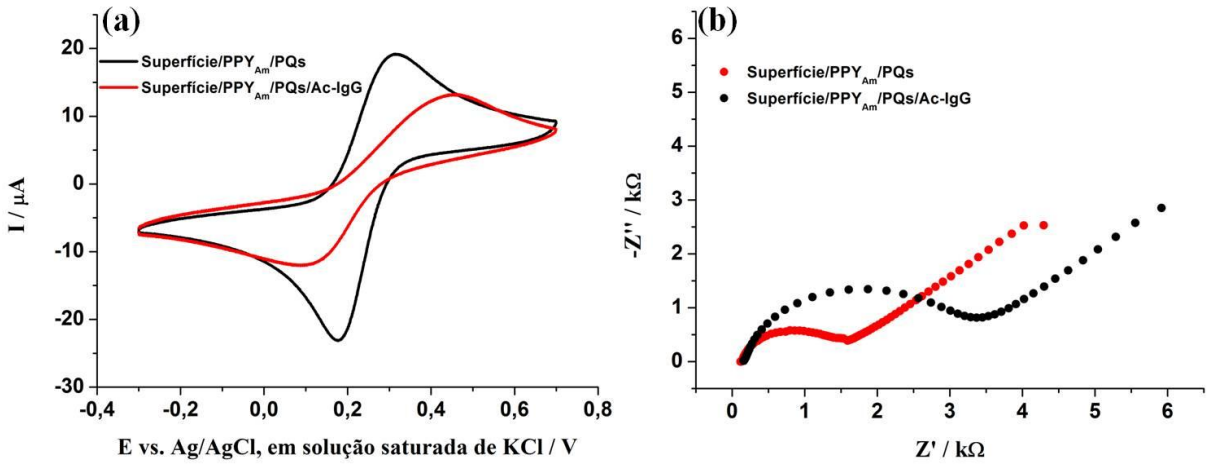
A partir desses resultados foi possível testar as melhores e piores condições experimentais adquiridos com a microplaca na superfície eletródica a fim de correlacionar a conjugação no meio homogêneo com o heterogêneo. Para avaliar a eficiência dessa conjugação, o sistema superfície/PPY_{Am}/PQs foi incubado com anticorpos IgG por 24 horas nas condições: **c)** (que apresenta uma fluorescência relativa maior que 100%, utilizando uma maior quantidade de agentes de acoplamento para uma menor quantidade de anticorpo e **a)** (que apresentou a fluorescência inferior a 100%) observadas na **Tabela 3**. A condição **c)** foi adotada como a melhor, pois não apresentou um aumento tão diferenciado em relação à condição **e)** e utilizava uma menor quantidade de biomoléculas.

5.4.3 Imobilização do anticorpo IgG sobre superfície/PPY_{Am}/PQs-AMS

Para a imobilização do anticorpo IgG por ligação covalente utilizou-se as condições **c)** e **a)**. Na (**Figura 30a)** apresentamos o perfil voltamétrico da condição c), 24 horas. Os resultados mostram que houve a imobilização do anticorpo IgG, uma vez que há um grande aumento na diferença de potencial de pico [$E_{p,a}$ (0,456 V) – $E_{p,c}$ (0,090 V) ~ 0,366 V], representando um aumento de aproximadamente 144% em relação ao sistema superfície/PPY_{Am}/PQs-AMS. Para confirmar esse resultado, foi realizada a análise por espectroscopia de impedância eletroquímica, a partir dos dados de Nyquist (**Figura 30b)**, para caracterizar o sistema superfície/PPY_{Am}/PQs-AMS/Ac-IgG o que permitiu a obtenção dos parâmetros R_{ct} = 3040 Ω e C = 1,1 µF, que demostram que a presença do anticorpo IgG promove um aumento significativo na resistência em aproximadamente 133% e praticamente

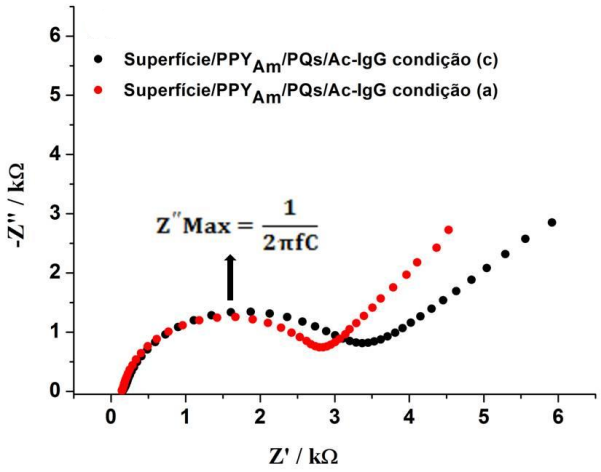
não altera a capacitância (C) do sistema, ambos em relação ao sistema superfície/PPY_{Am}/PQs-AMS. Após essa etapa foi possível avaliar essa plataforma na detecção do anti-anticorpo IgG.

Figura 30. Perfil eletroquímico da interface superfície/PPY_{Am}/PQ-AMS/Ac-IgG em solução de 1 mmol L^{-1} de $FeK_4(CN)_6/FeK_3(CN)_6$ em KCl 0,1 mol L^{-1} a T = 25 ºC da condição **c)**, 24 horas. Em (a) voltamogramas cíclicos a v = 0,1 V s^{-1}, (b) espectroscopia de impedância eletroquímica (E_{rms} = 10 mV vs. referência), segundo a representação de Nyquist.



A condição **a**) pode ser analisada na (**Figura 31)**. Os resultados mostram os dados da EIE que permitiram a obtenção dos parâmetros R_{ct} = 2535,2 Ω e C = 1,3 μF, em relação aos sistemas superfície/PPY_{Am}/PQs-AMS que demonstra que a presença do anticorpo IgG promove um aumento na resistência de transferência de carga em aproximadamente 94% e praticamente não altera a capacitância (C) do sistema, ambos em relação ao sistema superfície/PPY_{Am}/PQs-AMS. Através dos gráficos do **Apêndice**, é possível se obter também estes parâmetros e o τ = 35 ms. Dessa forma, se observa que há uma correlação entre os estudos por EFM (em meio homogêneo) e no eletrodo (em meio heterogêneo). A melhor condição na EFM também foi a melhor no eletrodo. Entretanto, as variações no meio homogêneo se mostraram mais críticas para a conjugação e a pior condição da EFM pode ser ainda aceitável para o eletrodo. Experimentos de detecção serão realizados a fim de elaborar essa associação. No entanto, é certo que a melhor condição no EFM será em princípio uma escolha efetiva para a plataforma.

Figura 31. Espectroscopia de impedância eletroquímica (E_{rms} = 10 mV vs. referência), da interface superfície/PPY_{Am}/PQs-AMS/Ac-IgG em solução de 1 mmol L^{-1} de $FeK_4(CN)_6/FeK_3(CN)_6$ em KCl 0,1 mol L^{-1} a T = 25 ºC da condição **a)**, segundo a representação de Nyquist.



5.5 DETECÇÃO DO ANTI-IgG

Para testar a plataforma sensora foram realizadas análises por espectroscopia de impedância eletroquímica, e os dados podem ser observados segundo a representação de Nyquist (**Figura 32**), que traz a impedância imaginaria (-Z") versus a impedância real (Z'). Tal representação permite obter valores de resistências associados a processo de transferência de carga (R_{ct}) que podem ser relacionados a presença de semicírculos. **No Apêndice**, também é ilustrada a representação: Z' vs. *f* e da derivada da curva -Z" vs. *f*.

Figura 32. Espectroscopia de impedância eletroquímica da interface superfície/PPY_{Am}/PQs/Ac-IgG/anti-IgG/ (diferentes concentrações) em solução de 1 mmol L^{-1} de $FeK_4(CN)_6/FeK_3(CN)_6$ em KCl 0,1 mol L^{-1} a T = 25 ºC.

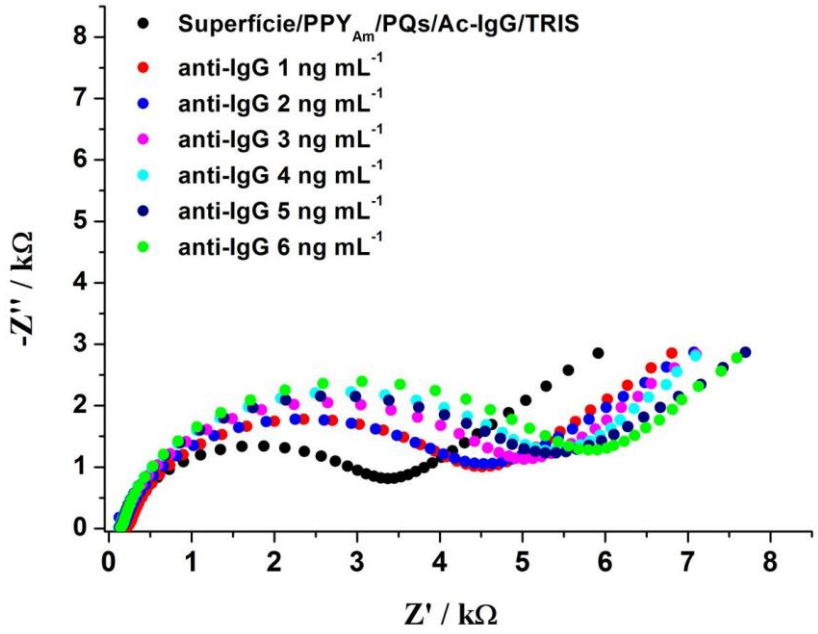


Tabela 4. Valores de R_{ct} na detecção do anti-IgG.

Sistemas	R_{ct} / Ω
anti-IgG 1 ng mL^{-1}	4070
anti-IgG 2 ng mL^{-1}	4260
anti-IgG 3 ng mL^{-1}	4600
anti-IgG 4 ng mL^{-1}	4950
anti-IgG 5 ng mL^{-1}	4920
anti-IgG 6 ng mL^{-1}	5320

Nesse gráfico é possível observar que após cada incubação de anti-IgG o sistema tem seu processo de transferência de carga gradativamente dificultado (aumento da região de semicírculo) dada a interação anticorpo-antígeno, evidenciando que essa interação altera os parâmetros associados ao processo de transferência de carga (**Tabela 4**). Esse resultado mostra que é possível se detectar antígenos na ordem de ng mL^{-1} com essa plataforma biossensora, indicando ter sensibilidade (CABRAL, 2016). Essa detecção também está na mesma faixa dos testes até então realizados pelo grupo com a plataforma de ouro modificada por SAMs de AMP e PQs estabilizados com cisteamina, mencionados mais acima (OLIVEIRA, 2014). O interessante também é que a anti-IgG utilizada é constituída por um fragmento do anticorpo, somente a porção F_{ab}, portanto é possível que se tenha uma detecção ainda melhor com biomoléculas completas. As IgGs e anti-IgGs são usualmente utilizadas como modelos, isso indica que em princípio essa plataforma biossensora deverá ter um perfil semelhante quando aplicada a outras biomoléculas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A formação do filme polimérico, a base de um monômero de 2 - (1H-pirrrol-1-il) etanoamina, sobre a superfície de carbono vítreo, utilizando a técnica cronoamperometria, contribuiu para a imobilização efetiva de PQs carboxilados de CdTe;

- Os PQs carboxilados podem ser imobilizados sobre a superfície polimerizada, por adsorção e ligação covalente, entretanto, a adsorção inespecífica ocorre de maneira menos efetiva, sendo o processo por ligação covalente predominante na imobilização;

- Os PQs permitiram uma imobilização eficiente dos anticorpos IgG sobre a plataforma modificada;

- O sistema superfície/PPY_{Am}/PQs-AMS tem seu processo de transferência de carga dificultado pela presença dos PQs de CdTe carboxilados, diferentemente do comportamento encontrado pelo grupo utilizando PQs de mesma composição, porém aminados, imobilizados em eletrodos de ouro através de SAMs de AMP. No entanto, ainda não há um consenso se, e quanto, essas mudanças para mais ou para menos na transferência de carga vão refletir na detecção. Mais estudos serão necessários para tanto;

- Foi observada uma correlação entre os resultados do EFM em comparação com as análises eletroquímicas referentes à imobilização do IgG no eletrodo de carbono vítreo através dos PQs, indicando que a melhor condição no EFM será em princípio uma escolha efetiva para a plataforma;

- Os estudos preliminares se mostraram promissores indicando que o anti-IgG foi detectado, na ordem de ng mL^{-1}, pela plataforma CV/PPY_{Am}/PQs/Ac-IgG.

7 PERSPECTIVAS

Uma vez desenvolvida a plataforma e demonstrado que ela é capaz de detectar biomoléculas, tem-se como primeira perspectiva aplicá-la na detecção de biomarcadores de diagnóstico. Também se planeja montar plataformas contendo PQs aminados com polímeros carboxilados e realizar comparações entre os sistemas, uma vez que diferentes tipos de PQs podem modificar de forma diferenciada as características da plataforma. Nesses sistemas os anticorpos serão imobilizados por diferentes porções, fato que poderá influenciar nos resultados obtidos. Além disso, pretende-se complementar e finalizar a correlação da conjugação nos meios homogêneo/heterogêneos. Acreditamos que estudos como esses possam não somente elucidar o papel dos PQs e de outros nanomaterias nas plataformas sensoras, bem como fornecer respostas sobre questões relacionadas à imobilização versus atividade de biomoléculas nesses sistemas, e com isso abrir horizontes para o desenvolvimento de biossensores eficazes e versáteis para diagnóstico.

8 REFERÊNCIAS

ALFAYA, A. A.; KUBOTA, L. T. **A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores**. *Química Nova.* v. 25, n. 5, p.835-841, 2002.

ANDRADE, C. G.; CABRAL FILHO, P. E.; TENORIO, D. P. L.; SANTOS, B. S.; BELTRÃO, E. I. C.; FONTES, A.; CARVALHO JUNIOR, L. B. **Evaluation of glycophenotype in breast cancer by quantum dot-lectin histochemistry**. *International Journal of Nanomedicine*. v. 8, p. 4623-4629, 2013.

ANDRADE, V. M. **Confecção de biossensores através da imobilização de biocomponentes por eletropolimerização de pirrol**. Dissertação (Mestrado em Engenharia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p.112, 2006.

ARORA, K, PRABHAKAR, N.; CHAND, S.; MALHOTRA, B. D. **Ultrasensitive DNA hybridization biosensor based on polyaniline**. *Biosensors and Bioelectronics.* v. 23, n. 5, p. 613-620, 2007.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Fundamentals and Applications. Electrochemical Methods**, 2 ed. New York: Willey, 2001.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. 2. ed. India*: Willey*, 2006.

BERGMANN, B. R. A. **Nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico**. *Ciências e Cultura*. v. 60, n. 2, p. 54-57, 2008.

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Eletrochemisty: Principles, Methods, and application**. New York: *Oxford University Press*. p. 464, 1993.

BRUCHEZ, M. J. M.; MORONNE, P. G. S.; WEISS, A. P. A. **Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels**. *Science.* v. 281, p. 2013–2016, 1998, 2008.

BRUS, L. E. **Electron–electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state**. *Journal Chemical Physics*. v. 80, n. 9, p. 4403, 1984.

BUČKO, M., MISLOVIČOVÁ, D., NAHÁLKA, J., VIKARTOVSKÁ, A., ŠEFČOVIČOVÁ, J., KATRLÍK, J, ŠVITEL, J. **Immobilization in biotechnology and biorecognition: from macro-to nanoscale systems**. *Chemical Papers*. v. 66, n. 11, p. 983-998, 2012.

CABRAL, D. G. A.; LIMA, E. C. S; MOURA, P.; DUTRA, R. F. **A label-free electrochemical immunosensor for hepatitis B based on hyaluronic acid–carbon nanotube hybrid film**. *Talanta*. v. 148, p. 209–215, 2016.

CABRAL F. P. E.; CARDOSO.; L., PEREIRA, M. I.; RAMOS, A. P.; HALLWAS, F.; CASTRO, M. M. C.; FONTES, A. **CdTe *Quantum Dots* as fluorescent probes to study transferrin receptors in glioblastoma cells**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. v.1860, n. 1, p.28-35, 2016.

CALIL, S. S.; SILVA, P. R. Q. **Biossensores: Estrutura, funcionamento e aplicabilidade**. *Instituto de Estudos Farmacêuticos. Brasília*, 2010.

CANCINO, J.; MARANGONI, V. S.; ZUCOLOTTO, V. **Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações**. *Química Nova*. v. 3, n. 3, p. 521-526, 2014.

CARVALHO, K. H. G.; BRASIL JUNIOR, A. G.; CABRAL FILHO, P. E.; TENÓRIO, D. P. L. A.; SIQUEIRA, A. C. A.; LEITE, E. S.; FONTES, A.; SANTOS, B. S. **Fluorescence Plate Reader for Quantum Dot-Protein Bioconjugation Analysis.** *Journal of Nanoscience and Nanotechnology.* v. 14, p. 3320-3327, 2014.

CASTILHO, T. J. **Desenvolvimento e avaliação de um biossensor amperométrico à base de peroxidase para determinação de neurotransmissores**. Tese (Doutorado em Ciências), Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. p. 126, 2003.

CHAN, W. C. W. **Bionanotechnology progress and advances.** *American Society for Blood and Marrow Transplantation.* v.12, p.87-91, 2006.

CLARK, L. C.; LYONS ,C. **Electrode systems for continuos monitoring in cardiovascular surgery**. *Ann Ny Acad Sci*. v. 102, n. 1, p. 29, 1962.

COSNIER, S. **Biossensors dased on electopolymerized films: new trends**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. v. 377, n. 3, p. 507-520, 2003.

DAGTEPE, P; CHIKAN, P.; JASINSKI, J; LEPPERT, V.J. **Quantized Growth of CdTe *Quantum Dots*; observation of magic-Sized CdTe *Quantum Dots***. *J. Phys. Chem. C*, v.111, n. 41, p. 14977-14983, 2007.

DRBOHLAVOVA, J., ADAM, V., KIZEK, R., e HUBALEK, J. ***Quantum Dots* characterization, preparation and usage in biological systems.** *International Journal of Molecular Sciences*. v. 2, n. 10, p. 656-673, 2009.

DUTRA R. F.; SILVA B. V.; CAVALCANTI.; M. I. T, MATTOS A. B.; MOURA P, SOTOMAYOR M. D. T. **Disposable immunosensor for human cardiac troponin T based on streptavidin-microsphere modified screen-printed electrode**. *Biosensors and Bioelectronics.* v. 26, p. 1062–1067, 2010.

FANG, W.; HU, S. **Electrochemical sensors based on metal and semiconductor nanoparticles**. *Microchim. Acta*. v. 165, p. 1-22, 2009.

FARIA-TISCHER.; PAULA C. S.; TISCHER, C. A. **Nanobiotechnology: platform technology for biomaterials and biological applications the nanostructures. Biochemistry and Biotechnology** *Reports.* v. 1, n. 1, p. 32-53, 2012.

FILHO, O. F.; CAPELATO, M. D. **Biossensores**, Revisão. Departamento de Química. Universidade Federal de São Carlos. SP. *Química Nova*. v. 15, n. 1, 1992.

FONTES, A.; SANTOS, B. S. ***Quantum Dots*: Applications in Biology (in Methods in Molecular Biology**). 2. ed. *Springer*, v. 1, p. 258, 2014.

FRASCO M. F.; NIKOS C. **Semiconductor *Quantum Dots* in Chemical Sensors and Biosensors**. *Sensors*. v. 9, p. 7266-7286, 2009.

FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. **Emprego de nanocamadas autoorganizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos.** *Química Nova*. v. 26, n. 3, p. 381-389, 2003.

FREITAS, T. A.; MATTOS, A. B.; SILVA, B.V.; DUTRA, R. F. **Amino-Functionalization of Carbon Nanotubes by Using a Factorial Design: Human Cardiac Troponin T Immunosensing Application**. *BioMed Research International*. v. 2014, p. 1- 9, 2014.

GARCIA-ALJARO, C.; CELIA, I. N.; SHIRALE, D. J.; PARK, M.; MUNOZ, F. J.; YATES, M. V.; MULCHANDANI, A. **Carbon nanotubes-based chemiresitive biosensors for deteccion of microrganims**. *Biossensors and Bioelectonics.* v. 4, n. 26, p. 1437-1441, 2010.

GIL, E. S; KUBOTA, L. T; YAMAMOTO, Y. I. **Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica**. *Química Nova*. v. 22, n. 6, p. 875, 1999.

GOMES-FILHO, S. L. R.; DIAS, A. C. M. S.; SILVA, M. M. S.; SILVA, B.V. M.; DUTRA R. F. **A carbon nanotube-based electrochemical immunosensor for cardiac troponin T**. *Microchemical Journal*. n. 109, p.10–15, 2013.

GUILBAULT, G.; MONTALVO, J. **A urea-specific enzyme electrode**. *J. Am. Chem. Soc*. v. 91, n. 8, p. 2164, 1969.

HANSEN, J. A.; WANG, J.; KAWDE, AN.; XIANG, Y.; GOTHELF, K. V. **Quantum-Dot/AptamerBased Ultrasensitive Multi-Analyte Electrochemical Biosensor.** *J. Am. Chem, Soc*. v. 128, p. 2228– 2229, 2006.

HEDGE, R. N.; ROSAMANI, R. R.; NANDIBEWOOR, S. T. **Voltametric oxidation and determination of cinnarizine at glassy carbono modified with multi-walled carbono nanotubes.** *Colloids and surfaces B, biointerfaces*. v. 2, n.72, p. 259-256, 2009.

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate Techniques. Pierce Biotechnology**. *In Thermo Fisher Scientifi c, Rockford*, Illinois, USA, p. 1202, 2008.

HOCEVAR, M. A. **Desenvolvimento de biossensores enzimáticos amperométricos utilizando nanopartículas de polipirrol**. *Dissertação* (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6ª edição. São Paulo: *Ed. Bookman*. p. 1056, 2009.

JUBETE, E.; LOAIZA, O. A.; OCHOTECO, E.; POMPOSO, J. A.; GRANDE, H.; RODRÍGUEZ, J. **Nanotechnology: a tool for improved performance on electrochemical screen-printed (bio)sensors.** *Journal of Sensors*. v. 1, p. 1-13, 2009.

JUSTINO, C. I. L.; ROCHA-SANTOS, T. A.; DUARTE, A. C. **Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications**. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. v. 29, n. 10, p. 1172–1183, 2010.

K'OWINO, I. O.; SADIK, O. A. **Impedance Spectroscopy: A Powerful Tool for Rapid Biomolecular Screening and Cell Culture Monitoring.** *Electroanalysis.* v. 17, n. 23, p. 2101-2113, 2005.

KARUBE, I.; NOMURA, Y. **Enzyme sensors for environmental analysis.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v. 10, n. 1, p. 177-181, 2000.

KATZ, E.; WILLNER, I. **Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric Immunosensors, DNA-Sensors, and Enzyme Biosensors.** *Electroanalysis*. v. 15, n. 11, p. 913-947, 2003.

KJÄLLMAN, T. H. M., PENG, H., SOELLER, C.; TRAVAS-SEJDIC, J. **A CdTe nanoparticle-modified hairpin probe for direct and sensitive electrochemical detection of DNA**. *Analyst.* v. 135, p. 488-494, 2010.

KRESS, R. E. **Chemosensors, Biosensors and Immunosensors. In Instrumentation and Sensors for the Food Industry**. *Woodhead Publishing.* v. 599–611, p. 636–639, 1998.

KRÖGER, S.; DANIELSSON, B. **Calorimetric Biosensors. In Handbook of Biosensors and Electronic Noses**. Medicine, Food and the Environment. p. 279–298, 1997.

KRUSS, S.; HILMER, A. J.; ZHANG, J.; REUEL, N. F.; MU, B.; STRANO, M.S. **Carbon nanotubes as optical biomedical sensors**. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 65, p. 1933–1950, 2013.

LAHIFF, E., LYNAM, C., GILMARTIN, N., O'KENNEDY, R., DIAMOND, D. **The increasing importance of carbon nanotubes and nanostructured conducting polymers in biosensors**. *Analytical and bioanalytical chemistry*. v. 398, n. 4, p. 1575-1589, 2010.

LI Y; LIU, L.; FANG, X.; BAO, J.; HAN, M. **Electrochemiluminescence biosensor based on CdSe *Quantum Dots* for the detection of thrombin**. *Electrochimica Acta.* v. 65, p. 1–6, 2012.

LIU, G; LIN, Y. **Nanomaterial labels in electrochemical immunosensors and immunoassays**. *Talanta.* v. 74, n. 3, p. 308-317, 2007.

LIU, L., XIA, N., LIU, H., KANG, X., LIU, X., XUE, C., e HE, X. **Highly sensitive and label-free electrochemical detection of microRNAs based on triple signal amplification of multifunctional gold nanoparticles, enzymes and redox-cycling reaction**. *Biosensors and Bioelectronics.* n. 53, p. 399-405, 2014.

LOJOU. É.; BIANCO, P. **Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices**. *Journal of Electroceramics*, v. 16, p. 79-91, 2006.

LUO, X. L.; MORRIN, A.; KILLARD, A. J. **Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors.** *Electroanalysis*. n. 18, p. 319-326, 2006.

LUONG, J. H. T.; MALE, K. B.; GLENNON, J. D. **Biosensor technology: technology push versus market pull**. *Biotechnology Advances*. v. 26, p. 492-500, 2008.

LUPPA, P. L.; SOKOLL, L. J.; CHAN, D. W. **Immunosensors: principles and applications to clinical chemistry**. *Clinical Chimical Acta*. v. 314, p. 1-26, 2001.

MA, Q.; SU, X. **Recent Advances And Applications In QDs-Based Sensors**. *Analyst*. v. 136, p. 4883–4893, 2011.

MARTINS, M. A.; TRINDADE, T. **Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico**. *Química. Nova*. v. 35, n. 7, p. 1434-1446, 2012.

MASHHADIZADEH, M. H.; TALEMI, R. P. **A highly sensitive and selective hepatitis B DNA biosensor using gold nanoparticle electrodeposition on an Au electrode and mercaptobenzaldehyde**. *Analytical Methods*. n. 6, p. 8956-8964, 2014.

MEDEIROS, E. S.; OLIVEIRA, J. E.; CONSOLIN-FILHO, N; PATERNO, L. G.; MATTOSO, L. H. C. **Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 1: Biossensores**. Revista *Eletrônica de Materiais e Processos*. v. 7, n. 2, p. 62-77, 2012.

MEDINTZ, I. L.; UYEDA, H. T.; GOLDMAN, E. R.; MATTOUSSI, H. **Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing**. *Nature Materials*. v. 4, p. 435-446, 2005.

MENEZES, C. E. L. D.; DUTRA, R. A. F. **Desenvolvimento de nanoimunossensor capacitivo interdigitado para detecção de anticorpos contra o nucleocapsídeo do vírus da hepatite B (anti-HBc)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica). Universidade Federal de Pernambuco. p. 75, 2014.

MICHALET, X. F. F.; PINAUD, L. A.; BENTOLIA, J. M. TSAY, S.; DOOSE, J. J. Li, G. S, A. M. WU, S. S. ***Quantum Dots* for live cells, in vivo imaging, and diagnostics**. *Science*. v. 307, p. 538-544, 2005.

MICHALET, X.; BENTOLILA, L.A.; WEISS, S. **Molecular imaging: physics and bioapplications of quantum dots, In: Advances in Medical Physics**, (Wolbarst A.B.,

Mossman K.L. and Hendee W.R., Eds) *Medical Physics Publishing*, Madison, Wisconsin. v. 2, p. 111-127, 2008.

MICHALET, X; PINAUD, F. F, BENTOLILA L. A; TSAY, J. M. S; DOOSE J. J. SUNDARESAN, L, G, WU A. M; WEISS G, S. Weiss. **Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics**. *Science.* v. 30, p. 538–544, 2005.

MOREIRA, F. T. C.; DUTRA R. F.; NORONHA J. P. C.; SALES, M. G. F. **Artificial antibodies for Troponin T by its imprinting on the surface of Multiwalled Carbon Nanotubes: its use as sensory surfaces**. *Biosensors and Bioelectronics* v. 15, p. 243–250, 2011.

MOZAZ, S. R; MARCO, M. P.; ALDA, M. J. L.; BARCELÓ, D. **Indirect Determination of Mercury Ion by Inhibition of a Glucose Biosensor Based on ZnO Nanorods**. *Pure Appl. Chem.* v. 76, p. 723, 2004.

NOEL, M; ANANTHARAMAN, P. N. **Voltammetric studies on a glassy carbon electrode. Part II. Factors influencing the simple electron-transfer reactions—the $K_3[Fe(CN)_6]K_4[Fe(CN)_6]$** system. *Analyst.* v. 110, n. 9, p. 1095-1103, 1985.

OLIVEIRA, A. P. D. R. **Quantum dots associados a Monocamadas Auto-organizadas como Plataforma de imobilização de anticorpos para Biossensores Impedimétricos – Aplicações para Troponina T**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco- Recife, 2014.

OLIVEIRA, J. E.; CONSOLIN-FILHO,N.; PATERNO, L. G.; MATTOSO, L. H. C.; MEDEIROS, E. S. **Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 3: Biossenores.** *Revista Eltrônica de Materiais e Processos*. v. 8.1, p.1-11, 2013.

OLIVEIRA, M. M. P. **Biossensor para detecção do antígeno específico da próstata**. Dissertação *(*Mestrado em Biologia Molecular e Celular). Universidade de Aveiro. p. 88, 2011.

OROZCO, J.; JIMÉNEZ, J. C.; FERNÁNDEZ, S. C. **Electrochemical Performance of Self-Assembled Monolayer Gold Nanoparticle-Modified Ultramicroelectrode Array Architectures**. *Electroanalysis.* v. 24, p. 635–642, 2012.

PARK, B. W.; YOON, D. Y.; KIM, D. S. **Recent progress in bio-sensing techniques with encapsulated enzymes.** *Biosensors e Bioelectronics*. v. 26, p.1-10, 2010.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A.; KUBOTA, L. T. **Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas**. *Química Nova*. v. 25, n. 6/A, p. 1012-1021, 2002.

PEREIRA, P. C. D. **Biocompatibilidade e principais aplicações dos nanotubos de Carbono**. *Especialização em Microbiologia* - Universidade Federal de Minas Gerais. p. 37, 2009.

PEREZ, E. F. **Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para oxalato.** Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2000.

PINWATTANA K, WANG, J.; LIN, C; WU H, DU. D. **CdSe/ZnS quantum dots based electrochemical immunoassay for the detection of phosphorylated bovine serum albumin**. *Biosensors and Bioelectronics.* v. 26, p. 1109–1113, 2010.

RANDLES, J. E. B. **A cathode ray polarography.** *Transactions of the Faraday Society*. v. 44, p. 424-428, 1948.

RASOOLY, A. **Biosensor technologies**. *Methods*, Orlando, v. 37, n. 1, p. 1-3, 2000.

RESCH-GENGER, U.; GRABOLLE, M.; CAVALIERE-JARICOT, S.; NITSCHKE, R.; NANN, T. **Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels.** *Nature Methods*. v. 5, n. 9, p. 763-775, 2008.

RICCARDI, C. S; COSTA, P. I. D A; YAMANAKA, H. **Imunossensor amperométrico**. *Química Nova,* v. 25, n. 2, p. 316-320, 2002.

RICCI, F; ADORNETTO, G; PALLESCHI,G. **A review of experimental aspects of eletrochemical imunosensors**. *Electrohimica Acta*. v. 84, p. 74-83, 2012.

ROGACH, A. L.; FRANZL, T.; KLAR, T. A.; FELDMANN, J.; GAPONIK, N.; LESNYAK, V.; SHAVEL, A.; EYCHMÜLLER, A.; RAKOVICH, Y.P.; DONEGAN, J.F. A**queous Synthesis of Thiol-Capped CdTe Nanocrystals: State-of-the-Art**. *Journal Physical Chemistry*. v. 111, p. 14628-14637, 2007.

SAHOO, S. R; PARVEEN S; PANDA J. J, **The present and future of nanotecnology in humanhearth care: nanomedicine**. *Nanotecnology, Biology and Medicine.* v. 3, p. 20-31, 2007.

SANTOS, B. S; FARIAS, P. M. A, FONTES, A. **Semiconductor Quantum Dots for Biological Applications in Handbook of Self Assembled Semiconductor Nanostructures Novel Devices in Photonics and Electronics.** Ed**.** Mohamed Henine, Amsterdam: *Elsevier*. p. 773–798, 2008.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J; LECA-BOUVIER, B. D. **Imobilization strategies to develop enzimatic biosensors**. *Biotecnology Advances*. v. 30, n. 3, p. 489-511, 2012.

SILVA, B. V. M; CALVALCANTE, I. T.; SILVA, M. M. S.; DUTRA, R. F. **A carbon nanotube screen-printed electrode for Label-free detection of the human cardiac troponin T**. *Talanta*. v. 117, p. 431-437, 2013.

SILVA, F. O.; VIOL, L. C. S.; FERREIRA, D. L.; ALVES, J. L. A.; SCHIAVON, M. A. **O estado da arte da síntese de semicondutores nanocristalinos coloidais**. *Química Nova*. v. 33, n. 9, p.1933-1939, 2010.

SILVA, M. M. S. **Contribuição de nanomateriais para o desenvolvimento de biossensores para o diagnóstico da infecção aguda da dengue**. Tese *(*Doutorado em Biotecnologia) Renorbio. Universidade Federal de Pernambuco. p. 148, 2014.

SMITH, A. M.; GAO, X.; NIE, S. I**nvited Review Quantum Dot Nanocrystals for In Vivo Molecular and Cellular Imaging**. *Photochemistry and photobiology.* v. 80, p. 377–385, 2004.

SONG, F.; CHAN, W. C. **Principles of conjugating quantum dots to proteins via carbodiimide chemistry**. *Nanotechnology.* v. 22, p.49, 2011.

SUKHANOVA, A.; NABIEV, I. **Fluorescent nanocrystal quantum dots as medical diagnostic tools.** *Expert Opinion Medical Diagnostic* v. 2, n. 4, p. 429-447, 2000.

TELES, F. R. R.; FONSECA, L. R. **Trends in DNA biossensors**. *Talanta*. v. 77, n. 2, p. 606-623. 2008.

TREVENOT, D.; TOTH,K.; DURST, R.A.; WILSON,G.S. **Eletrochemical biosensors: recomended definition and classification 1Internacional union of purê and apllied chemistry: physical chemisty division, commision,** 1.7 (biophsical chemistry); *Analytical*

chemistry division commision. v. 5. *Eletroanalytical Biosensors and bioelectronics*. v. 16, n. 1-2, p 121-131, 2001.

VELASCO-GARCIA, M. N. **Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects**. *Seminars in Cell e Developmental Biology*. v. 20, p. 27-33, 2009.

VO- DINH T.; CULLUM, B. **Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics.** *Fresenius J. Anal. Chem*. v. 366, p. 540–551, 2000.

WALKEY, C.; SYKES, E. A.; CHAN, W. C. W. **Application of Semiconductor and Metal Nanostructures in Biology and Medicine**. *American Society of Hematology*. p. 701-707, 2009.

WANG F; HU S. **Electrochemical sensors based on metal and semiconductor nanoparticles. Microchim**. *Acta.* v. 165, p. 1–22, 2009.

WANG, S; MAMEDOVA, N., KOTOV, N. A., CHEN, W. e STUDER, J. **Antigen/Antibody Immunocomplex from CdTe Nanoparticle Bioconjugates**. *Nano Letters.* v. 2, p. 817-822, 2002.

WANG, X. **Engineering Nanomaterial Surfaces for Biomedical Applications**. *Exp. Biol. Med*. v. 234, p. 1128-1139, 2009.

YU, W. W.; QU, L.; GUO, W.; PENG, X. **Experimental determination of the extinction coefficient of the CdTe, CdSe and CdS nanocrystals.** *Chemical materials.* v. 15, p. 2854–2860, 2003.

9 APÊNDICES

9.1 REPRESENTAÇÕES DOS GRÁFICOS DE Z' VS. *f*

Figura 1. Espectroscopia de impedância eletroquímica (E_{rms} = 10 mV vs. referência), segundo a representação da parte imaginária e real em função da frequência. Perfil eletroquímico da interface carbono vítreo em solução de 1 m do mol L^{-1} de $FeK_4(CN)_6/FeK_3(CN)_6$ em KCl 0,1 mol L^{-1} a T = 25 ºC.

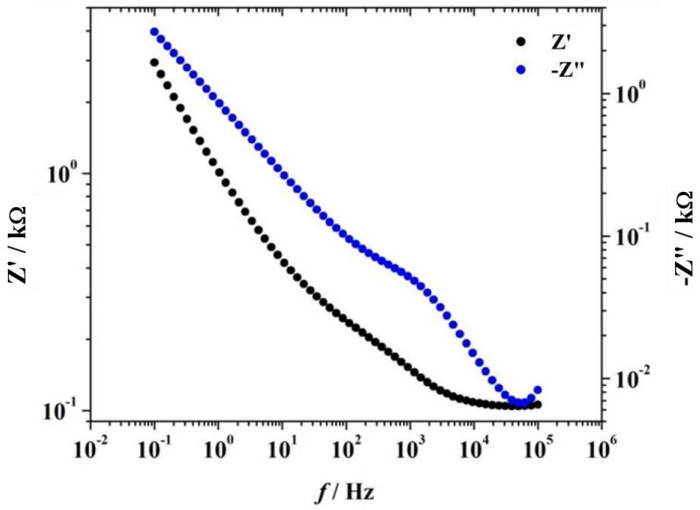


Figura 2. Espectroscopia de impedância eletroquímica (E_{rms} = 10 mV vs. referência): **(a)** Z' vs. *f* e **(b)-** Z'' vs. *F* Experimentos de caracterização da eletropolimerização do PPY_{Am} sobre carbono vítreo em solução de 1 mmol L^{-1} de $FeK_4(CN)_6/FeK_3(CN)_6$ em KCl 0,1 mol L^{-1} a T = 25 ºC. Todos os experimentos de polimerização foram realizados em solução HNO_3 0,1 mol L^{-1} a T = 25 ºC.

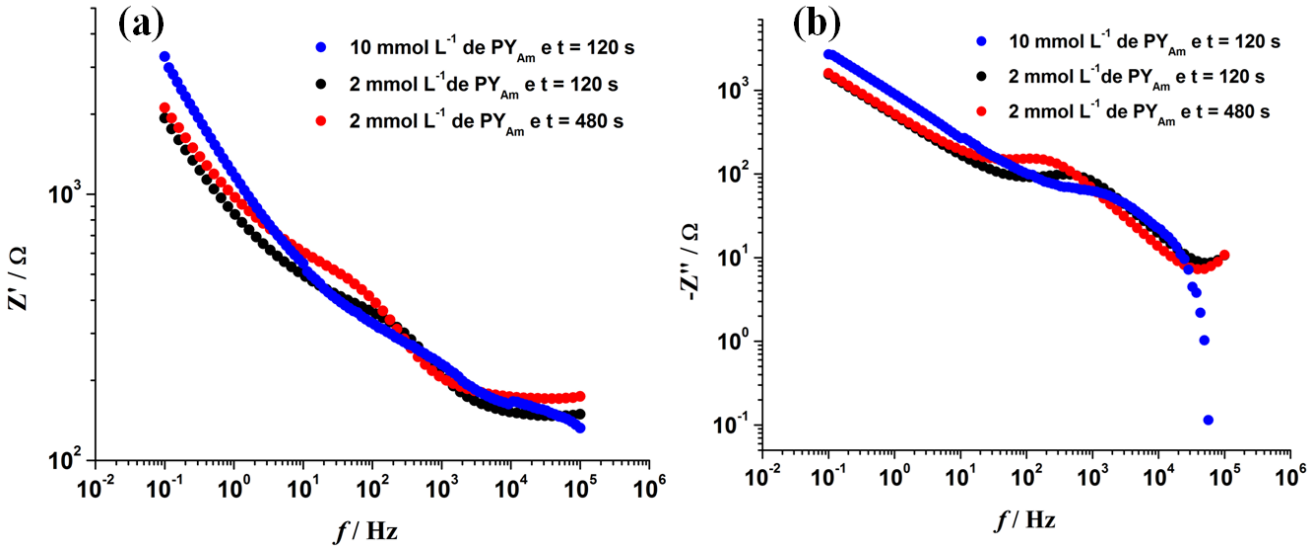


Tabela 1. Variação de R_{ct} , τ e C na caracterização da eletropolimerização do PPY_{Am}.

Sistemas	R_{ct} (Ω)	τ (ms)	C (μF)
10 mmol L^{-1} de PY_{Am}, e tempo= 120 s	-x	-x	-x
2 mmol L^{-1} de PY_{Am}, e tempo= 120 s	582	0,7	3,4
2 mmol L^{-1} de PY_{Am}, e tempo= 120 s	862	1,2	9,3

Figura 3. Espectroscopia de impedância eletroquímica (E_{rms} = 10 mV vs. referência), segundo a representação da parte imaginária e real em função da frequência Perfil eletroquímico da interface superfície/PPY_{Am}/QD-AMS em solução de 1 m do mol L^{-1} de $FeK_4(CN)_6/FeK_3(CN)_6$ em KCl 0,1 mol L^{-1} a T = 25 ºC.

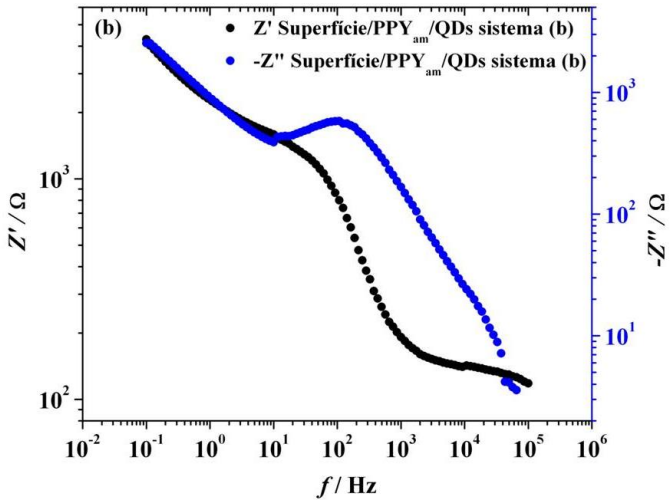


Figura 4. Perfil eletroquímico da interface superfície/PPY_{Am}/QD-AMS/Ac-IgG em solução de 1 mmol L^{-1} de $FeK_4(CN)_6/FeK_3(CN)_6$ em KCl 0,1 mol L^{-1} a T = 25 ºC da condição **c)**, que traz a espectroscopia de impedância eletroquímica (E_{rms} = 10 mV vs. referência), segundo a representação da parte imaginária e real em função da frequência.

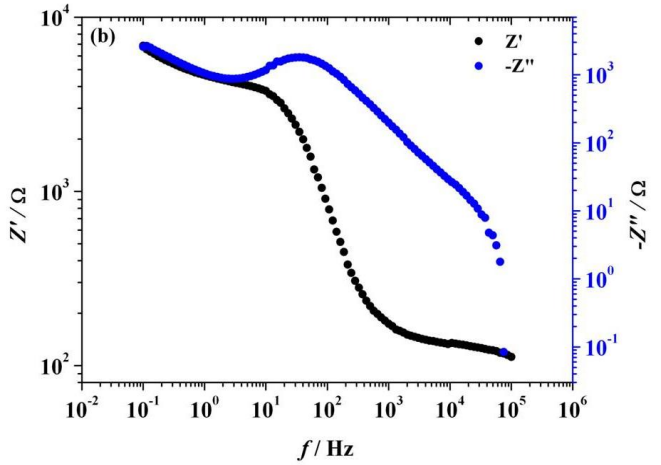


Figura 5. Espectroscopia de impedância eletroquímica (E_{rms} = 10 mV vs. referência), da interface superfície/PPY_{Am}/PQs-AMS/Ac-IgG em solução de 1 mmol L^{-1} de $FeK_4(CN)_6/FeK_3(CN)_6$ em KCl 0,1 mol L^{-1} a T = 25 ºC da condição **a)**, e da condição **c)**, segundo a representação da parte imaginária e real em função da frequência.

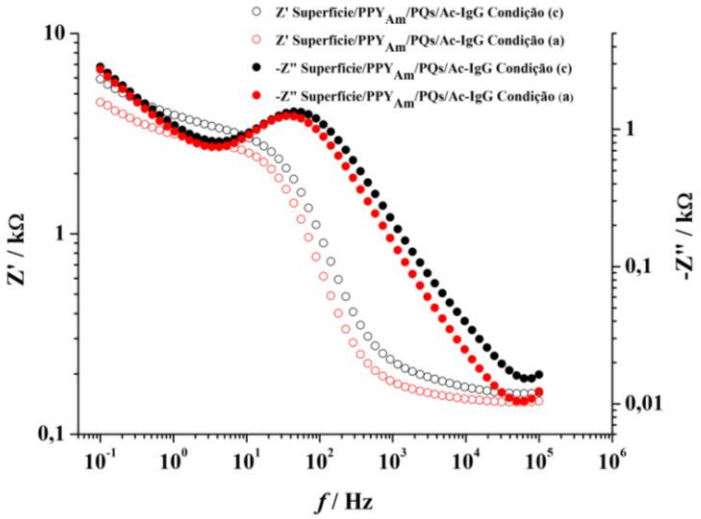
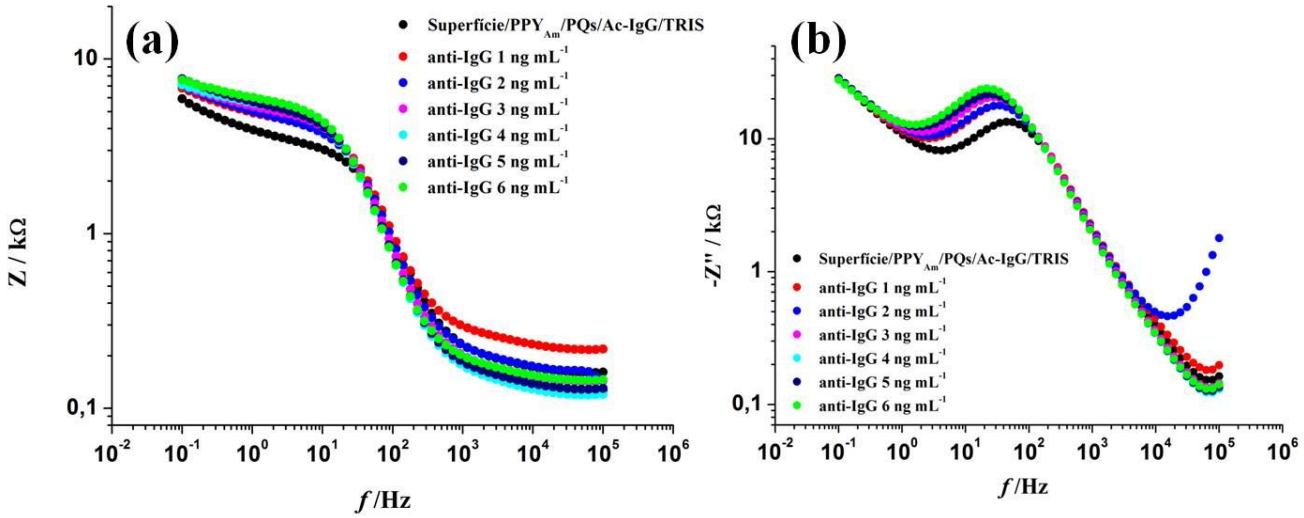


Figura 6. Espectroscopia de impedância eletroquímica da interface superfície/PPY_{Am}/PQs/Ac-IgG/anti-IgG/ (diferentes concentrações) em solução de 1 mmol L^{-1} de $FeK_4(CN)_6/FeK_3(CN)_6$ em KCl 0,1 mol L^{-1} a T = 25 ºC. Em **(a)** Z' vs. *f* e **(b)** -Z'' vs. *F*.



9.2 RESUMO EXPANDIDO ESCRITO NO MODELO DO CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA

PLATAFORMA BIOSSENSORA ELETROQUÍMICA BASEADA EM ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO POR PONTOS QUÂNTICOS

J. F. F. Ribeiro[1], J. R. S. Melo[3], K. B. O. Silva[3], B. S. Santos[4], G. A. L. Pereira[3], R. A. F. Dutra[1], R. T. Ribeiro[3], L. C. Silva[5], A. Fontes[2]

[1] Departamento Engenharia Biomédica, UFPE, Recife, Brasil
[2] Departamento de Biofísica e Radiologia, UFPE, Recife, Brasil
[3] Departamento de Química Fundamental, UFPE, Recife, Brasil
[4] Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPE, Recife, Brasil
[5] Campus Mata Norte, UPE, Nazaré da Mata, Brasil

e-mail: jessikafernandaferreira@gmail.com

Resumo: Nos últimos anos, a utilização de nanopartículas (NPs) vem sendo explorada no aperfeiçoamento de plataformas biossensoras, especialmente por contribuir no aumento da área superficial e na ordenação das biomoléculas imobilizadas. Dentre as NPs empregadas, estão os pontos quânticos (PQs), nanocristais fluorescentes de semicondutores que podem ser aplicados em plataformas biossensoras como intermediários entre o biorreceptor e a superfície do eletrodo. Diante desse contexto, este trabalho objetivou empregar e avaliar a utilização de PQs de CdTe carboxilados em uma plataforma biossensora eletroquímica baseada em eletrodo de carbono vítreo modificado com polipirrol aminado. Posteriormente, o anticorpo IgG foi imobilizado e a plataforma foi testada para a detecção do anti-IgG. Os PQs e os anticorpos foram imobilizados sobre a superfície modificada por ligação covalente utilizando carbodiimidas. Para se obter a melhor condição de imobilização dos anticorpos, foram previamente realizados estudos de conjugação em meio homogêneo através do ensaio fluorescente em microplaca (EFM). Todas as etapas de modificação do eletrodo foram monitoradas por voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. Como resultado, foi observada correlação entre as avaliações no eletrodo e na EFM, indicando que a melhor condição no EFM será em princípio uma escolha efetiva para a plataforma. As análises em meio heterogêneo, evidenciaram que, na presença dos agentes de acoplamento, os PQs e os anticorpos IgG foram então imobilizados de forma reprodutível e efetiva. Além disso, os estudos indicaram que a plataforma mostrou-se sensível para a detecção do anti-IgG, na faixa de ng mL^{-1}, mostrando potencial para ser aplicada na detecção de biomarcadores de diagnóstico.

Palavras-Chave: Biossensor, Pontos Quânticos, Polipirrol Aminado, Bioconjugação, Imunoglobulina.

Abstract: *In recent years, the use of nanoparticles (NPs) is being exploited for improving biosensors, specially by increasing their surface area and ordering the immobilized biomolecules on the biosensor platforms. Among these NPs, there are the quantum dots (QDs), fluorescent semiconductors nanocrystal that can be applied in biosensors platforms as intermediaries between bioreceptors and the electrode surface. In this context, the aim of this study was to employ and evaluate the use of carboxyl-coated CdTe QDs in a platform for an electrochemical biosensor based on a vitreous carbon electrode modified with amino functionalized polypyrrole. Subsequently, IgG antibodies were immobilized and the platform was tested in the detection of the anti-IgG. QDs and antibodies were immobilized on the surface, modified with the polypyrrole, by covalent coupling, using carbodiimides. To obtain the best antibody immobilization condition, studies about bioconjunction in homogeneous medium, by using the fluorescent microplate assay (FMA), were previously conducted. All electrode modifications stages were monitored by cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. Results showed that a correlation was observed between the bioconjugations experiments performed by FMA and on the electrode, indicating that the best condition in the FMA is in principle an effective choice for the platform. Analyses also revealed that, in the presence of coupling agents, QDs, as well as, IgG antibodies were immobilized in an effective and reproducible manner. Moreover, the studies indicated that the platform was sensitive for the detection of anti-IgG in the range of ng* mL^{-1}*, showing its potential to be applied in the detection of diagnostic biomarkers.*

Keywords: *Biosensor, Quantum Dots, Polypyrrole amino, Bioconjugation, Immunoglobulin.*

Introdução

Com os recentes avanços da nanotecnologia, as nanopartículas metálicas e semicondutoras têm despertado um grande interesse na área de biossensores, dispositivos capazes de fornecer uma resposta analítica (tal como a concentração de um analito) utilizando um elemento químico ou biológico de reconhecimento. Para tal, é usado um biorreceptor

acoplado a um transdutor, que permite a detecção quantitativa e específica de substâncias químicas ou biológicas. Os transdutores, por sua vez, podem ser classificados em ópticos, piezelétricos, calorimétricos ou eletroquímicos. Os biossensores eletroquímicos, em especial, medem alterações de corrente, potencial, condutividade, resistência elétrica, entre outros [1, 2]. Dessa forma, para que o sinal de interesse seja captado e convertido em um sinal elétrico, imobiliza-se o biorreceptor sobre uma superfície condutora, denominada eletrodo. Antes da imobilização dos biorreceptores, os eletrodos podem, ser modificados com polímeros, ou monocamadas automontadas, que em associação com nanopartículas podem proporcionar um aumento da área superficial do sensor e promover uma maior quantidade de biorecptores imobilizados, podendo assim gerar respostas analíticas com maior sensibilidade e reprodutibilidade [3]. Dentre as nanopartículas que vem ganhando interesse nessa área estão os pontos quânticos (PQs), que são nanocristais fluorescentes de semicondutores, com tamanhos de 2 a 10 nm. Os PQs exibem propriedades físico químicas que são significativamente diferentes, quando comparadas aos mesmos cristais em escala macroscópica, podendo ser aplicados no desenvolvimento de plataformas biossensoras ópticas e/ou eletroquímicas [4]. No contexto dos biossensores eletroquímicos, os PQs podem ser utilizados como intermediários entre o bioreceptor e a superfície do eletrodo, uma vez que possuem grupos funcionais para conjugação. Entretanto, a compreensão do seu papel nesses dispositivos ainda está em estudo. Os PQs possuem ainda uma estrutura isotrópica o que permite serem dispostos de maneira ordenada na superfície do eletrodo [4]. Dentro deste contexto, esse trabalho teve como objetivo empregar e avaliar a utilização de PQs de CdTe carboxilados em uma plataforma biossensora eletroquímica baseada em eletrodo de carbono vítreo modificado por polipirrol aminado. Utilizando o IgG e o anti-IgG como modelos de biomoléculas, a plataforma biossensora foi então testada para a detecção do anti-IgG após a imobilização do anticorpo IgG.

Materiais e Métodos

Análises eletroquímicas: Utilizou-se uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos: um de trabalho (carbono vítreo), um auxiliar e um de referência, sendo as medidas realizadas em um potenciostato/galvanostato Princeton Applied Research (PAR) VersaStat 3.0. As caracterizações eletroquímicas foram realizadas por voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) em solução 0,1 mol L^{-1} de KCl contendo 1 mmol L^{-1} de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ temperatura de 25 ºC e desareada com gás inerte (N_2) por no mínimo 10 min.

Caracterização dos PQs: Os nanocristais de CdTe, estabilizados com ácido mercaptosuccínico (AMS), utilizados nesse trabalho foram sintetizados pelo grupo [5] e apresentaram um primeiro máximo em absorção em 530 nm, sendo o tamanho do PQ de aproximadamente 3,0 nm. Estimou-se que a concentração das suspensões é de aproximadamente 7 x 10^{14} partículas mL^{-1}. Já o espectro de emissão indicou um máximo em 589 nm com FWHM = 46 nm.

Imobilização dos PQs sobre a superfície polimerizada: Inicialmente o eletrodo de carbono vítreo (ECV) foi eletropolimerizado com PPy_{Am}-(2-(1H-Pirrol-1yl) etanoamina, Sigma Aldrich) pela técnica de cronoamperometria em uma solução de 10 mmol L^{-1} de PY_{Am} em HNO_3 0,1 mol L^{-1} para a formação do filme polimérico. Para tanto, foi aplicado um potencial de 1,3 V por um intervalo de tempo de 120 s. Em seguida, os PQs (pH 5,5) foram imobilizados sobre a superfície, por meio de ligação covalente. Para tanto, o eletrodo polimerizado foi imerso em uma solução contendo 2 mmol L^{-1} de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e de 5 mmol L^{-1} de sal de sódio N-hidroxisuccinimida (Sulfo-NHS), juntamente com os PQs, por um período de 24 horas.

Imobilização do IgG e detecção do anti-IgG: Inicialmente, antes da imobilização do IgG (Sigma Aldrich) no eletrodo, foram realizados estudos de bioconjugação em meio homogêneo utilizando a metodologia de ensaio fluorescente em microplaca (EFM), que se baseia na afinidade da proteína pela microplaca de poliestireno [5]. Para isso, os PQs, o IgG e os conjugados PQs-IgG foram adicionados na microplaca, a qual foi incubada em banho-maria a 37 °C por 2 horas. Após a incubação, os poços foram lavados e a leitura foi realizada num equipamento Victor 2 (PerkinElmer). A intensidade do sinal é proporcional à eficiência da conjugação. Assim, quanto mais alto for o sinal da fluorescência medido, mais eficiente foi a imobilização dos PQs na microplaca, através das biomoléculas, e, portanto melhor foi a conjugação. O cálculo é feito pela diferença relativa das médias da fluorescência (FL) do bioconjugado (PQs-IgG) em relação à média de FL dos controles (PQs e IgGs):

$$FL\ Relativa\ (\%) = \frac{(FL\ Bioconjugado - FL\ Controles)}{FL\ Controles} x100$$

Para ter ocorrido conjugação, os valores da FL relativa devem ser maiores que 100% [5]. Como forma de otimizar o sistema, foram utilizadas variações nas quantidades de EDC, Sulfo-NHS e IgG, segundo a **Tabela 1**.

Tabela 1. Variações de EDC, Sulfo-NHS e anticorpo para conjugação homogênea do sistema.

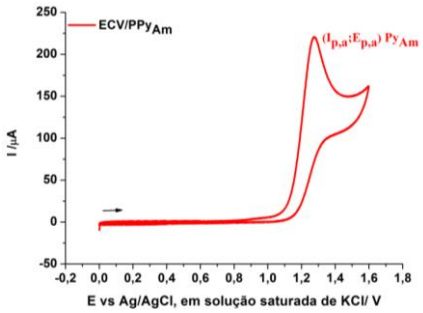
EDC e Sulfo-NHS	IgG
2 mmol L^{-1} e 5 mmol L^{-1}	46 µg mL^{-1} e 91 µg mL^{-1}
10 mmol L^{-1} e 25 mmol L^{-1}	46 µg mL^{-1}
20 mmol L^{-1} e 50 mmol L^{-1}	46 µg mL^{-1} e 91 µg mL^{-1}

Para todos os ensaios foram utilizados 1 mL de PQs na diluição de 1:7. As incubações dos PQs com os IgGs foram realizadas por 24 horas a 4 °C. Posteriormente as condições utilizadas foram aplicadas no meio heterogêneo, a fim, não só de determinar a melhor condição a ser aplicada na imobilização do IgG à superficie modificada com PQs, como também desenvolver um método que auxilie se otimizar, com maior rapidez, a plataforma biossensora. Após essa etapa, a superfície do eletrodo modificada foi então imersa em soluções contendo a menor e a maior concentração de EDC e Sulfo-NHS, e 46 µg mL^{-1} do IgG (**Tabela 1)**, diluídos em solução de PBS por um período de 24 horas. Após a imobilização do IgG e bloqueio com TRIS base (1 mM), a plataforma biossensora foi testada através de sucessivas incubações com anti-IgG (Fragmento, F_{ab}, Sigma Aldrich), sendo gotejados 10 µL dessa biomolécula (1 ng mL^{-1}), diluída em PBS sobre a superfície do eletrodo a cada 30 min.

Resultados

Imobilização dos PQs-AMS sobre a interface superfície/PPy_{Am}: A partir da VC (**Figura 1**) foi possível determinar a região em que ocorre o processo de polimerização (0,90 - 1,50 V), apresentando o valor de potencial fixo de $E_{p,a}$ de c.a. 1,3 V, o qual posteriormente foi aplicado na técnica de cronoamperometria para a formação do filme.

Figura 1. VC da superfície de carbono vítreo em solução de 10 mmol L^{-1} de PY_{Am} em HNO_3 0,1 mol L^{-1}.



Após a polimerização, foi realizada a imobilização dos PQs carboxilados sobre a superfície modificada por pirrol aminado por meio de ligação covalente. Na **Figura 2** é possível observar, o VC da superficie polimerizada (vermelho), que não apresentou grandes variações em relação à superfície de carbono vítreo (preto). Entretanto, após a imobilização dos PQs (azul), o VC apresentou um comportamento distinto, observado a partir da diferença nas correntes de pico anódica e catódica (ΔE_p) de ~ 0,15 V, que representa um aumento de *c.a.* 88% em relação aos sistemas anteriores (os quais apresentaram diferença de ~ 0,079 V). As observações anteriores podem ser reforçadas pelos dados obtidos pela EIE (**Figura 3)**, apresentados segundo a representação de Nyquist, que traz a impedância imaginaria (Z") versus a impedância real (Z'). Tal representação permite obter valores de resistências associados a processo de transferência de carga, que podem ser relacionados à presença de semicírculos. No gráfico é possível observar que o sistema tem seu processo de transferência de carga dificultado pela presença do PQ, uma vez que apresenta um aumento da resistência de transferência de carga R = 1303 Ω, entretanto o mesmo não é observado para os dois outros sistemas.

Figura 2. VCs para as diferentes superfícies em solução de 1 mmol L^{-1} de $FeK_4(CN)_6/FeK_3(CN)_6$ em KCl 0,1 mol L^{-1}, v = 0,1 V s^{-1}.

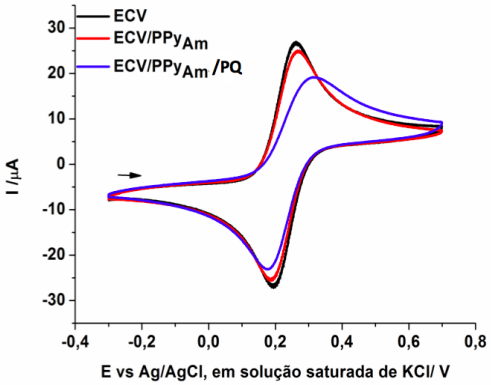
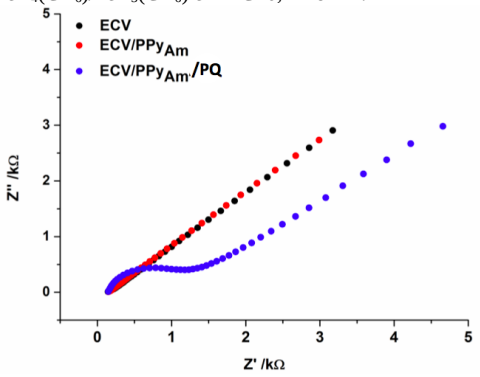
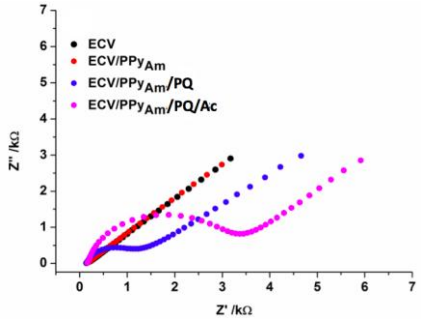


Figura 3. EIE para as diferentes superfícies em solução de 1 mmol L^{-1} de $FeK_4(CN_6)/FeK_3(CN_6)$ em KCl 0,1 mol L^{-1}.



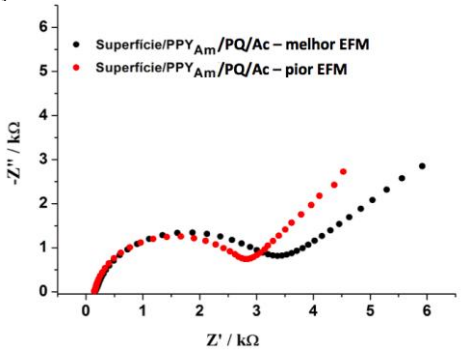
Imobilização do IgG e detecção do anti-IgG: Na EFM, os resultados dos controles mostraram um sinal médio de *c.a.* 232 ua. Comparando com o sinal dos PQs-IgG, se assumiu então como pior condição de conjugação a com menor concentração de EDC, Sulfo-NHS e IgG, uma vez que a FL relativa foi 80%. A melhor condição foi adotada a do sistema com maior quantidade de agentes de acoplamento, e com 46 µg mL^{-1} de IgG, pois a FL relativa foi de 960% indicando que houve conjugação. Após essa etapa, foi realizada então a imobilização dos anticorpos (IgG) utilizando a maior (melhor condição) e menor (pior condição) quantidade de EDC e Sulfo-NHS, e 46 µg/mL do anticorpo. Os **(Figura 4)** mostraram que houve a imobilização efetiva do anticorpo IgG, para o sistema com maior concentração de agentes de acoplamento, uma vez que foi observado um aumento significativo da resistência R = 3040 Ω, demonstrando que a presença do IgG promove um aumento em *c.a.* 133%, em relação ao sistema superfície/PPy_{Am}/PQs-AMS.

Figura 4. EIE da interface superfície/PPy_{Am}/PQ-AMS/IgG em solução de 1 mmol L^{-1} de $FeK_4(CN)_6/FeK_3(CN)_6$ em KCl 0,1 mol L^{-1} a T = 25 ºC do sistema com maior concentração de EDC e Sulfo-NHS.



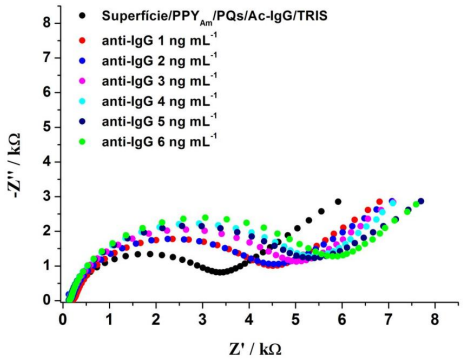
Na **Figura 5**, se encontra também o resultado para a imobilização do IgG utilizando a menor concentração de agentes de acoplamento, os quais mostram que houve a imobilização do IgG, entretanto não ocorreu de maneira tão efetiva como no anterior. Os dados da EIE fornecem um R = 2535,2 Ω, representando um aumento de *c.a.* 94%, em relação ao sistema superfície/PPY_{Am}/PQs-AMS. Dessa forma, se observa que há uma correlação entre os estudos por EFM e no eletrodo. Entretanto, as variações no meio homogêneo se mostraram mais críticas para a conjugação e a pior condição da EFM pode ser ainda aceitável para o eletrodo. No entanto, é certo que a melhor condição no EFM será em princípio uma escolha efetiva para a plataforma.

Figura 5. EIE para diferentes superfícies em solução de 1 mmol L^{-1} de $FeK_4(CN_6)/FeK_3(CN_6)$ em KCl 0,1 mol L^{-1}, melhor e pior condição.



A fim de testar a plataforma, o sistema (CV/ PPy_{Am}/ PQs) foi incubado com o anti-IgG. A partir dos diagramas de Nyquist (**Figura 6),** é possível observar que após cada incubação o sistema tem seu processo de transferência de carga gradativamente dificultado (aumento da região de semicírculo) dada a interação anticorpo-antígeno, evidenciando que essa interação altera os parâmetros associados ao processo de transferência de carga. Esse resultado mostra que é possível se detectar antígenos na ordem de ng mL^{-1} com essa plataforma biossensora indicando ter sensibilidade [6].

Figura 6. EIE da interface superfície/PPY_{Am}/PQs/IgG/anti-IgG (diferentes concentrações) em solução de 1 mmol L^{-1} de $FeK_4(CN)_6/FeK_3(CN)_6$ em KCl 0,1 mol L^{-1} a T = 25 ºC.



Conclusão

A formação do filme polimérico a base de PPY_{Am}, contribui para a imobilização covalente efetiva dos PQs. Além disso, foi observada correlação entre os resultados do EFM/eletrodo, indicando que a melhor condição no EFM será em princípio uma escolha efetiva para a plataforma. Os estudos também mostraram que o anti-IgG foi detectado, na ordem de ng mL^{-1}, pela interface CV/PPY_{Am}/PQs/IgG após sucessivas incubações, se mostrando como uma potencial plataforma para ser utilizada na detecção de biomarcadores de diagnóstico.

Agradecimentos: Os autores agradecem ao CNPq e à FACEPE. Os autores são membros do INCT de Fotônica.

Referências

[1] F. Wang, S. Hu, Electrochemical sensors based on metal and semiconductor nanoparticles. Microchim, 165, 1–22, 2009.

[2] F. T. Moreira, R. A. Dutra, J. P. Noronha, A. L. Cunha, M. G. Sales, Artificial antibodies for Troponin T by its imprinting on the surface of Multiwalled Carbon Nanotubes: its use as sensory surfaces. Biosens Bioelectron, 15, 243 – 250, 2011.

[3] X. Lu, X. Wang, J. Jin, Q. Zhang, J. Chen, Electrochemical biosensing platform based on amino acid ionic liquid functionalized graphene for ultrasensitive biosensing applications, Biosens Bioelectron 62, 134 – 139, 2014.

[4] B. S. Santos, P. M. A. Farias, A. Fontes, Semiconductor Quantum Dots for Biological Applications in Handbook of Self Assembled Semiconductor Nanostructures Novel Devices in Photonics and Electronics, 773–798, 2008.

[5] K. H. G. Carvalho, et al., Fluorescence Plate Reader for Quantum Dot-Protein Bioconjugation Analysis. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 14, 3320 – 3327, 2014.

[6] D. G. A. Cabral, E. C.S. Lima, P. Moura, R. F. Dutra, A label-free electrochemical immunosensor for hepatitis B based on hyaluronic acid–carbon nanotube hybrid film. Talanta,148, 209–215, 2016.

9.3 PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS

CERTIFICADO

XX SIBEE
UBERLÂNDIA – MG

Certificamos que o trabalho **"EMN010 - Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados por Quantum Dots - Aplicação em anticorpo IgG"** de autoria de *JÉSSIKA FERNANDA FERREIRA RIBEIRO,KARLA BEATRIZ OLIVEIRA DA SILVA,JOSÉ RODRIGO DA SILVA MELO,BEATE SAEGESSER SANTOS,GIOVANNIA ARAUJO DE LIMA PEREIRA,ROSA AMALIA FIREMAN DUTRA,ROGÉRIO TAVARES RIBEIRO,LÊDA CRISTINA DA SILVA,ADRIANA FONTES* foi apresentado na modalidade de **COMUNICAÇÃO ORAL** durante o ***XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (XX SIBEE)***, realizado de 17 a 21 de agosto de 2015, no *Center Convention* em Uberlândia-MG.

Uberlândia, 21 de agosto de 2015.

Prof. João Marcos Madurro
Presidente da Comissão Organizadora

Prof. Artur de Jesus Motheo
Coordenador da Comissão Científica

XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica
Center Convention - Uberlândia - MG
17 a 21 de agosto de 2015

Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados por Quantum Dots - Aplicação em anticorpo IgG

Vitreous Carbon Electrode Modified by Quantum Dots - Application for IgG antibody

J. F. F. Ribeiro[1,*], J. R. S. Melo[1], K. B. O. Silva[1], B. S. Santos[1], G. A. L. Pereira[1], R. A. F. Dutra[1], R. T. Ribeiro[1], L. C. Silva[2] e A. Fontes[1]

[1]*Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Morais Rego, 1235. Cidade Universitária - Recife - PE - Brasil*
[2]*Universidade de Pernambuco. Campus Mata Norte. Rua Prof. Amaro Maltez, S/N. Nazaré da Mata - PE - Brasil*

Resumo: O uso de nanopartículas metálicas e semicondutoras no desenvolvimento de biossensores vem aumentando nos últimos anos [1]. Sua utilização vem proporcionando um aumento da área superficial dos eletrodos, promovendo uma imobilização mais efetiva de biomoléculas, bem como, de espécies eletroativas, podendo assim melhorar a sensibilidade de detecção do biossensor. Dentre as nanopartículas semicondutoras, estão os Quantum Dots (QDs) que são nanocristais de 2 a 10 nm com propriedades ópticas e elétricas diferenciadas. Os QDs podem ser aplicados no desenvolvimento de plataformas para biossensores eletroquímicos através de sua imobilização como intermediários entre o bioreceptor e a superfície do eletrodo, e também para conjugação com a biomolécula [2]. Dessa forma, esse trabalho objetivou o estudo da imobilização de QDs de CdTe estabilizados com ácido mercaptosuccínico (QDs-MSA) sobre a superfície de eletrodos de carbono vítreo modificados por polímero condutor derivado do 2-(1H-Pirrol-1-il) etanoamina. Para tanto, o eletrodo modificado foi imerso por 24 horas em uma solução de 2 mmol L^{-1} de EDC (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida), e 5 mmol L^{-1} de Sulfo-NHS (N-hidroxilsulfosuccinimida), em pH~6.0, a fim de possibilitar a formação de ligações amidas (reação entre COOH e NH_2) entre os QDs e a superfície de carbono vítreo modificada por pirrol aminado. Após a modificação, o eletrodo foi imerso por mais 24 horas em uma solução contendo anticorpo IgG e também EDC e Sulfo-NHS para sua imobilização. Todas as etapas de modificações do eletrodo foram monitoradas por voltametria cíclica em uma solução aquosa com 0,1 mol L^{-1} de KCl e 1 mmol L^{-1} de $FeK_4(CN)_6$/$FeK_3(CN)_6$ (sonda eletroquímica). Os resultados foram analisados em relação às variações nas regiões de oxidação (anódico) e redução (catódico). Para a superfície do eletrodo polimerizada, o voltamograma não apresentou consideráveis variações em relação ao eletrodo limpo (CV), na região de oxidação. Já com a imobilização dos QDs-MSA, há uma diminuição da intensidade da corrente, dificultando o processo de transferência de carga, provavelmente relacionado natureza da interface semicondutor/semicondutor (polipirrol aminado/QDs-MSA). Posteriormente, a imobilização do IgG apresentou uma diminuição das correntes de pico catódicas e anódicas, indicando a presença dessas biomoléculas imobilizadas na superfície do eletrodo. O estudo possibilitou a confirmação tanto da formação da primeira modificação (polímero), como também da imobilização dos QDs e do anticorpo à superfície.

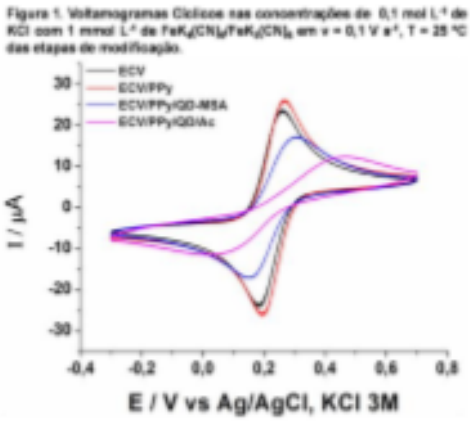


Figura 1. Voltamogramas Cíclicos nas concentrações de 0,1 mol L^{-1} de KCl com 1 mmol L^{-1} de $FeK_4(CN)_6$/$FeK_3(CN)_6$ em v = 0,1 V s^{-1}, T = 25 °C das etapas de modificação.

Agradecimentos:
FACEPE, CNPq e Capes

Referências:
[1] F. Wang; S. Hu. *Microchim. Acta* 165 (2009) 1 – 22.
[2] Q. Ma ; X. Su. *Analyst* 136 (2011) 4883 – 4893.

***e-mail do autor principal:** jessikafernandaferreira@gmail.com

VI Encontro Regional da SBQ Nordeste

CERTIFICADO

6º Encontro Regional da SBQ Nordeste - "A Química e a Biotecnologia do Nordeste: o caminho da Pesquisa para a Inovação"

A comissão organizadora do VI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química – Nordeste realizada de 17 a 19 de junho de 2015, na cidade de Maceió/AL, certifica que **JÉSSIKA FERNANDA FERREIRA RIBEIRO**, apresentou o trabalho: ***Aplicação de quantum dots na modificação de eletrodos de carbono vítreo,*** na modalidade oral.

Profª Drª Isis Martins Figueiredo
Presidente da Comissão Organizadora
VI Encontro Regional da SBQ NE

Certificado

Certificamos que o trabalho, com o título: *"Emprego de Quantum Dots no Desenvolvimento de Diferentes Plataformas com Aplicação em Biossensores Eletroquímicos"* de autoria de **Jéssika Fernanda Ferreira Ribeiro** e co-autoria de **Wadja M. A. Guimarães, José Rorigo S. Melo, Aline D. P. R. Oliveira, Karla B. O. Silva, Giovannia P. A. Lima, Beate S. Santos, Leda C. Silva, Rosa A. F. Dutra** e **Rogério T. Ribeiro**, sob orientação de Adriana Fontes, com carga horária de 20 horas, foi apresentado durante o evento **"Encontro Anual da Biofísica 2015"**, promovido pelo Departamento de Biofísica e Radiobiologia - CCB, nos dias de 19 e 20 de março de 2015.

Recife, 20 de março de 2015.

Profa. Solange Galvão Coutinho
Pró-Reitora de Extensão (Pro Tempore)

Otacílio Antunes Santana
Coordenador do Evento

PROEXT
PRÓ-REITORIA DE EXTENSÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235, Cidade Universitária | Recife/PE