

CAROLINA GOMES DA ROCHA

**Desenvolvimento de imunossensor impedimétrico
para detecção do corante disperso Red 1**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Hideko Yamanaka.

Coorientador: Dr. Antonio Ap. Pupim Ferreira.

Araraquara

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

R672d	<p>Rocha, Carolina Gomes da</p> <p>Desenvolvimento de imunossensor impedimétrico para detecção do corante disperso Red 1 / Carolina Gomes da Rocha. – Araraquara : [s.n], 2014</p> <p>110 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química</p> <p>Orientador: Hideko Yamanaka</p> <p>Coorientador: Antonio Aparecido Pupim Ferreira</p> <p>1. Química analítica. 2. Espectroscopia de impedância. 3. Corantes. 4. Biossensores. 5. Eletroquímica. I. Título.</p>
-------	---

DADOS CURRICULARES

Nome: Carolina Gomes da Rocha

Nascimento: 18 de março de 1988

Filiação: Genivaldo Gomes da Rocha e Marcia Mauricio Gomes da Rocha

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Limeira - SP

Endereço eletrônico: carolgomesrocha@hotmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2012 – 2014: Mestrado em Química junto ao Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, São Paulo, Brasil.

Projetos:

1. Título: Desenvolvimento de imunossensor impedimétrico para detecção do corante disperso red 1.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Hideko Yamanaka.

Coorientador: Dr. Antonio Aparecido Pupim Ferreira.

Bolsista: FAPESP (Processo FAPESP nº 2011/15277-2).

2. Estágio no laboratório de pesquisa do “Gruppo Sensori e Biosensori” da Università degli Studi di Firenze, no Departamento de Química “Ugo Schiff”, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Giovanna Marrazza em Florença, Itália, de 10 de junho a 10 de setembro de 2012. Bolsa concedida pelo 7th Frame Program IRSES (PIRSES-GA-2008-230849).

2007 – 2011: Graduação em Licenciatura em Química junto ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, São Paulo, Brasil.

Projetos de Iniciação Científica:

1. Título: Biossensor à base de filme de tetraisopropóxido de titânio.

Período: Agosto de 2008 a Julho de 2010.

Orientadora: Prof^a. Dr.^a Hideko Yamanaka.

Coorientadora: Dr^a. Carolina Venturini Uliana.

Bolsista: CNPq.

2. Título: Estudo da interação do pesticida clorpirifós com DNA utilizando espectroscopia UV-Vis.

Período: Agosto de 2010 a Dezembro de 2011.

Orientador: Dr. Gustavo Stoppa Garbellini.

Coorientadora: Prof^a. Dr.^a Hideko Yamanaka.

Bolsista: FAPESP (Processo n^o: 2010/07527-6).

Projetos de Extensão Universitária:

1. Título: Ciência Viva

Descrição: Projeto de visitação ao Centro de Ciências de Araraquara por alunos de escolas, públicas, particulares e comunidade.

Período: Março de 2007 a Dezembro de 2007.

Responsável: Prof. Dr. Luiz Antonio Andrade de Oliveira.

Financiador: Pró-Reitoria de Extensão Universitária – PROEX.

2. Título: Plantão de Dúvidas

Descrição: Programa de tira-dúvidas destinado a estudantes do ensino fundamental, médio e de cursos pré-vestibulares de Araraquara.

Período: Março de 2007 a Dezembro de 2007.

Responsável: Prof. Dr. Luiz Antonio Andrade de Oliveira.

Financiador: Pró-Reitoria de Extensão Universitária – PROEX.

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS (RESUMO)

1. ROCHA, C. G.; FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. *Avaliação de diferentes rotas de imobilização de anticorpos no desenvolvimento de imunossensor impedimétrico para detecção do corante disperso Red 1*. In: **17^o Encontro Nacional de Química Analítica**, 2013, Belo Horizonte.

2. ROCHA, C. G.; FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. *Desenvolvimento de imunossensor impedimétrico para detecção do corante disperso red 1*. In: **I Escola Internacional de Corantes: Análise, Degradação e Toxicidade**, 2012, Araraquara.

3. ROCHA, C. G.; GARBELLINI, G. S.; YAMANAKA, H. *Avaliação espectrofotométrica da interação dos pesticidas acefato e carbaril com ds-DNA de calf thymus*. In: **18º Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, 2011, São José do Rio Preto.

4. ROCHA, C. G.; GARBELLINI, G. S.; YAMANAKA, H. *Estudo da interação do pesticida clorpirifós com DNA utilizando espectroscopia UV-Vis*. In: **34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2011, Florianópolis.

5. ROCHA, C. G.; ULIANA, C. V.; TOMAZ, P.R.U.; YAMANAKA, H. *Estudo da imobilização da enzima peroxidase sobre eletrodos de grafite utilizando diferentes matrizes sol-gel*. In: **17º Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, 2009, Araraquara.

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS (RESUMO EXPANDIDO)

1. ROCHA, C. G.; GARBELLINI, G. S.; YAMANAKA, H. *Estudo da interação de pesticidas organofosforados com DNA utilizando espectroscopia UV-Vis*. In: **XXIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP – Segunda Fase**, 2011, São Pedro.

2. ROCHA, C. G.; GARBELLINI, G. S.; YAMANAKA, H. *Estudo da interação de pesticidas organofosforados com DNA utilizando espectroscopia UV-Vis*. In: **XXIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP – Primeira Fase**, 2011, Araraquara.

3. ROCHA, C. G.; ULIANA, C. V.; YAMANAKA, H. *Desenvolvimento de biossensor amperométrico para detecção do ácido 5-aminossalicílico*. In: **XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP – Primeira Fase**, 2010, Araraquara.

4. ROCHA, C. G.; ULIANA, C. V.; YAMANAKA, H. *Desenvolvimento de biossensor amperométrico para detecção do ácido 5-aminossalicílico*. In: **XXII Congresso de Iniciação**

Científica da UNESP – Segunda Fase, 2010, Marília.

5. ROCHA, C. G.; ULIANA, C. V.; YAMANAKA, H. *Estudo da imobilização da enzima peroxidase (HRP) sobre eletrodos de grafite de lapiseira utilizando o planejamento fatorial completo.* In: **XXI Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, 2009, São José do Rio Preto.

PRÊMIOS

1. Melhor trabalho da divisão de química analítica apresentado no **18º Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, realizado em São José do Rio Preto, 2011. Título do trabalho premiado: *Avaliação espectrofotométrica da interação dos pesticidas acefato e carbaril com ds-DNA de calf thymus.* Autores: ROCHA, C. G.; GARBELLINI, G. S.; YAMANAKA, H.

2. Menção Honrosa concedida pela Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pela classificação entre os dez melhores trabalhos da área de exatas no **XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP – Segunda Fase**, realizado em Marília, 2010. Título do trabalho apresentado: *Desenvolvimento de biossensor amperométrico para detecção do ácido 5-aminossalicílico.* Autores: ROCHA, C. G.; ULIANA, C. V.; YAMANAKA, H.

3. Menção Honrosa concedida pela Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pela classificação entre os dez melhores trabalhos do Instituto de Química de Araraquara no **XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP – Primeira Fase**, realizado em Araraquara, 2010. Título do trabalho apresentado: *Desenvolvimento de biossensor amperométrico para detecção do ácido 5-aminossalicílico.* Autores: ROCHA, C. G.; ULIANA, C. V.; YAMANAKA, H.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

1. Participação na **Escola de Impedância Eletroquímica** realizada no Instituto de Química de Araraquara, no período de 14 a 18 de outubro de 2013.
2. Participação na disciplina intersemestral “**Biologia Química – Princípios e Aplicações**” oferecida pelo grupo **Químicas Integradas G6** realizada na Universidade Federal do ABC, Santo André, 2011.

ATIVIDADES EXTRACURRICULARES

Membro da Comissão Organizadora do **VII Evento de Educação em Química (VII EVEQ)** realizado no Instituto de Química de Araraquara, em 2009.

CAROLINA GOMES DA ROCHA

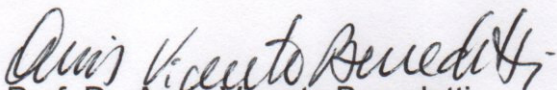
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Química.

Araraquara, 19 de agosto de 2014.

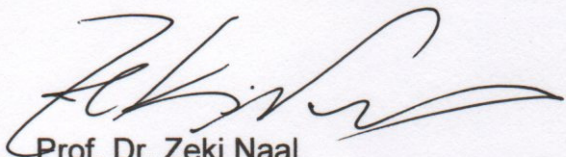
BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Hideko Yamanaka (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Prof. Dr. Assis Vicente Benedetti
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Prof. Dr. Zeki Naal
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP / Ribeirão Preto

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Genivaldo e Marcia,
pelo exemplo de perseverança e esperança,
fundamentais a meu ver, para se viver essa vida.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Dr^a. Hideko Yamanaka que me proporcionou nestes quase seis anos de convivência, oportunidades que nunca imaginei que um dia pudesse usufruir, e que me enriqueceram imensamente tanto profissionalmente como pessoalmente. Por ter tido muita paciência, por ter acreditado em mim. Pelas conversas e emails que me encorajaram quando estava desanimada ou desesperada. Por ser um exemplo de grande profissionalismo e sensibilidade com as pessoas. Por saber equilibrar isso muito bem.

Ao Dr. Antonio Ap. Pupim Ferreira pelos muitos ensinamentos e conselhos compartilhados comigo durante todo o período do mestrado. Pela imensa paciência, cuidado e atenção demonstrados a mim. Pela sua serenidade. Pela coorientação e mais ainda por sua amizade.

À Dr^a. Carolina Venturini Uliana que me ensinou tantas coisas, com tanta paciência e carinho, nos meus primeiros passos em um laboratório de pesquisa durante a iniciação científica. Por ser um exemplo de seriedade e de competência e também uma pessoa tão amável.

À Dr^a. Naira Canevarolo Pesquero pelas valiosas discussões e sugestões feitas no decorrer do projeto e por ter se importado e se esforçado para entender o meu trabalho, sempre buscando ajudar e mostrar uma nova perspectiva.

Ao Ms. Marcos Vinicius Foguel pelas discussões, críticas e sugestões. Pela disponibilidade e atenção para me auxiliar no que precisasse, pelo tempo despendido e pela paciência para sanar muitas de minhas dúvidas.

Ao Professor Dr. Leonardo Lataro Paim pela grande disponibilidade para me auxiliar nas questões técnicas dos equipamentos e dos eletrodos e por ter sido muito gentil sempre, mesmo quando eu estava em apuros por ter cometido algum erro. Por sua grande ajuda e apoio demonstrados no decorrer do trabalho, mesmo não tendo qualquer obrigação para comigo.

Ao Professor Dr. Nelson Ramos Stradiotto pelas críticas e questionamentos provocadores, que apesar de difíceis de serem recebidos, sempre agregaram conhecimento e uma visão diferente em relação ao trabalho.

À Professora Dr^a. Maria Valnice Boldrin Zanoni por suas sugestões, dicas e incentivo.

Ao Professor Dr. Assis Vicente Benedetti pelas discussões e importantes conselhos dados a mim em meu exame de qualificação.

À Dr^a. Carla Riccardi pelas discussões e sugestões também feitas em meu exame de qualificação.

Ao Ms. Jefferson Honorio Franco pela realização e auxílio nas medidas realizadas com HPLC-UV-Vis.

A todo grupo de pesquisa GEAr pela boa convivência, amizade, risadas, ajuda, sugestões e troca de experiências.

Ao Instituto de Química pela excelente estrutura que proporciona aos seus alunos. Aos funcionários do IQ que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento e concretização desta dissertação de mestrado.

À FAPESP (Processo nº 2011/15277-2) pela bolsa concedida.

...

Ao meu pai, pelo amor, serenidade, sabedoria e doçura compartilhadas comigo durante toda a minha vida, em especial durante as etapas de desafios e projetos. Pelo exemplo de força, perseverança e esperança que ele é. Pelo exemplo de autoconhecimento que ele me dá. Por ser um dos meus melhores amigos. Por ser uma das pessoas mais inteligentes com quem já tive a oportunidade de conviver. Por me inspirar sempre e de modo tão natural.

À minha mãe, pelo amor, apoio e companhia. Por ter estado sempre comigo, indo e fazendo o que fosse necessário quando precisei de ajuda, sempre com muita disposição. Por me ensinar a ter iniciativa, a não ter preguiça e a entender que sempre é tempo de nos esforçarmos para melhorarmos a nós mesmos. Por me ensinar a fazer o que for, mesmo a tarefa aparentemente mais simplória, com capricho e cuidado. Por me lembrar constantemente de que é preciso ter coragem.

Aos meus irmãos: Renan e Marina pelo amor e apoio.

Ao meu namorado Josiel pelo amor, companheirismo, paciência e carinho. Por sempre ter me incentivado, me apoiado e ajudado. Por me conhecer mais do que qualquer um, e ainda assim, querer estar ao meu lado. Por me ensinar a ser mais racional, mais humilde e mais consciente de que apesar de únicos, somos só mais um. Por sua convicção inspiradora e às vezes, assustadora.

Aos amigos e também químicos: Higor, Elaine, Carolina Rabal, Vinicius, Harry, Juliana, Glauco, Naira, Lívia, Diego, Fabio e Leandro. Por tornarem minha vida mais leve, bonita e divertida. Obrigada por compartilharem esses anos de amizade comigo. Foi um prazer e um privilégio conviver com vocês!

EPÍGRAFE

nada tão comum
que não possa chamá-lo
meu

nada tão meu
que não possa dizê-lo
nosso

nada tão mole
que não possa dizê-lo
osso

nada tão duro
que não possa dizer
posso

Paulo Leminski
Livro Caprichos & Relaxos
Editora Brasiliense, 1985.

RESUMO

Os corantes azo estão entre os mais utilizados pela indústria têxtil brasileira, representando de 20-40% dos corantes empregados para tingir algodão, rayon, nylon, seda, lã e couro. Um fator preocupante relacionado a estas substâncias é que estudos utilizando micro-organismos e células de mamíferos têm demonstrado que diversos corantes azo apresentam atividade genotóxica, mesmo em baixas concentrações. Além disso, atualmente ainda não estão vigorando métodos oficiais para efetiva remoção dos corantes presentes nos efluentes gerados no processo de tingimento dos tecidos, e isso faz com que essas substâncias possam chegar à água destinada ao consumo, e assim, o desenvolvimento de dispositivos sensores para o monitoramento dos corantes em água se torna de grande importância. Diante disso, o presente trabalho versa sobre o desenvolvimento de um imunossensor impedimétrico para detecção e quantificação do corante azo Disperso Red 1 (DR1) em baixos níveis de concentração em água tratada e para tal, duas estratégias metodológicas foram estudadas. A primeira delas se fundamentou na construção do imunossensor empregando eletrodos impressos de ouro modificados com monocamadas auto-organizadas. Monocamadas tioladas de cistamina, ácido lipóico e p-aminotiofenol foram estudadas para promoção do acoplamento dos anticorpos sobre a superfície do eletrodo. Caracterizações realizadas por voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) demonstraram a efetiva imobilização dos anticorpos sobre a superfície dos eletrodos impressos, com aumento sucessivo do recobrimento e no valor de resistência de transferência de carga (R_{ct}), respectivamente. No entanto, para todas as rotas estudadas encontraram-se dificuldades em se obter adequada repetibilidade entre as diferentes medidas e estabilidade das etapas de modificação, além de não ser observada relação linear entre os valores de ΔR_{ct} e a concentração de antígeno DR1, o que foi atribuído a grande heterogeneidade da superfície dos diferentes eletrodos impressos. Desse modo, a segunda estratégia investigada empregou eletrodo de carbono vítreo para construção do imunossensor. Após realizar uma eletro-oxidação na superfície do eletrodo, os grupos carboxílicos gerados foram ativados com EDC/NHS e o acoplamento dos anticorpos foi realizado. As caracterizações eletroquímicas realizadas por VC e EIS demonstraram que a imobilização dos anticorpos anti-DR1 foi bem sucedida, e imagens de AFM e espectros de infravermelho corroboraram os resultados dos estudos eletroquímicos para imobilização do anticorpo. Após isso, os parâmetros da EIS (tempo de estabilização do potencial de circuito aberto, amplitude, intervalo de frequência, número de pontos por década) foram otimizados e as condições experimentais envolvidas na construção do imunossensor (concentração do anticorpo e tempos de incubação em solução de anticorpo e de antígeno) foram estabelecidos através de estudos quimiométricos empregando planejamento fatorial completo. O desempenho do imunossensor foi avaliado frente à soluções de DR1 e foi obtida uma relação linear entre a ΔR_{ct} e a concentração de DR1 no intervalo de 1 a 100 nM, com valores de coeficiente de correlação de 0,9991, LD = 2,52 nM e LQ = 8,40 nM. Por fim, o desempenho do imunossensor frente à uma amostra de água de torneira fortificada com DR1 na concentração de 20,0 nM foi realizado, onde uma satisfatória recuperação de 98,7% foi encontrada, indicando que o imunossensor desenvolvido é capaz de realizar este tipo de análise.

Palavras-chave: Imunossensor. Impedância. Corante têxtil. Disperso Red 1.

ABSTRACT

Azo dyes are among the most used by Brazilian textile industry, representing 20-40% of dyes used for dyeing cotton, rayon, nylon, silk, wool and leather. A worrying factor related to these substances is that studies using micro-organisms and mammalian cells have shown that many azo dyes have genotoxic activity, even at low concentrations. Besides, currently there are not official methods for effective removal of dyes present in the effluents generated in the dyeing process, and this leads these substances can reach the water for consumption, and thus the development of sensor devices for monitoring the dyes in water becomes of great importance. Therefore, this project is focused on development of an impedimetric immunosensor for detection and quantification of the azo dye Disperse Red 1 (DR1) at low concentration levels in treated water and for this, two methodological strategies were studied. The first one was based on the construction of the immunosensor employing gold printed electrodes modified with self-assembled monolayers. Thiolated monolayers of cystamine, lipoic acid and p-aminothiophenol were studied to promote the coupling of the antibodies on the electrode surface. Characterizations performed by cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) demonstrated the effective immobilization of antibodies on the surface of the printed electrodes, with successive increase in the surface coverage and in the charge transference resistance (R_{ct}), respectively. However for all ways investigated, difficulties in obtaining adequate repeatability between measures of stability and modification steps were observed, as well a non-linear relationship between the values of ΔR_{ct} and the concentration of antigen DR1, which was due by the heterogeneity of the surface of different printed electrodes. Thus, the second strategy employed glassy carbon electrode for immunosensor construction. After performing an electro-oxidation at the electrode surface, the carboxylic groups generated, were activated with EDC / NHS and the coupling of antibodies was performed. The electrochemical characterizations performed by CV and EIS showed that the immobilization of anti-DR1 antibodies was successful, and AFM images and infrared spectra corroborate the results of electrochemical studies for antibody immobilization. After that, the parameters of the EIS (stabilization time of the open circuit potential, amplitude, frequency range, number of points per decade) were optimized and the experimental conditions involved in the construction of the immunosensor (antibody concentration and incubation times in solution of the antibody and antigen) were established by chemometric studies employing factorial design. The performance of the immunosensor was evaluated front solutions DR1 and a linear relationship between ΔR_{ct} values and DR1 concentrations was obtained in the range from 1 to 100 nM, with values of correlation coefficient of 0.9991, LD = 2.52 nM and LQ = 8.40 nM. Finally, the performance of the immunosensor front of a sample of tap water spiked with DR1 at a concentration of 20.0 nM was conducted, where a satisfactory recovery of 98.7% was found, indicating that the developed immunosensor is able to perform this type of analysis.

Keywords: Immunosensor. Impedance. Textile dyes. Disperse Red 1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura do corante Disperso Red 1.	26
Figura 2.	Técnicas para remoção de corantes em efluentes.	29
Figura 3.	Representação de um imunossensor do tipo direto.	31
Figura 4.	Representação de um ensaio do tipo competitivo.	32
Figura 5.	Representação de um ensaio do tipo sanduíche.	33
Figura 6.	Representação da superfície de um eletrodo de ouro modificado com diferentes monocamadas.	34
Figura 7.	Representação da superfície de um eletrodo de carbono vítreo modificado com diferentes monocamadas.	35
Figura 8.	Mecanismo de ativação de grupos carboxílicos via EDC/NHS para acoplamento em anticorpos.	36
Figura 9.	Número de publicações encontradas a partir do termo “impedimetric immunosensor” distribuídas por ano de publicação, que abrangem o período de 1993 a 2013.	38
Figura 10.	Quantidade e porcentagem de trabalhos encontrados no levantamento bibliográfico sobre imunossensores impedimétricos divididos por área de aplicação.	38
Figura 11.	Exemplo de onda senoidal oscilando em diferentes frequências, sendo a linha azul a representação da variação em maior frequência e a linha rosa, em menor frequência de oscilação.	40
Figura 12.	Representação de um diagrama de Nyquist típico.	41
Figura 13.	Representação de curvas de Bode-fase e Bode-módulo típicas.	42
Figura 14.	Sinal de excitação em voltametria cíclica.	44
Figura 15.	Voltamograma cíclico para uma solução de eletrólito contendo par redox.	45
Figura 16.	Esquema de modificação do eletrodo de carbono vítreo para construção do imunossensor.	54

Figura 17.	Voltamogramas obtidos no processo de limpeza do eletrodo impresso em ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, 10 ciclos realizados em um mesmo eletrodo. B . 10º ciclos de limpeza de quatro diferentes eletrodos impressos reunidos.	61
Figura 18.	Voltamogramas cíclicos obtidos em meio de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,5, sendo A e B antes e C e D após o processo de limpeza em ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ em dois diferentes eletrodos impressos de ouro.	62
Figura 19.	A Aparência dos eletrodos impressos de ouro após serem submetidos à voltametria cíclica por 10 ciclos em ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e B por 5 ciclos em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.	63
Figura 20.	Voltamograma cíclico do eletrodo impresso obtido após enxague com etanol (os 3 ciclos estão apresentados).	63
Figura 21.	Estrutura geral dos anticorpos.	64
Figura 22.	Esquema das etapas empregadas para imobilização dos anticorpos monoclonais anti-Red 1 pela Rota 1.	65
Figura 23.	Etapas de modificação empregadas para imobilização dos anticorpos monoclonais anti-DR1 via proteína A sobre eletrodos impressos de ouro caracterizadas A por VC e B por EIS. Inset: Região de altas frequências.	65
Figura 24.	Diagramas de Nyquist obtidos para dois eletrodos impressos modificados pela rota da proteína A e bloqueados com BSA 0,05%.	68
Figura 25.	Diagramas de Nyquist obtidos para quatro eletrodos impressos modificados até a etapa da proteína A. Inset: Região de altas frequências.	69
Figura 26.	Representação da superfície do eletrodo impresso de ouro modificada com a SAM de ácido lipóico.	70
Figura 27.	Etapas de modificação empregadas para imobilização dos anticorpos monoclonais anti-Red 1 via SAM de ácido lipóico caracterizadas A por VC e B por EIS. Inset: Região de altas frequências.	70
Figura 28.	Etapas de modificação empregadas para imobilização dos anticorpos monoclonais anti-Red 1 via SAM de ácido lipóico e bloqueio da superfície dos eletrodos impressos de ouro modificados caracterizadas A por VC e B por EIS.	72

Figura 29.	Medidas obtidas com eletrodos impressos de ouro modificados pela rota do ácido lipóico e bloqueados com BSA após a adição de corante DR1 nas concentrações A 1×10^{-5} e B 1×10^{-6} mol L ⁻¹ (n=4).	73
Figura 30.	Medidas obtidas com eletrodos impressos de ouro modificados pela rota do ácido lipóico e bloqueados com BSA após a adição do solvente do corante (água e Fongranal na proporção referente a uma solução 1×10^{-5} mol L ⁻¹).	73
Figura 31.	Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo impresso de ouro limpo na ausência de corante DR1 e após adições sucessivas do corante.	74
Figura 32.	Representação da superfície do eletrodo impresso de ouro modificada com a SAM de <i>p</i> -aminotiofenol.	75
Figura 33.	Etapas de modificação empregadas para imobilização dos anticorpos monoclonais anti-DR1 via SAM de <i>p</i> -aminotiofenol caracterizadas A por VC e B por EIS. Inset: Região de altas frequências.	76
Figura 34.	Estudo da adsorção do corante Red 1 sobre a superfície de eletrodos impressos de ouro.	77
Figura 35.	Voltamogramas cíclicos no intervalo de potencial de +0,45 a -0,20 V, $v = 25$ mV e B Diagramas de Nyquist com intervalo de frequência de 50 KHz a 10 mHz e amplitude de 10 mV (rms) de eletrodos impressos sem modificação limpos em etanol (n = 5). Inset: Região de altas frequências.	78
Figura 36.	Etapas de modificação empregadas para imobilização dos anticorpos monoclonais anti-DR1 via eletro-oxidação da superfície com ativação dos grupos carboxílicos e bloqueio da superfície do eletrodo de carbono vítreo caracterizadas A por VC e B por EIS. Inset: Região de altas frequências.	80
Figura 37.	Circuito equivalente utilizado na ferramenta de análise “electrochemical circle fit”.	81
Figura 38.	Valores de R_{ct} obtidos em cada medida e B . Diagramas de Nyquist referentes à medida realizada ao término do processo de imobilização e após 4 medidas.	83
Figura 39.	Diagramas de Nyquist correspondentes ao eletrodo bloqueado antes e após incubação em solução de DR1 1×10^{-6} mol L ⁻¹ .	84
Figura 40.	Imagens de AFM 2D e sua correspondente tridimensional para A carbono vítreo limpo e B carbono vítreo contendo anticorpo anti-DR1 imobilizado.	85

Figura 41.	Espectro de infravermelho referente ao carbono vítreo limpo e ao carbono vítreo que passou pelo processo de imobilização do anticorpo. B. Destaque da região do espectro referente à banda correspondente ao grupo amida.	87
Figura 42.	Variação do potencial de circuito aberto do eletrodo modificado ao longo de 1 hora. Medida realizada em solução de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em solução tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,5.	88
Figura 43.	Gráfico de Pareto: Influência das condições experimentais na resposta obtida com o imunossensor, sendo A, a concentração da solução de anticorpo; B, o tempo de incubação do anticorpo e C, o tempo de incubação do antígeno.	89
Figura 44.	Gráfico de Pareto: Influência das condições experimentais na resposta obtida com o imunossensor, sendo A, a concentração da solução de anticorpo; B, o tempo de incubação do anticorpo e C, o tempo de incubação do antígeno.	92
Figura 45.	Gráfico de Interação: Influência da interação das variáveis de estudo na resposta obtida com o imunossensor.	93
Figura 46.	Gráfico dos Efeitos Principais resultante do planejamento fatorial completo 2^3 para otimização das condições experimentais envolvidas no desenvolvimento do imunossensor.	93
Figura 47.	Gráfico de Cubo: Relação entre a média das respostas obtidas e as variáveis estudadas em cada combinação.	94
Figura 48.	Estruturas das moléculas dos corantes A. DR1, B. DO1, C. DR78/50 e D. DR73.	95
Figura 49.	ΔR_{ct} obtido após a incubação do imunossensor em soluções dos corantes DO1, DR73, DR78/50 e DR1 na concentração de $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.	96
Figura 50.	Gráfico de ΔR_{ct} em função da concentração de DR1 expressa em nanomolar. As barras de erro mostram o desvio padrão obtido a partir da triplicata dos dados dos experimentos.	97
Figura 51.	Diagramas de Nyquist obtidos em diferentes concentrações de DR1.	97
Figura 52.	A. Diagramas de Nyquist obtidos após a etapa de bloqueio, incubação em amostra fortificada com 20 nM de DR1 e após adições sucessivas de solução padrão DR1 nas concentrações 20, 40 e 60 nM. B. ΔR_{ct} versus concentração de solução padrão de DR1 (n=3).	99
Figura 53.	Curva analítica para o corante DR1 obtida através de medidas de HPLC-MS/MS.	100

Figura 54. Gráfico de Hanes-Woolf para determinação da constante de 101
dissociação, K_d .

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Sequência das modificações realizadas na superfície do eletrodo de trabalho nas três rotas estudadas.	52
Tabela 2.	Parâmetros experimentais a serem otimizados e os respectivos valores utilizados no estudo quimiométrico.	57
Tabela 3.	Parâmetros obtidos na caracterização do eletrodo por EIS em cada etapa de modificação na rota.	67
Tabela 4.	Parâmetros obtidos na caracterização do eletrodo por espectroscopia de impedância eletroquímica em cada etapa de modificação na rota.	71
Tabela 5.	Parâmetros obtidos na caracterização do eletrodo de carbono vítreo por EIS nas diferentes etapas de modificação.	81
Tabela 6.	Matriz de planejamento fatorial completo com 3 variáveis e dois níveis (2^3). Estudo realizado em triplicata (n =3).	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIQUIM – Associação Brasileira da Indústria Química

DR1 – Corante disperso Red 1

DR73 – Corante disperso Red 73

DR78 – Corante disperso Red 78

DO1 – Corante disperso Orange 1

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

POA's – Processos Oxidativos Avançados

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês – “*high performance liquid chromatography*”)

MS – Espectrometria de Massas (do inglês – “*mass spectrometry*”)

DAD – Detector com Arranjo de Diodos (do inglês – “*diode array detector*”)

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

MWNT – Nanotubos de Múltiplas Paredes (do inglês – “*multi-walled nanotubes*”)

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

SAM – Monocamadas Auto-Organizadas (do inglês – “*Self-assembled monolayer*”)

EIS – Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (do inglês – “*electrochemical impedance spectroscopy*”)

DC – Corrente Contínua (do inglês – “*direct current*”)

AC – Corrente Alternada (do inglês – “*alternating current*”)

VC – Voltametria Cíclica

AFM – Microscopia de Força Atômica (do inglês – “*atomic force spectroscopy*”)

FT-IR-ATR – Infravermelho com Transformada de Fourier por Reflectância Total Atenuada (do inglês – “*Fourier Transform infrared spectroscopy – Attenuated Total Reflectance*”)

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

Ab – Anticorpo (do inglês – “*antibody*”)

Ag – Antígeno (do inglês – “*antigen*”)

CPE – Elemento de Fase Constante (do inglês – “*constant phase element*”)

LISTA DE SÍMBOLOS

R_s – Resistência Ôhmica da Solução

R_{ct} – Resistência de Transferência de Carga

C_d – Capacitância da Dupla Camada Elétrica

ω – Frequência de oscilação de uma onda senoidal

f – Frequência onde ocorre o máximo do semi-círculo em um Diagrama de Nyquist

ϕ – Ângulo de Fase

i_{pa} – Corrente de pico anódico

i_{pc} – Corrente de pico catódico

I_p – Corrente de pico

n – Número de elétrons envolvidos em uma reação de óxido-redução

A – Área do eletrodo

D_o – Coeficiente de Difusão

C_o^* - Concentração da espécie reagente na superfície do eletrodo

v – Velocidade de Varredura

E_{OC} – Potencial de Circuito Aberto

ΔR_{ct} – Variação da Resistência de Transferência de Carga

ΔC_d – Variação da Capacitância

K_d – Constante de Dissociação

θ – Recobrimento da superfície do eletrodo

R_p – Resistência de Polarização

r_a – Fator de Rugosidade

χ^2 – Chi quadrado

Hz - Hertz

kHz - Quilohertz

mHz - Milihertz

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1 Corantes Têxteis	25
1.2 Classificação e Propriedades dos Corantes Têxteis.....	26
1.3 Efluentes e legislação	28
1.4 Metodologias para detecção de corantes	30
1.5 Imunossensores.....	31
1.6 Técnicas empregadas para caracterização e desenvolvimento de metodologia analítica de imunossensores.....	37
2. OBJETIVOS.....	47
3. METODOLOGIA.....	47
3.1 Reagentes e Materiais.....	47
3.2 Soluções.....	48
3.3 Equipamentos	50
3.4 Procedimento Experimental	51
3.4.1 <i>Estudo da limpeza da superfície do eletrodo impresso.....</i>	<i>51</i>
3.4.2 <i>Estudo da imobilização dos anticorpos monoclonais anti-Red 1 sobre a superfície dos eletrodos impressos.....</i>	<i>51</i>
3.4.3 <i>Estudo da repetibilidade da resposta do eletrodo impresso limpo em etanol com as técnicas VC e EIS.....</i>	<i>52</i>
3.4.4 <i>Estudo da imobilização dos anticorpos monoclonais anti-DR1 sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo e posterior bloqueio dos grupos carboxílicos ativados.....</i>	<i>53</i>
3.4.5 <i>Estudo da estabilidade do eletrodo contendo anticorpo imobilizado após medidas de EIS sucessivas.....</i>	<i>54</i>
3.4.6 <i>Estudo da adsorção do corante DR1 sobre o eletrodo bloqueado (na ausência de anticorpo anti-DR1).....</i>	<i>55</i>
3.4.7 <i>Imagens de microscopia de força atômica (AFM) da superfície do eletrodo de carbono vítreo limpo e após a imobilização do anticorpo.....</i>	<i>55</i>
3.4.8 <i>Caracterização da imobilização do anticorpo sobre o eletrodo de carbono vítreo através de infra-vermelho (FT-IR-ATR).....</i>	<i>56</i>
3.4.9 <i>Otimização dos parâmetros experimentais para realização das medidas de EIS.....</i>	<i>56</i>

3.4.10 Otimização das etapas de construção do imunossensor via planejamento fatorial completo	56
3.4.11 Seletividade da resposta do imunossensor frente à outros corantes dispersos.....	57
3.4.12 Curvas analíticas do corante DR1	58
3.4.13 Aplicação do imunossensor em amostra de água	58
3.4.14 Determinação da constante de dissociação anticorpo-antígeno	58
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1 Parte 1: Desenvolvimento de imunossensor impedimétrico para detecção do corante DR1 empregando eletrodos impressos de ouro.....	60
4.4.1 Estudo da limpeza da superfície do eletrodo impresso	60
4.4.2 Estudo da imobilização dos anticorpos monoclonais anti-DR1 sobre a superfície dos eletrodos impressos	64
4.4.2.1 Rota 1 – Imobilização dos anticorpos via proteína A de <i>S. aureus</i>	64
4.4.2.2 Rota 2 – Imobilização dos anticorpos via SAM de ácido lipóico e agrupamentos carboxílicos ativados	69
4.4.2.3 Rota 3 – Imobilização dos anticorpos via SAM de <i>p</i> -aminotiofenol	75
4.4.3 Estudo da repetibilidade da resposta do eletrodo impresso limpo em etanol com as técnicas VC e EIS	78
4.2 Parte 2: Desenvolvimento de imunossensor impedimétrico para detecção do corante DR1 empregando eletrodo de carbono vítreo	79
4.2.1 Estudo da imobilização dos anticorpos monoclonais anti-DR1 sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo e posterior bloqueio dos grupos carboxílicos ativados.....	79
4.2.2 Estudo da estabilidade do eletrodo contendo anticorpo imobilizado após medidas de EIS sucessivas.....	82
4.2.3 Estudo da adsorção do corante DR1 sobre o eletrodo bloqueado (na ausência de anticorpo anti-DR1)	83
4.2.4 Imagens de microscopia de força atômica (AFM) da superfície do eletrodo de carbono vítreo limpo e após a imobilização do anticorpo	85
4.2.5 Caracterização da imobilização do anticorpo sobre o eletrodo de carbono vítreo através de infravermelho (FT-IR-ATR).....	86
4.2.6 Otimização dos parâmetros experimentais para realização das medidas de EIS	87
4.2.7 Otimização das etapas de construção do imunossensor via planejamento fatorial completo	90

<i>4.2.8 Seletividade da resposta do imunossensor frente à outros corantes dispersos.....</i>	<i>94</i>
<i>4.2.9 Curvas analíticas do corante DRI</i>	<i>96</i>
<i>4.2.10 Aplicação do imunossensor em amostra de água – Estudo de recuperação</i>	<i>98</i>
<i>4.2.11 Determinação da constante de dissociação anticorpo-antígeno</i>	<i>100</i>
5. CONCLUSÃO	101
REFERÊNCIAS	104

1. INTRODUÇÃO

1.1 Corantes Têxteis

A tintura de tecidos é uma arte que começou há milhares de anos¹. Os primeiros registros que comprovam sua utilização são originários do antigo Egito e demonstram que o tingimento de tecidos era uma prática comum, fundamentada no uso de corantes naturais derivados de plantas ou da terra². Foi somente em 1856 que o primeiro corante orgânico sintético foi descoberto. W. H. Perkin obteve o corante malveína enquanto tentava sintetizar um medicamento antimalárico. A descoberta deste corante sintético, cuja coloração púrpura se ligava mais efetivamente à seda que os demais corantes naturais, levou ao surgimento da primeira fábrica de produção de corantes sintéticos e deu início a uma corrida pela descoberta de outros corantes pelos químicos da época².

Nos dias de hoje, a maior parte dos corantes têxteis são sintéticos e a enorme popularidade destes em detrimento aos corantes naturais pode ser justificada não só pela sua maior fixação à fibra do tecido, mas também pelo seu menor custo e infinita possibilidade de síntese com grupos cromóforos diferenciados, ampliando a diversidade de cores e tonalidades, permitindo maior grau de pureza e alto controle de fidelidade da cor³⁻⁴.

Embora a quantidade exata de corantes produzida no mundo seja desconhecida, estima-se que milhões de toneladas (dados de 2007) sejam utilizadas, refletindo um mercado próspero que envolve ao redor de 7,7 bilhões de dólares/ano. Segundo a ABIQUIM (Associação Brasileira da Indústria Química), o Brasil produz grande quantidade de corantes, porém não é auto-suficiente para atender principalmente a demanda da indústria têxtil, o que tem levado a um vertiginoso crescimento das importações nos últimos anos⁵.

Para atender o mercado interno, o Brasil importou apenas em 2011 mais de 900 milhões de dólares em corantes principalmente da Índia e China, que são responsáveis por cerca de 80% da produção disponível no mercado mundial de corantes. Esses corantes são imprescindíveis na indústria têxtil brasileira que atualmente ocupa a sexta posição no parque da indústria têxtil mundial⁵. São importantes para a economia do país (30-35 bilhões de dólares ao ano) e responsáveis por milhões de empregos diretos e indiretos⁶.

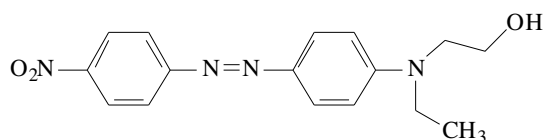
1.2 Classificação e Propriedades dos Corantes Têxteis

Os corantes têxteis podem ser classificados de acordo com o grupo crômoforo presente em sua estrutura química (azo, antraquinona, metina, polimetina, nitro, nitroso, xanteno e outros) ou pelo método pelo qual são fixados à fibra têxtil¹ (básicos, diretos, dispersos, reativos, mordentes, solventes, ácidos, de enxofre, azóicos, à tina, à cuba), apresentando propriedades tais como solubilidade, volatilidade, estabilidade e reatividade bastante diversificadas de uma classe para outra. No Brasil, a classe dos corantes dispersos responde por cerca de 35% de todos os corantes utilizados e estes por sua vez, apresentam em sua maioria agrupamentos azo (grupo cromóforo) em sua estrutura química⁷.

Os corantes dispersos são insolúveis em água, sendo aplicados em fibras de celulose e outras fibras hidrofóbicas através de suspensão. Usualmente, o processo de tintura ocorre na presença de agentes dispersantes com longas cadeias que normalmente estabilizam a suspensão do corante facilitando o contato entre o corante e a fibra hidrofóbica^{8,9}. Esta classe de corantes tem sido utilizada principalmente para tinturas de fibras sintéticas, tais como: acetato celulose, nylon, poliéster e poliacrilonitrila⁶.

Os corantes azo (apresentam em sua estrutura um ou mais grupos $-N=N-$)¹⁰ são amplamente empregados por permitirem um método de tingimento de fibras celulósicas (especificamente alongadas) com alto padrão de fixação e alta resistência contra luz e umidade em relação às outras classes¹. Justamente devido a essas características, o tratamento de efluentes contendo corantes têxteis, tais como os corantes azo, é difícil e ineficaz com processos biológicos convencionais, porque muitos corantes sintéticos são estáveis à luz, temperatura, não são biodegradáveis e podem por clivagem reductiva, liberar aminas aromáticas mais tóxicas do que as moléculas de corante¹¹. Dentre os corantes dispersos contendo agrupamentos azo, encontra-se o Disperso Red 1 (DR1), conforme mostra a Figura 1.

Figura 1 - Estrutura do corante Disperso Red 1.



Vários estudos têm demonstrado que os efeitos deletérios da presença dos corantes azo nos corpos d'água vão muito além das mudanças na intensidade e na tonalidade da coloração

das águas. A alteração da penetração da luz devido à interação destas com os corantes pode interferir nos ciclos biológicos da biota aquática, especialmente no processo de fotossíntese e na oxigenação do corpo d'água¹².

Em relação à exposição humana aos corantes azo, esta ocorre principalmente através da ingestão de água contaminada, absorção dérmica pela utilização de vestuário ou calçado tingidos com estas substâncias, e inalação no ambiente de trabalho¹³.

Um fator bastante preocupante é que diversos estudos utilizando microorganismos e células de mamíferos têm demonstrado que vários corantes azo apresentam atividade genotóxica¹⁴. Essa atividade está intimamente relacionada com a natureza e posição dos substituintes ligados ao grupo azo¹⁵. Portanto, como pequenas variações nas moléculas dos corantes alteram as suas propriedades, é importante que cada corante azo seja estudado individualmente⁸.

Os corantes azo se tornam mutagênicos após a quebra das azo ligações por enzimas azorredutoras sintetizadas nas células gastrointestinais, a qual resulta em aminas aromáticas incolores¹⁶⁻¹⁷. O ensaio de *Salmonella*/microsomo demonstra que o DR1 foi mutagênico em todos os testes de cepas, na ausência ou presença de S9 (ativação metabólica), além de causar o aumento da frequência de micronúcleos em linfócitos humanos e em células HepG2¹⁸⁻¹⁹.

Além da questão genotóxica, a ocorrência de problemas dermatológicos em consumidores expostos aos corantes através do vestuário não é nova. Hatch e Maibach²⁰ relataram em um artigo de revisão do ano de 1985, que diversos corantes têxteis, especialmente da classe dos corantes dispersos contendo estruturas azo e antraquinona ocasionavam dermatite alérgica de contato. Mais recentemente em 2010, Ahuja e colaboradores²¹ verificaram e classificaram o potencial sensibilizante de corantes dispersos em camundongos que tiveram a pele exposta aos corantes em diferentes concentrações, incluindo o Disperso Red 1. Na maioria dos casos, houve crescimento das células CD19+, CD45+ e CD45+/1A+, o que é um efeito característico de alergênicos.

Fica evidente, portanto, que sob diversos aspectos os corantes têxteis geram preocupações. Até que novas substâncias tão eficientes e viáveis no tingimento de tecidos, e que não apresentem toxicidade e sejam biodegradáveis sejam descobertas ou, até que novos métodos no tratamento de efluentes que promovam a eliminação ou degradação dos corantes sejam implementados com êxito, é muito importante que as pesquisas continuem avançando no estudo do monitoramento, degradação e toxicidade destas substâncias. E é justamente sobre esta problemática que o projeto temático intitulado “Avaliação da ocorrência,

toxicidade/genotoxicidade e processos para degradação de corantes em efluentes e águas superficiais” (Processo FAPESP nº 2008/ 10449-7) no qual está inserido este trabalho, versa.

1.3 Efluentes e legislação

Cerca de 20-50% da quantidade total de corantes têxteis utilizados, acaba por ser lançada nas águas naturais devido à perdas no processo de fixação do corante às fibras do tecido²².

No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA)²³ é o órgão responsável por prever diretrizes para o estabelecimento dos padrões de qualidade das águas, bem como por prever as condições para o lançamento de efluentes nos corpos d’água.

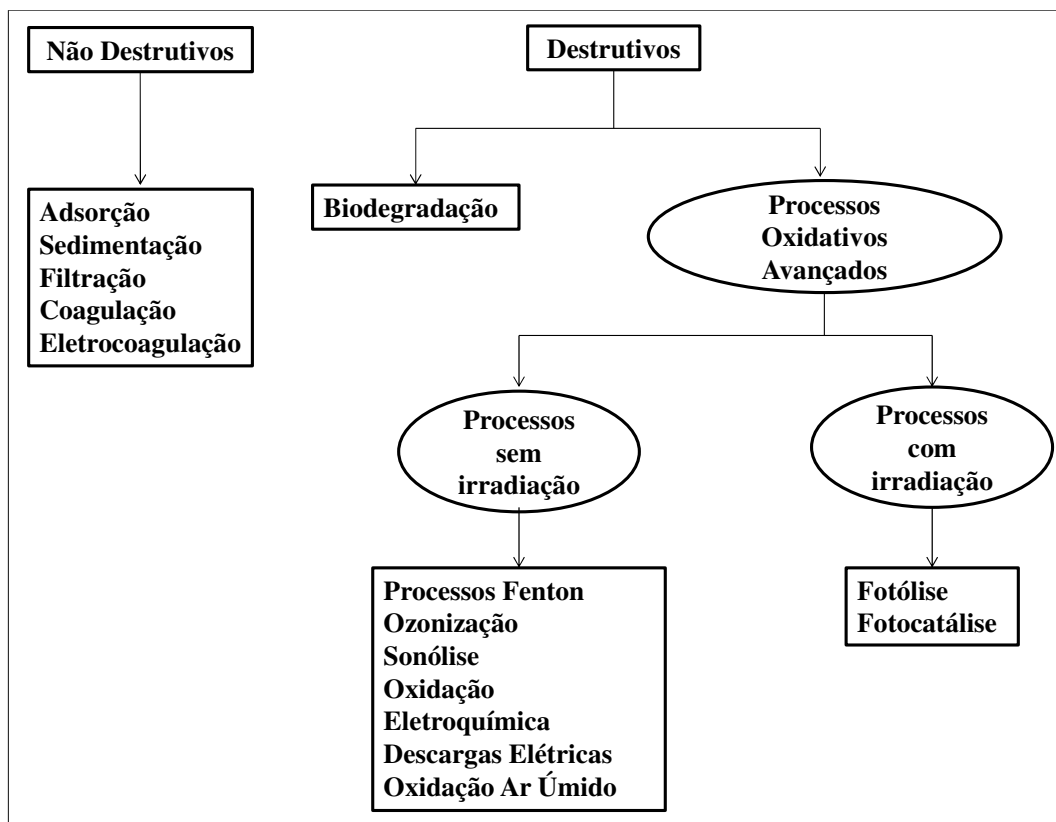
A qualidade da água é avaliada através da observância a diversos parâmetros tais como, pH, turbidez, oxigênio dissolvido, DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), cor e conformidade dos limites máximos de substâncias inorgânicas e orgânicas estabelecidos. Entretanto, não existem ainda limites estabelecidos por lei para o controle da presença de corantes na água.

Uma das poucas ressalvas relacionadas aos corantes está prevista na Resolução CONAMA Nº 357 de 17 de março de 2005, na qual consta que corantes provenientes de fontes antrópicas devem estar virtualmente ausentes em águas doces e salinas, sendo que para águas doces das classes 2 e 3 (com finalidades mais relacionadas ao consumo humano, irrigação, aquicultura, pesca e atividades de recreação) não é permitido a presença de corantes antrópicos que não possam ser removidos por processos de coagulação, sedimentação e filtração convencionais²³.

Já é conhecido que os tratamentos convencionais não são completamente efetivos em relação aos corantes. Estudos demonstram inclusive, que algumas medidas geralmente praticadas podem agravar a questão da toxicidade dos corantes. Oliveira et al. observaram que a cloração, um tratamento complementar usado para remover ou reduzir o cor de efluentes industriais contendo DR1, provocou o aumento da mutagenicidade na cepa TA98²⁴.

A busca por tratamentos realmente eficientes na remoção de corantes é bastante grande. São diversos os trabalhos relatados que versam sobre o tratamento de efluentes contendo corantes. A Figura 2 apresenta as técnicas mais utilizadas segundo levantamento de 2010 de Fernandèz e colaboradores²⁵.

Figura 2 - Técnicas para remoção de corantes em efluentes. Figura adaptada da referência 25.



Dentre todas as técnicas apresentadas, os Processos Oxidativos Avançados (POA's) tem chamado a atenção de muitos pesquisadores e hoje, representam 65% do total de trabalhos publicados com esse tema. Nela, fortes oxidantes à base de oxigênio são formados a partir da água e do O_2 presente no meio reacional com auxílio de uma fonte oxidante. Estes radicais então, são capazes de degradar completamente as moléculas de corante a CO_2 , H_2O e outras moléculas de baixo peso molecular (pequenos aldeídos, ácidos carboxílicos ou pequenos compostos inorgânicos). Os POA's estão entre os processos mais rápidos, eficazes e mais limpos na remoção de corantes, sem geração de poluição secundária significativa. A desvantagem desta técnica é que demanda uma energia intensa, e por isso, é dispendiosa, no entanto, esforços têm sido feitos no sentido de implementar o processo e torná-lo mais viável.

Porém, embora possa parecer haver muitas opções para a remoção dos corantes de efluentes, nenhuma destas técnicas consegue ainda combinar uma completa eficiência na remoção ou degradação do corante com bom custo benefício, tempo adequado, sem que haja geração de resíduos secundários provenientes do tratamento ou outra limitação significativa.

Isso faz com que ainda não se possa apontar qualquer uma delas como solução definitiva para esta questão, apesar de muitos avanços estarem sendo alcançados.

Assim, tendo em vista a grande utilização e importância econômica que os corantes azo apresentam e levando-se em conta os problemas associados à geração de efluentes contendo essas substâncias, torna-se imprescindível o desenvolvimento de métodos analíticos para o monitoramento destes corantes em efluentes, águas superficiais e água tratada, como um controle de qualidade.

1.4 Metodologias para detecção de corantes

Vários métodos para a detecção de corantes azo têm sido investigados. Dentre eles destacam-se a cromatografia líquida de alta eficiência (“High performance liquid chromatography” - HPLC)²⁶ acoplada a diversos detectores como espectrometria de massas (MS)²⁷, ultravioleta-visível (UV/Vis)²⁸ e com detector de arranjo de diodos (“Diode array detector” – DAD)²⁹, eletroforese capilar³⁰ e ensaio imunoenzimático (ELISA – “enzyme-linked immunosorbent assay”)³¹⁻³². No entanto, a maior parte destes processos demanda muito tempo de análise e/ou disponibilidade de recursos financeiros.

Por conta disso, sensores eletroquímicos demonstram ser uma alternativa viável de análise devido à rápida detecção, sensibilidade, alta especificidade e por apresentar muitas vezes simplicidade no desenvolvimento com custo reduzido. Nos últimos anos o desenvolvimento de sensores eletroquímicos tem se mostrado vantajoso na determinação e quantificação de corantes. Ye et al.³³ desenvolveram um sensor eletroquímico para determinação simultânea dos corantes sintéticos yellow sunset e tartrazina a partir da modificação de um eletrodo de disco rotatório de carbono vítreo com grafeno funcionalizado com β -ciclodextrina e cloreto de dimetilamônio. Através da voltametria de pulso diferencial, as correntes de pico anódico dos dois compostos apresentaram uma excelente performance analítica com limites de detecção de $1,25 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para o yellow sunset e $1,43 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para a tartrazina. Zhang et al.³⁴ desenvolveram um sensor eletroquímico para detecção dos corantes sintéticos Ponceau 4R e Allura Red utilizando nanotubos de carbono de múltiplas paredes (“multi-wall carbon nanotube” - MWNT) e voltametria de pulso diferencial. O sensor apresentou alta sensibilidade para ambos os corantes testados com limites de detecção de 15 e 25 mg L^{-1} , para o corante Poenceau 4R e Allura Red, respectivamente. O dispositivo também foi aplicado com sucesso para a detecção dos corantes em amostras de diferentes refrigerantes. Outro sensor eletroquímico para a detecção do corante amarelo quinolina foi

desenvolvido por Zhao et al.³⁵ empregando MWNT e voltametria de pulso diferencial. As propriedades morfológicas dos nanotubos sobre a superfície do eletrodo de trabalho foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). O limite de detecção apresentado foi de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ quando aplicado em amostras comerciais de refrigerantes. Os resultados obtidos foram consistentes quando comparados aos resultados obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência. Rouhani, S.³⁶ também desenvolveu um sensor eletroquímico para o corante Yellow Sunset utilizando diferentes eletrodos. O sensor se baseou no par iônico Yellow Sunset-Cetilpiridínio como trocador de íons. A matriz otimizada foi aplicada com sucesso na determinação do corante em misturas artificiais e comerciais de refrigerantes.

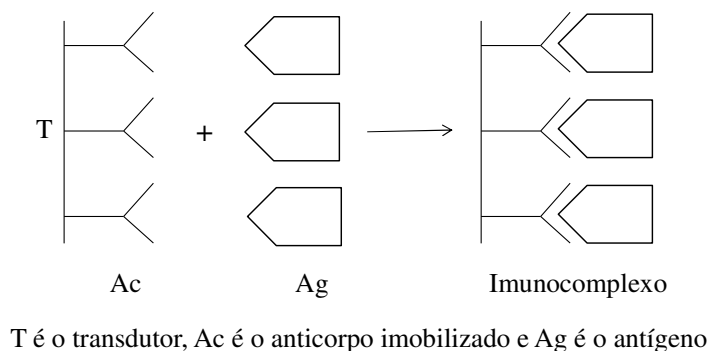
1.5 Imunossensores

Dentre os diferentes tipos de sensores eletroquímicos, os imunossensores representam uma categoria que merece especial atenção, no que se refere a uma detecção sensível e seletiva.

Um imunossensor é definido como um dispositivo sensorial constituído por um anticorpo (ou antígeno) acoplado a superfície de um transdutor, que converte o sinal biológico de imunoafinidade em um sinal mensurável³⁷. Os imunossensores podem ser classificados em dois tipos: diretos e indiretos.

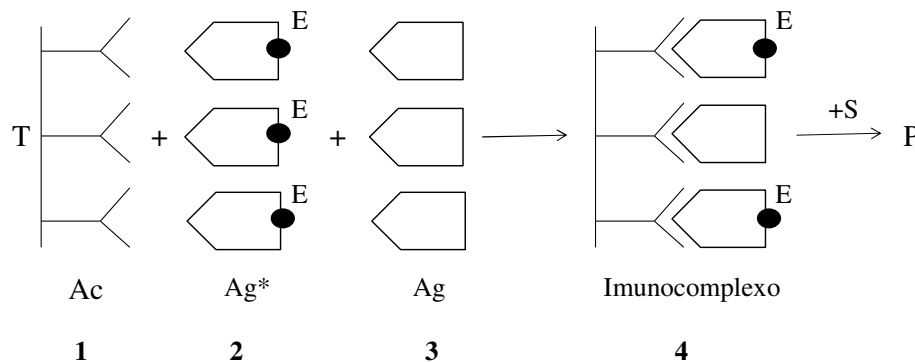
Os imunossensores diretos possibilitam o monitoramento da interação propriamente dita entre um antígeno e um anticorpo, ou seja, são capazes de detectar uma mudança física durante a formação do imunocomplexo (Figura 3). Já os imunossensores indiretos medem o resultado desta interação (por exemplo, uma mudança na quantidade de um marcador eletroquimicamente ativo)³⁸.

Figura 3 - Representação de um imunossensor do tipo direto. Figura adaptada da referência 38.



De modo semelhante aos imunoenaios em fase sólida clássicos, os imunossensores também utilizam ensaios do tipo competitivo ou sanduíche. Em um imunoensaio competitivo um antígeno marcado (geralmente com uma enzima) é adicionado em uma quantidade conhecida juntamente com o antígeno presente em uma amostra, para que se liguem aos anticorpos imobilizados, competindo pelos sítio de ligação. Após esta etapa, o substrato da enzima é adicionado e o produto da reação enzimática é detectado.

Figura 4 - Representação de um ensaio do tipo competitivo. Figura adaptada da referência 38.



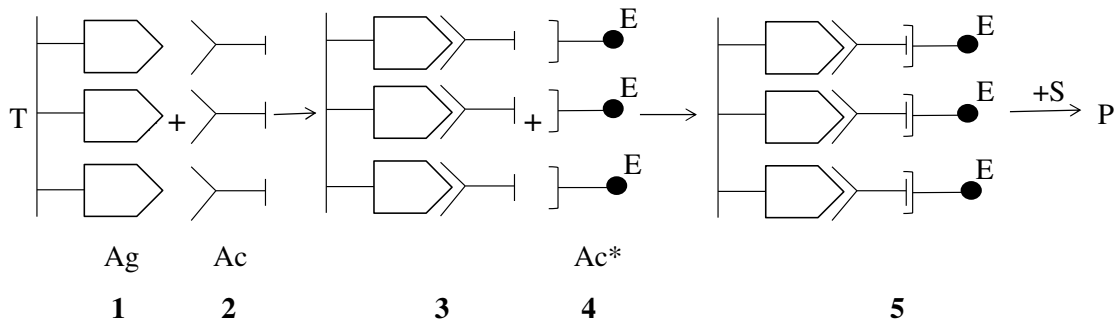
(1) Anticorpos imobilizados, (2) Antígeno marcado, (3) Antígeno da amostra e (4) Imunocomplexo.
E é a enzima marcadora, S é o substrato e P é o produto detectado.

Já os ensaios do tipo sanduíche envolvem as seguintes etapas: primeiramente, o antígeno é imobilizado em uma fase sólida; em seguida, a amostra teste, a qual contém os anticorpos é adicionada e, após uma etapa de lavagem, um excesso de anticorpos secundários marcados é adicionado. Os anticorpos secundários ligam-se aos anticorpos primários e ficam retidos na fase sólida; após uma segunda etapa de lavagem para remoção dos anticorpos secundários não ligados, o substrato é adicionado (quando uma enzima marcadora é utilizada) e a quantidade do produto da reação enzimática é determinado, ou caso o marcador seja eletroativo, ele é então determinado (Figura 5)³⁸.

Fica evidente que, como regra nestes dois tipos de ensaio, a determinação das concentrações dos antígenos ou anticorpos e imunocomplexos, não pode ser feita diretamente e, por conta disto é que diversos agentes marcadores (enzimas, íons metálicos e outros compostos eletroativos) são empregados. No entanto, a possibilidade de realizar detecções livre de marcadores existe, já que a formação do imunocomplexo ocasiona mudanças nas propriedades eletroquímicas, óticas ou de outra natureza na superfície do imunossensor. A medida das alterações de alguma destas propriedades é a base dos imunossensores livre de marcadores³⁹.

Os imunossensores oferecem diversas vantagens, tais como alta sensibilidade, análise em tempo real, relativo baixo custo e possibilidade de quantificação. Devido a grande afinidade da interação antígeno-anticorpo, torna-se possível o desenvolvimento de sensores bastante seletivos com aplicações em diversas áreas como diagnóstico clínico⁴⁰, monitoramento ambiental⁴¹, segurança de alimentos⁴² etc.

Figura 5 - Representação de um ensaio do tipo sanduíche. Figura adaptada da referência 38.



(1) Antígeno imobilizado, (2) Anticorpos específicos, (3, 5) Imunocomplexos e (4) Anticorpos secundários.

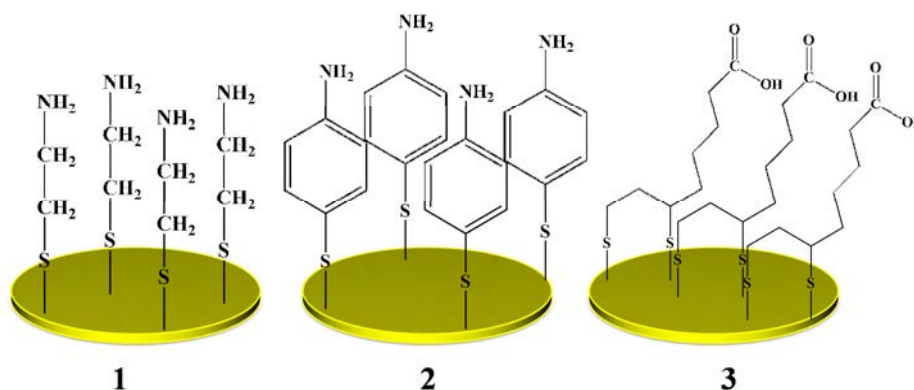
Para que um imunossensor apresente sensibilidade e estabilidade é necessário primeiramente que os antígenos ou anticorpos estejam imobilizados sobre o transdutor e, que mantenham sua atividade biológica após a imobilização⁴³. Para isso, existem alguns procedimentos empregados que unem ambas as condições, como por exemplo, empregando monocamadas auto-organizadas (“self-assembled monolayers” – SAM) sobre a superfície do eletrodo⁴⁴.

As monocamadas auto-organizadas têm sido bastante utilizadas no desenvolvimento de biossensores, nanotecnologia e eletrônicos biomoleculares devido à sua simplicidade, versatilidade, estabilidade e possibilidade de produzir em escala molecular estruturas altamente ordenadas⁴⁵. A SAM é formada por uma camada de moléculas orgânicas altamente organizadas sobre a superfície do eletrodo, que se fixam neste a partir da interação de um grupo funcional de uma das extremidades da molécula selecionada. Assim, o grupo funcional livre da outra extremidade da SAM fica com a função de proporcionar a imobilização de materiais biológicos de interesse (e.g. enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, anticorpos etc.)⁴⁶.

Um dos tipos de monocamadas mais explorados na literatura é o que emprega eletrodos de ouro e moléculas orgânicas tioladas. Por conterem enxofre, estas moléculas ligam-se espontaneamente à superfície do ouro, dada a grande afinidade entre estes elementos. A versatilidade das monocamadas pode ser bastante grande, já que o tamanho da

cadeia da molécula tiolada, bem como o grupo funcional da extremidade oposta podem ser variados conforme o objetivo buscado. A Figura 6 ilustra algumas das monocamadas possíveis formadas sobre eletrodos de ouro. Todas elas foram estudadas neste projeto.

Figura 6 - Representação da superfície de um eletrodo de ouro modificado com diferentes monocamadas.



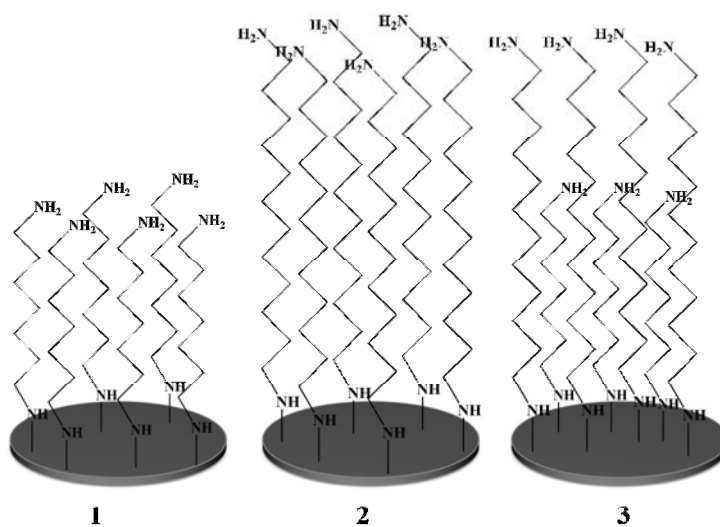
Monocamadas de (1) Cistamina, (2) *p*-aminotiofenol e (3) ácido lipóico

Mas não é só em superfícies de ouro que a construção de monocamadas altamente ordenadas é possível. Materiais de carbono são de grande interesse na campo da ciência dos materiais e em eletroquímica devido suas características, tais como possuir ampla janela de potencial e ser um material inerte⁴⁷. Eles também podem receber modificações que forneçam esse tipo de arranjo.

Um dos métodos descritos na literatura para formação de monocamadas em superfícies de carbono se fundamenta na formação de uma ligação covalente entre compostos contendo grupo amino e o carbono através de uma eletrooxidação. A camada formada serve então como uma superfície versátil no ramo dos biossensores, servindo para imobilizar desde biomoléculas a nanopartículas e outras moléculas⁴⁸. Compostos como diaminoalcanos, com diferentes tamanhos de cadeia são bastante úteis para este tipo de aplicação fornecendo monocamadas bastante estáveis (Figura 7).

A formação deste tipo de monocamada acontece a partir da oxidação de um dos grupos amino do diaminoalcano, que se torna então um cátion radical. Este cátion radical é por sua vez, covalentemente ligado à superfície do eletrodo de carbono vítreo, enquanto o grupo amino da extremidade oposta fica voltado à solução. As condições de modificações são brandas e ao alterar a velocidade de varredura na voltametria cíclica, a densidade do empacotamento do filme modificador formado pode ser controlada⁴⁷.

Figura 7 - Representação da superfície de um eletrodo de carbono vítreo modificado com diferentes monocamadas.



Monocamadas de (1) Diaminoheptano, (2) Diaminododecano e (3) Mista contendo diaminohexano e diaminododecano.

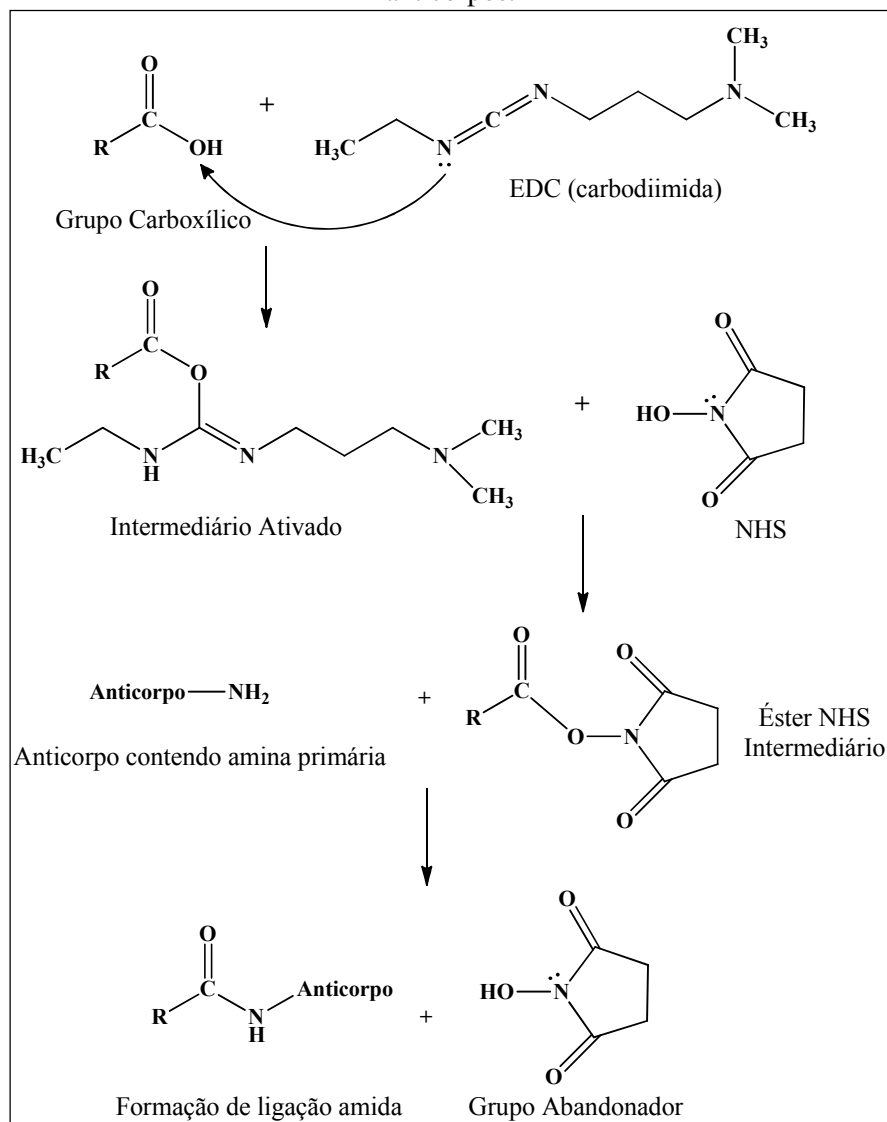
Ao contrário do grupo tiol em superfícies de ouro, o grupo amino em superfícies de carbono vítreo apresenta a vantagem de não ser desorvido em potenciais mais negativos. Além disto, este tipo de modificação não envolve qualquer tipo de pré-tratamento do eletrodo de carbono vítreo⁴⁹.

Além da utilização de monocamadas, existem diversos outros métodos de imobilização de biomoléculas em materiais de carbono, tais como os anticorpos no caso dos imunossensores relatados na literatura. Millan e Mikkelsen⁵⁰ descreveram um método no qual o eletrodo de carbono vítreo é oxidado através de aplicação de um alto potencial em meio fortemente oxidante (solução ácida de dicromato de potássio). Esse procedimento levou à formação de grupos carboxílicos na superfície do próprio eletrodo, que a seguir foram ativados com EDC/NHS (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida e N-hidróxi-succinimida) promovendo a ligação com a molécula de DNA. Por ser bastante simples e efetivo, este método pode ser considerado viável para imobilização de biomoléculas, como anticorpos sobre superfícies de carbono e, por essa razão, também foi estudado neste projeto.

Conforme mencionado, o método acima faz uso do par de reagentes EDC/NHS. Já é bastante explorado e descrito o uso de carbodiimidas solúveis em água e hidróxisuccinimidas como reagentes de acoplamento/união para modificação seletiva de carboxilatos e grupos amino presentes em proteínas. Em outras palavras, quando existe uma terminação carboxílica em determinado sistema e se busca a imobilização de uma proteína ou molécula contendo grupos amino, esses reagentes têm sido extensivamente empregados. A Figura 8 apresenta o

mecanismo de ativação que ocorre em grupos carboxílicos através da utilização de EDC/NHS⁵¹.

Figura 8 - Mecanismo de ativação de grupos carboxílicos via EDC/NHS para acoplamento em anticorpos.



A molécula de EDC reage com o grupo carboxílico terminal disponível formando um éster ativo abandonador. No entanto, este complexo reativo está sujeito a rápida hidrólise em soluções aquosas, apresentando taxas de constantes medidas em segundos. Assim, se o grupo amino presente no anticorpo que se ligará ao agrupamento carboxílico presente no eletrodo não se encontrarem antes que a hidrólise ocorra, o acoplamento desejado não ocorrerá. No entanto, esta limitação pode ser minimizada através da formação de um éster-NHS (intermediário de reação) entre o grupo hidroxila da molécula de NHS e o complexo de éster-

EDC ativado, aumentando o tempo de meia vida do carboxilato ativado para horas. O produto final dessa reação em duas etapas é idêntico ao obtido usando apenas o EDC: o carboxilato ativado reage com uma amina da cadeia lateral do anticorpo formando uma ligação amida estável.

Assim, considerando-se a problemática atual envolvendo os efluentes industriais contendo corantes têxteis e a decorrente necessidade de um monitoramento efetivo destes corantes em água, o desenvolvimento de metodologias para a construção de imunossensores pode representar uma alternativa viável para esta aplicação.

1.6 Técnicas empregadas para caracterização e desenvolvimento de metodologia analítica de imunossensores

Na literatura podemos encontrar diversos trabalhos que tratam do desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos para a detecção de analitos de interesse pertencentes aos mais diversos campos de aplicação. Pode-se verificar também que dentre estes trabalhos, os imunossensores impedimétricos têm encontrado grande destaque e despertado a atenção dos pesquisadores.

Realizando um levantamento bibliográfico através da base de dados Web of Science, tendo como campo de pesquisa o termo “impedimetric immunosensor” verificou-se que o número de publicações com esta temática está em constante crescimento (totalizando 235 resultados), apresentando aumento significativo a partir do ano de 2008, conforme pode ser verificado na Figura 9. Pode-se perceber que este é um ramo de pesquisa bastante recente e que por isso, ainda pode ser bastante explorado.

Analisando os trabalhos encontrados na pesquisa (aqueles que estavam disponíveis para serem acessados na íntegra, totalizando 121 trabalhos), foi possível confirmar a versatilidade de aplicação dos imunossensores impedimétricos, já que permeiam por diferentes áreas de estudo tais como, alimentos, diagnóstico clínico, ambiental e outras (Figura 10).

Figura 9 - Número de publicações encontradas a partir do termo “impedimetric immunosensor” distribuídas por ano de publicação, que abrangem o período de 1993 a 2013.

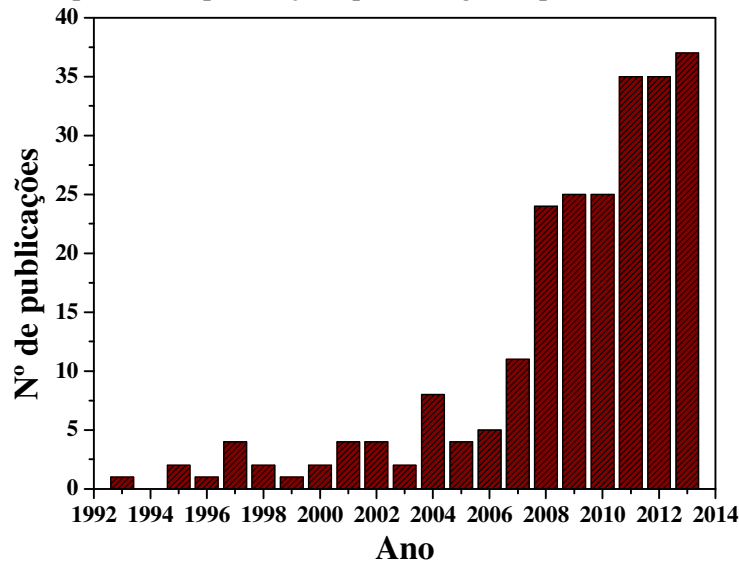
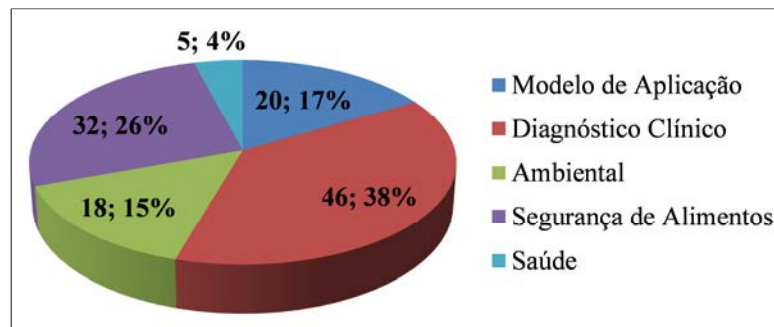


Figura 10 - Quantidade e porcentagem de trabalhos encontrados no levantamento bibliográfico sobre imunossensores impedimétricos divididos por área de aplicação.



Mas por que desenvolver imunossensores impedimétricos? Que vantagens esta técnica possui que a torna atrativa para esta aplicação? No campo dos imunossensores, a espectroscopia de impedância eletroquímica (“electrochemical impedance spectroscopy” – EIS) é uma técnica muito útil que possibilita extrair do sistema de estudo informações que permitem tanto a caracterização do eletrodo, quanto o desenvolvimento de metodologia analítica do sensor, propriamente dito. Além disto, através da EIS é possível desenvolver imunossensores livre de marcadores, já que a formação do imunocomplexo (antígeno-anticorpo) acarreta em uma mudança na resposta do sistema que, quando comparada àquela anterior à reação de imunoafinidade, se torna base para a metodologia analítica, dispensando o uso de medidas indiretas. Este fato implica em maior simplicidade e menor custo ao sensor, uma vez que o ensaio necessitará de um menor número de etapas e dispensará a utilização de anticorpos secundários marcados. Adicionalmente, a EIS é uma técnica não destrutiva,

possibilitando medidas sucessivas sobre um mesmo eletrodo, sem ocasionar nenhum dano além daquele inerente ao próprio sensor em determinado meio no qual a medida está sendo realizada.

Porém, quais são os fundamentos e parâmetros desta técnica que fornecem subsídios para obtenção de tantas informações? Para que se torne possível o entendimento básico sobre esta técnica, é necessário que alguns princípios sejam retomados.

A partir da definição de resistência (R), é possível obter uma relação simples entre o potencial (E) e a corrente (I) em sistemas DC (do inglês, “direct current” – corrente contínua):

$$R = \frac{E}{I} \quad (1)$$

No entanto, quando estamos trabalhando em sistemas AC (do inglês “alternating current” – corrente alternada), a impedância (Z) é a relação que surge entre o potencial e a corrente. Isto demonstra, em outras palavras, que a impedância pode ser entendida de modo geral, como um tipo de resistência.

A impedância é portanto, uma função transferência entre o potencial e a corrente (2), que possuem a onda de sinal senoidal (devido ao sistema AC). Então, a partir da aplicação de uma pequena perturbação de potencial ou de corrente sobre o sistema, a resposta de corrente ou potencial que surge pode estar em fase, completamente fora de fase ou em ângulos intermediários (ϕ – ângulo de fase) em relação à outra função (4).

$$E_t = \Delta E \operatorname{sen}(\omega t) \quad \rightarrow \quad i_t = \frac{\Delta i}{Z(\omega)} \operatorname{sen}(\omega t + \phi) \quad (2)$$

Já que a frequência (ω) com que a perturbação de potencial ou corrente aplicada é variada durante uma medida sob um intervalo pré-determinado, ocorre deste modo, uma varredura de frequências, na qual em cada frequência operante, se obtém a resposta, que é a relação potencial-corrente medida. Assim, a palavra “espectroscopia” é corretamente empregada para denominar esta técnica.

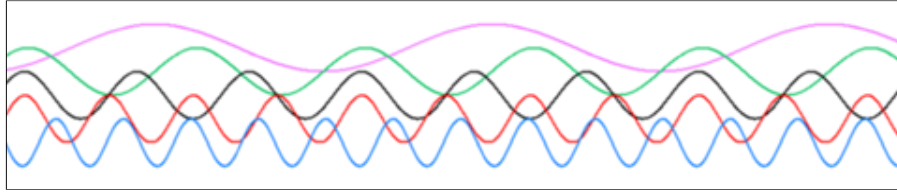


Figura 11. Exemplo de onda senoidal oscilando em diferentes frequências, sendo a linha azul a representação da variação em maior frequência e a linha rosa, em menor frequência de oscilação.

Assim, o potenciostato transforma matematicamente o eixo do tempo em um eixo de frequência (ω) através da Transformada de Fourier, ao mesmo tempo em que aplica uma determinada perturbação por exemplo, de potencial, registra a resposta de corrente que surge, obtendo por fim, a impedância correspondente àquela frequência. A partir daí, uma nova frequência de oscilação de potencial vigora, e um novo registro de impedância é feito, e assim sucessivamente para a próxima frequência, até que todo o intervalo de frequências determinado (por quem faz a medida) seja completo.

Neste ponto, é importante ressaltar que a perturbação de potencial ou corrente aplicada na EIS é muito pequena, e assim a medida é feita com o sistema em estado de equilíbrio^{52,53}, e não fora dele como a maioria das técnicas eletroquímicas faz.

É prática comum expressar a impedância como uma função complexa (3). Uma função deste tipo pode ser representada geomêtricamente em um plano complexo, que por sua vez, é desmembrado em um componente real e um componente imaginário (4).

$$Z(\omega) = Z_0 e^{j\phi(\omega)} = Z_0 [\cos(\phi) + j\text{sen}(\phi)] \quad (3)$$

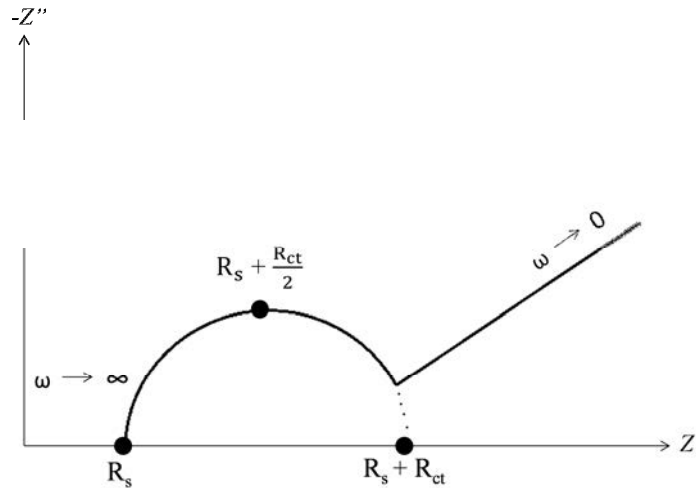
$$Z = Z_{real} + jZ_{imaginário} \quad (4)$$

Desta forma, o componente real fica localizado no eixo das abscissas e o componente imaginário fica localizado no eixo das ordenadas. Nas equações 6 e 7, j é o número imaginário, que por definição é igual à raiz quadrada de -1.

Tendo isso demonstrado, chega-se então a um dos tipos de representações gráficas mais comumente utilizadas em EIS, que é o chamado diagrama de Nyquist ou no Plano Complexo (Figura 12). Nele, a impedância total do sistema, $Z(\omega)$, é representada através da plotagem de seu componente imaginário $-Z''(\omega)$, versus seu componente real $Z'(\omega)$ (5).

Figura 12 - Representação de um diagrama de Nyquist típico.

$$Z(\omega) = Z'(\omega) - jZ''(\omega) \quad (5)$$



Um diagrama de Nyquist típico apresenta um semicírculo na região de altas frequências e uma variação linear em médias e baixas frequências. Na região de altas frequências, o efeito da relaxação de transferência de carga é visualizado através de um semicírculo, do qual podem ser extraídos os valores de alguns parâmetros importantes na análise da medida de EIS, como a resistência ôhmica da solução (R_s), a resistência de transferência de carga (R_{ct}) e a capacitância da dupla camada elétrica, (C_d)⁵⁴.

A R_s é a resistência associada à solução eletrolítica e pode ser obtida pela primeira intersecção do semicírculo com o eixo real. Na segunda intersecção do semicírculo com o eixo real, encontra-se o valor de R_s somado ao valor de R_{ct} .

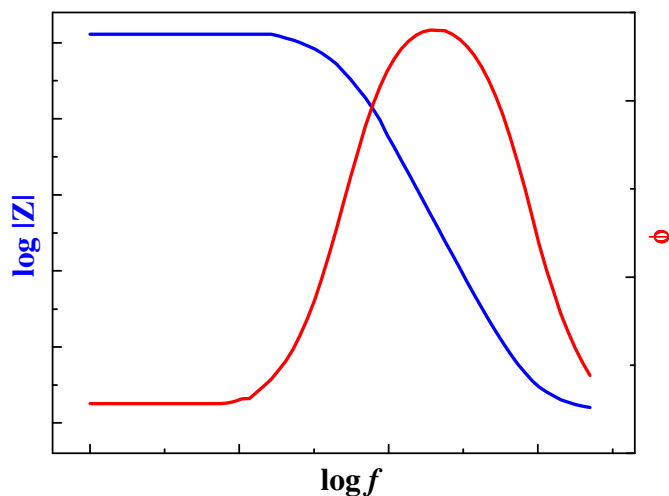
A R_{ct} é a resistência associada ao processo de transferência de carga (transferência de elétrons que ocorrem nos processos de óxido-redução) que ocorre na interface eletrodo-solução. Essa transferência eletrônica acontece na superfície do eletrodo, que sempre deverão estar presentes na solução, funcionando como uma sonda. Logo, o aumento ou diminuição no valor de R_{ct} estará diretamente relacionado com a dificuldade ou facilidade com que a transferência eletrônica da sonda acontece na interface.

Outro parâmetro bastante útil em EIS e que pode ser extraído deste tipo de representação é a capacitância da dupla camada elétrica, C_d . Esta capacitância aparece em virtude do acúmulo de cargas que se forma na interface eletrodo-solução. Seu valor pode ser obtido através da equação 6, onde f representa a frequência onde ocorre o máximo do semicírculo⁵⁴.

$$C_d = \frac{1}{2\pi f R_{ct}} \quad (6)$$

Além do diagrama de Nyquist, outra maneira de representar os dados obtidos com a EIS é através das curvas de Bode (Figura 13). As curvas de Bode são visualizadas a partir da plotagem de $\log|Z|$ (sendo $|Z|$, o módulo da impedância) e o ângulo de fase ϕ , versus o log da frequência. As informações obtidas a partir destes gráficos podem ser complementares às obtidas no diagrama de Nyquist. Conforme pode ser observado na Figura 13, alterações no módulo da impedância indicam os efeitos da resistência à transferência de carga no sistema. Por outro lado, à medida que a frequência do sistema é aumentada observam-se alterações no ângulo de fase entre o potencial aplicado e a corrente resultante. Esta alteração no ângulo de fase possibilita a obtenção de informações sobre a componente capacitiva do sistema, uma vez que as componentes capacitivas introduzem um comportamento co-senoidal na corrente⁵⁵.

Figura 13 - Representação de curvas de Bode-fase e Bode-módulo típicas.



Adicionalmente, nos sistemas que apresentam efeitos significativos da impedância à transferência de massa, a introdução de um elemento denominado "impedância Warburg" é feita com o propósito de simular as características do sistema experimental. Neste contexto, um grande conjunto de fatores pode influenciar a impedância do sistema, como processos faradaicos, adsorção de espécies eletroativas e não-eletroativas, reações no eletrodo envolvendo a formação de intermediários estáveis e heterogeneidade de superfícies, de forma a proporcionar à EIS um amplo campo de aplicação⁵⁵.

Para uma aplicação analítica, os parâmetros da EIS (R_{ct} , C_d) podem ser relacionados com a concentração de um analito de interesse, já que o aumento ou diminuição da quantidade

de uma substância que esteja imobilizada sobre o eletrodo (por exemplo anticorpos ou antígenos, no caso dos imunossensores) provocará mudanças nos valores destes parâmetros. A EIS também apresenta utilidade na caracterização do eletrodo, já que cada modificação realizada sobre a superfície do eletrodo, também provoca alterações na dinâmica da interface do eletrodo, que conseqüentemente altera a impedância medida.

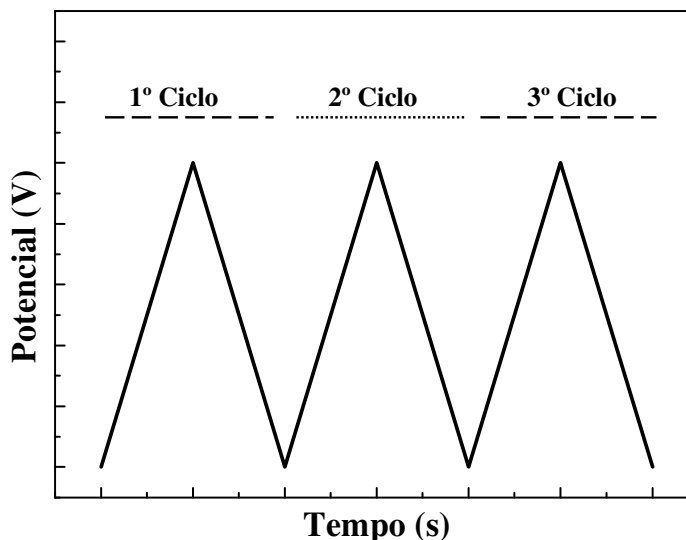
Ferreira et al.⁵⁶ utilizaram EIS na caracterização de eletrodos impressos de ouro modificados com SAM de cistamina, cistamina-glutaraldeído e proteína Tc85 de *T. cruzi* imobilizada sobre estas monocamadas. O tratamento dos resultados de impedância permitiu avaliar o recobrimento da superfície do eletrodo de trabalho com as diferentes modificações. Em outro trabalho, Ferreira et al.⁵⁷ também utilizaram EIS para otimizar as etapas de imobilização do antígeno Tc85 sobre a superfície de eletrodos impressos modificados com monocamadas autoorganizadas. A EIS permitiu otimizar o melhor tempo de incubação para a proteína recombinante e avaliar a integridade da superfície do eletrodo.

Em se tratando de pesquisa científica, sabemos no entanto, que por mais vantagens que uma técnica possa oferecer para determinada aplicação, ela dificilmente pode sozinha fornecer todas as informações para obtenção do melhor entendimento possível sobre o sistema de estudo. Uma técnica eletroanalítica que frequentemente é utilizada em conjunto com a EIS para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos é a voltametria cíclica (VC). Embora a VC não seja utilizada com freqüência na análise quantitativa, ela encontra ampla aplicabilidade no estudo de reações redox, na detecção de intermediários de reação e na observação e no acompanhamento de reações envolvendo produtos formados nos eletrodos.

Na VC, em primeiro lugar a varredura de potencial é feita em uma direção e, em seguida, na outra, enquanto a corrente é medida. Um experimento envolvendo VC pode empregar um ciclo inteiro, um ciclo parcial ou ainda vários ciclos⁵⁸.

Durante um experimento de VC, a resposta de corrente de um pequeno eletrodo estacionário em uma solução mantida em repouso, é excitada na forma de uma onda triangular de potencial, como aquela mostrada na Figura 14.

Figura 14 - Sinal de excitação em voltametria cíclica.



A onda triangular produz a varredura no sentido direto e depois no sentido inverso. Os potenciais nos quais a reversão ocorre são chamados potenciais de inversão. Para um dado experimento, os potenciais de inversão são escolhidos de maneira que possamos observar a oxidação ou redução, controlada por difusão, de uma ou mais espécies. A direção da varredura inicial pode tanto ser negativa, quanto positiva, dependendo da composição da amostra. Uma varredura na direção de potenciais mais negativos é denominada varredura direta, enquanto uma varredura na direção oposta é chamada varredura inversa⁵⁸.

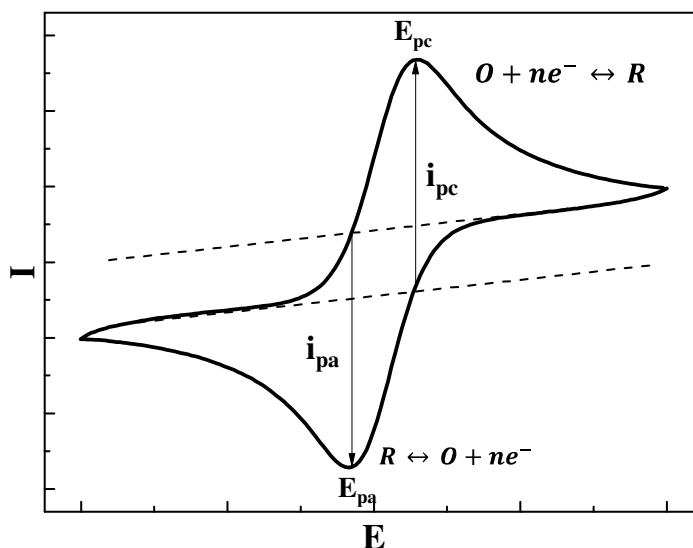
A resposta obtida em VC para um sistema reversível apresenta o perfil ilustrado na Figura 15. Durante a varredura de potencial é registrada a intensidade de corrente gerada em função do potencial aplicado e com isso é possível verificar o comportamento eletroquímico de uma espécie frente ao eletrodo utilizado. Em potenciais distantes do potencial formal da espécie em estudo, a corrente medida é chamada de corrente capacitiva. Já em potenciais próximos ao do potencial formal, é verificado o surgimento de uma corrente elétrica oriunda de uma reação eletroquímica que ocorre na superfície do eletrodo. Esta corrente é denominada corrente faradaica.

A intensidade da corrente faradaica em ampère (i_{pa} e i_{pc} na Figura 15, sendo i_{pa} a corrente de pico anódico referente a oxidação e, i_{pc} a corrente de pico catódico referente à redução), a qual é geralmente verificada na forma transiente (ou seja, um pico), para um sistema reversível com eletrodos tradicionais como carbono vítreo, platina, ouro, entre outros, é dada pela equação de Randles-Sevick (7):

$$I_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D_0^{1/2} C_0^* v^{1/2} \quad (7)$$

Sendo n o número de elétrons por partícula envolvida da reação, A é a área do eletrodo em cm^2 , D_0 é o coeficiente de difusão da espécie reagente em $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$, C_0^* é a concentração da espécie reagente na solução em mol cm^{-3} e v é a velocidade de varredura em V s^{-1} . Esta equação mostra que a intensidade da corrente medida depende de vários fatores, como área do eletrodo, coeficiente de difusão, velocidade de varredura e o mais importante, da concentração da espécie eletroativa na solução, propriedade que fundamenta a aplicação das técnicas voltamétricas na análise quantitativa⁵⁹.

Figura 15 - Voltamograma cíclico para uma solução de eletrólito contendo par redox.



Juntas, a EIS e a VC fornecem dados que se complementam e dão informações consistentes em termos de caracterização de modificações de eletrodo.

Adicionalmente, técnicas não eletroquímicas podem ser utilizadas para obtenção de mais informações sobre o sistema de estudo, principalmente no que se refere à caracterização de modificações de eletrodo. A Microscopia de Força Atômica (AFM) é uma destas técnicas.

Esta microscopia consiste em analisar a superfície de uma amostra com uma ponta de prova. A ponta é montada sobre uma alavanca com a constante de força da mola conhecida. Quando a ponta está próxima da superfície da amostra, forças de interação defletem a alavanca. Esta deflexão é medida por um sistema de detecção de posição e o sinal de erro gerado é enviado para o circuito de realimentação do microscópio. A distância ponta-amostra é então ajustada pela mudança na posição de um scanner piezoelétrico, de modo a manter constante a força medida pela alavanca. Estas variações de posição são calibradas com

padrões de altura e deste modo, o mapa destas variações nos fornece a topografia da superfície. A gama de amostras que podem ser analisadas com AFM é muito ampla, na qual podemos destacar: amostras isolantes, materiais biológicos *in vitro*, medidas *in situ* no modo eletroquímico, etc⁶⁰.

Já quando se busca a confirmação da presença de determinada substância sobre a superfície do eletrodo após a modificação, técnicas que forneçam a identificação de grupos funcionais são extremamente úteis. A espectroscopia de infravermelho por ATR (Reflectância Total Atenuada – do inglês “attenuated total reflectance”) é usado na análise da superfície de materiais sólidos ou líquidos. Nesta técnica, a superfície da amostra é colocada em contato com a superfície de um cristal óptico. A radiação infravermelha proveniente da fonte passa através do cristal (com um elevado índice de refração) incidindo várias vezes na superfície da amostra. Quando o ângulo de incidência na interface amostra/cristal excede o ângulo crítico, a reflexão total interna da radiação ocorre e uma onda evanescente é estabelecida na interface. A radiação é refletida através do cristal penetrando na amostra a cada reflexão, ao longo da superfície do cristal⁶¹. O feixe de radiação perde energia no comprimento de onda em que material da amostra absorve. Após este processo, a radiação atenuada resultante é direcionada do cristal para o percurso normal do feixe no espectrofotômetro sendo medida pelo detector, originando o espectro da amostra, que através do aparecimento de bandas características nos dá informações sobre os grupos funcionais presentes na amostra.

Poucos trabalhos na literatura tratam do desenvolvimento de imunossensores impedimétricos para detecção de corantes. Xiao et al.⁶² desenvolveram um imunossensor para detecção do corante Sudan I através da imobilização de anticorpos monoclonais anti-Sudan I sobre a superfície do eletrodo de ouro. O dispositivo apresentou limite de detecção de 0,03 ng mL⁻¹ e aplicação do imunossensor em amostras de pimenta obtiveram satisfatórias recuperações de 96,5-107,3%. Os resultados obtidos foram validados através da cromatografia líquida de alta eficiência apresentando boa correlação.

Assim, diante do exposto, o desenvolvimento de metodologia para detectar e quantificar o corante disperso Red 1 (DR1) é de suma importância, entendendo que é necessário haver um controle da qualidade da água que inclua o monitoramento dos corantes, principalmente quando se trata da água que é destinada ao consumo humano. O DR1 foi escolhido neste projeto pois é um dos representantes mais problemáticos entre os corantes têxteis de sua classe, devido sua genotoxicidade (que já foi estudada em outros trabalhos do grupo⁶³) e por ser bastante persistente e difícil de ser degradado.

2. OBJETIVOS

O presente projeto de pesquisa visa o desenvolvimento de um imunossensor impedimétrico para detectar e quantificar o corante disperso Red 1 (DR1) em baixas concentrações em amostras de água tratada.

Na busca por este objetivo, duas metodologias bastante diferentes foram estudadas:

- Construção de imunossensor impedimétrico empregando eletrodos impressos de ouro modificados com monocamadas auto-organizadas para posterior imobilização de anticorpos monoclonais anti-DR1.
- Construção de imunossensor impedimétrico empregando eletrodo convencional de carbono vítreo e imobilização de anticorpos anti-DR1 via eletro-oxidação da superfície do eletrodo.

3. METODOLOGIA

3.1 Reagentes e Materiais

Ferricianeto de potássio, cistamina, soro albumina bovina (BSA), N-hidróxi-succinimida (NHS), glutaraldeído 25%, fosfato de potássio monobásico, acetonitrila, cloreto de potássio, carbonato de sódio anidro, bicarbonato de sódio e anticorpos monoclonais anti-IgG humana conjugado com peroxidase (HRP) foram adquiridos da Sigma.

Ferrocianeto de potássio, fosfato de sódio dibásico, ácido nítrico (69-70%) e ácido sulfúrico (95-98%) foram adquiridos da J. T.Baker. Peróxido de hidrogênio 30%, dicromato de potássio, hidrocloreto de etanolamina e proteína A de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Os corantes dispersos Red 1 (DR1), Orange 1 (DO1), Red 73 (DR73), Red 78 (DR78) e p-aminotiofenol foram adquiridos da Aldrich. Cloreto de Sódio foi adquirido da Merck. Etanol foi adquirido da Panreac. 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e D-L- α ácido lipóico foram adquiridos da Fluka. Leite desnatado em pó comercial marca Molico, Nestlè também foi utilizado. Tween-20 foi adquirido da Calbiochem e Fongranal FB (pureza não informada, Clariant) foi gentilmente fornecido pela Indústria Lupo S. A.

Os anticorpos monoclonais anti-DR1 foram adquiridos da empresa Rheabiotech Ltda, Campinas, São Paulo.

Todas as soluções foram preparadas empregando água purificada ($\rho = 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) obtida de um sistema Milli-Q (Millipore).

Os eletrodos impressos foram adquiridos da BVT Technologies, Brno, República Tcheca e são assim constituídos: eletrodo de trabalho Au-Pd (m/m 98/2%), eletrodo de referência Ag-Pd (m/m 98/2%) e eletrodo auxiliar Au-Pd (m/m 98/2%). Para todas as medidas realizadas com eletrodos impressos, foi utilizada uma célula eletroquímica de compartimento único, com volume de 2 mL. Para conexão dos eletrodos foi utilizado um cabo específico para uso de eletrodos impressos adquirido da mesma empresa que fornece os eletrodos impressos (BVT Technologies).

Eletrodo de carbono vítreo com diâmetro de 3 mm, eletrodo de referência de Ag|AgCl em KCl 3M e eletrodo auxiliar de platina também foram empregados utilizando célula eletroquímica de compartimento único com volume final de 10 mL.

3.2 Soluções

Para a construção do imunossensor impedimétrico empregando eletrodos impressos de ouro e monocamada, três diferentes rotas para imobilização dos anticorpos foram estudadas e em cada uma delas, diferentes soluções foram requeridas.

Na primeira rota de imobilização dos anticorpos anti-DR1 sobre a superfície do eletrodo empregou-se: Solução de cistamina $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ preparada pela solubilização da massa correspondente em água; solução de glutaraldeído 2,5% preparada pela diluição da solução estoque (25%) em solução tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,5; solução de trabalho de proteína A preparada pela diluição da solução estoque na proporção de 1:20 também em solução tampão PBS (tampão fosfato salino); solução estoque de anticorpos monoclonais anti-DR1 de concentração $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ diluída para a concentração de $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ em solução tampão PBS; solução de bloqueio de BSA na concentração de 0,5% foi preparada pela solubilização da massa correspondente em solução tampão PBS-T (solução tampão PBS pH 7,5 contendo 0,02% de Tween-20) e solução estoque de corante DR1 ($4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), preparada pela solubilização da massa correspondente em água contendo 5% (v/v) de Fongranal FB, com diluições na solução do bloqueio.

Na segunda rota de imobilização estudada, as soluções empregadas ainda não citadas foram: Solução de ácido lipóico $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preparada pela diluição da massa correspondente em uma mistura etanol-água na proporção 1:10 e solução contendo EDC-NHS

na concentração de 30 e 10 mM, respectivamente, preparada pela solubilização da massa de ambos os reagentes em água.

Já para a terceira rota de imobilização, as soluções utilizadas foram: Solução de p-aminotiofenol $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ preparada pela solubilização da massa em etanol; solução de leite desnatado 5% m/v preparada pela solubilização da massa em tampão PBS e solução estoque de corante DR1 na concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em uma mistura de acetonitrila-água na proporção de 1:1, com diluições para concentrações desejadas em solução de bloqueio.

Em todos os estudos conduzidos por VC e EIS, foi empregada solução contendo ferricianeto e ferrocianeto de potássio $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,5.

Para a construção do imunossensor impedimétrico empregando eletrodo convencional de carbono vítreo as seguintes soluções foram empregadas: Solução aquosa de dicromato de potássio 2,5% (m/m) contendo 10% de ácido nítrico (m/m); solução aquosa de EDC/NHS na concentração 5×10^{-3} e $8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente; solução de anticorpos monoclonais anti-DR1 na concentração $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ (preparada pela diluição da solução estoque em solução tampão PBS); solução de hidrocloreto de etanolamina na concentração $100 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em solução tampão PBS; soluções estoque dos corantes dispersos Red 1 (DR1), Orange 1 (DO1), Red 73 (DR73) e Red 78 (DR78) na concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preparadas em uma mistura de solventes acetonitrila-água na proporção de 1:1, com diluições para as concentrações desejadas em solução tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,5.

3.3 Equipamentos

Para as medidas de VC foi empregado um potenciostato/galvanostato compacto μ Autolab Type III e o software GPES 3.0 (“General Purpose Electrochemical System”) para visualização e obtenção dos dados. Para as medidas de EIS foi empregado potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT 302 contendo módulo de impedância, software FRA (“Frequency Response Analyser”) e NOVA 1.10 para visualização e obtenção dos dados. Também para as medidas de EIS foi empregada Gaiola de Faraday, da EG&G Instruments, Princeton Applied Research.

As imagens topográficas da superfície do eletrodo sem modificação e após a imobilização dos anticorpos foram obtidas usando um AFM Agilent Technologies 5500 Scanning Probe Microscope (Agilent Technologies, Inc., California Street, EUA), operadas em modo intermitente (“tapping”), utilizando pontas de fósforo dopado com silício com constante de força de 20-80 N m⁻¹ e frequência de ressonância de 239-341 kHz. O fator de rugosidade (Ra) foi obtido com o software de processamento de imagens Gwyddion 2.3.

Para obtenção dos espectros de infravermelho foi utilizado um espectrômetro FT-IR da Thermo Scientific Nicolet iS5, com acessório para ATR modelo iO5 com cristal de germânio.

Para comparação do desempenho do imunossensor impedimétrico com uma técnica já estabelecida foram realizadas análises de amostras contendo DR1 por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de massas (HPLC-MS/MS). As análises foram realizadas em sistema de HPLC-MS/MS empregando cromatógrafo líquido de alta eficiência, Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, AL) com coluna Kinetex PFP da Phenomenex, acoplado a espectrômetro de massas triploquadrupolar 3200QTrap, Applied Biosystems/MDS Sciex (Sciex, Toronto, CA), com fonte de ionização TurboIonSpray® (“electrospray” - ESI) operada no modo positivo. Espectros de massa da solução de DR1 foram obtidos utilizando o espectrômetro já citado. O fluxo utilizado foi de 1,5 mL/minuto e o volume de injeção foi de 20 μ L e eluição por gradiente (Água, acetonitrila 80%/20% com ácido fórmico 0,1%).

Para ajuste do pH na preparação dos tampões empregou-se pHmetro da marca Digital Gehaka modelo PG 2000.

3.4 Procedimento Experimental

Os itens 3.4.1 a 3.4.3 se referem ao desenvolvimento de imunossensor impedimétrico empregando eletrodos impressos de ouro e monocamadas auto-organizadas e os itens 3.4.4 a 3.4.14 se referem ao desenvolvimento de imunossensor impedimétrico empregando eletrodo de carbono vítreo e eletro-oxidação da superfície.

3.4.1 Estudo da limpeza da superfície do eletrodo impresso

De modo a remover possíveis impurezas presentes na superfície dos eletrodos impressos de ouro, foram realizados estudos de três diferentes métodos de limpeza:

- 1º Método: Limpeza por VC no intervalo de potencial de 0 a +1,5 V, por 10 ciclos e $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo KCl $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$;
- 2º Método: Limpeza por VC no intervalo de potencial de 0 a +1,5 V, por 5 ciclos e $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo KCl $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$;
- 3º Método: Enxague simples dos eletrodos em etanol.

Após o processo de limpeza, os eletrodos foram submetidos à VC no intervalo de potencial de +0,45 a -0,20 V, $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$, em meio de solução de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em solução tampão PBS. Os resultados obtidos foram analisados e o método de limpeza que se mostrou mais adequado foi estabelecido.

3.4.2 Estudo da imobilização dos anticorpos monoclonais anti-Red 1 sobre a superfície dos eletrodos impressos

Conforme já citado, uma etapa fundamental na construção de um imunossensor envolve a imobilização adequada dos anticorpos (ou antígenos) sobre a superfície do transdutor, de modo que estes mantenham sua atividade biológica após a imobilização. Assim sendo, neste trabalho três rotas de foram investigadas para efetiva imobilização dos anticorpos. Cada etapa de modificação e otimização de condições experimentais foram caracterizadas por VC e EIS. As medidas eletroquímicas foram feitas utilizando os mesmos parâmetros do estudo anterior na presença do par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em PBS.

Em todas as etapas de modificação e para todas as rotas estudadas, 10 μL da solução de interesse foram adicionados sobre a superfície do eletrodo de trabalho, seguido de incubação em recipiente fechado contendo um pouco de água, sob temperatura que variou conforme a necessidade de cada molécula modificadora. A Tabela 1 resume as modificações realizadas em cada rota para imobilização dos anticorpos.

Tabela 1 - Sequência das modificações realizadas na superfície do eletrodo de trabalho nas três rotas estudadas.

Rota	Moléculas modificadoras, tempo de incubação e temperatura de incubação
1	Cistamina (SAM), 2 h à temperatura ambiente Glutaraldeído, 1 h e temperatura ambiente Proteína A, 12 h em geladeira (± 4 °C) Anticorpos anti-Red 1, 3 h em geladeira
2	Ácido Lipóico (SAM), 2 h à temperatura ambiente EDC/NHS, 1 h à temperatura ambiente Anticorpos anti-Red 1, 3 h em geladeira
3	p-Aminotiofenol (SAM), 1 h à temperatura ambiente Anticorpos anti-Red 1, 3 h em geladeira

Após cada etapa de modificação, os eletrodos foram lavados por imersão em três séries de 10 segundos em solução contendo o solvente da solução modificadora.

Concluída a etapa de imobilização dos anticorpos, os eletrodos foram incubados em solução de bloqueio. Essa etapa é necessária para que os espaços livres entre os anticorpos imobilizados sejam bloqueados, evitando assim, sinal inespecífico. Para a Rota 1 e 2, a solução de bloqueio empregada foi de BSA e para a Rota 3, solução de leite em pó desnatado. Ambas incubaram sobre a superfície do eletrodo por 1 hora à temperatura ambiente e em seguida, os eletrodos foram lavados três vezes por imersão no solvente da solução de bloqueio.

3.4.3 Estudo da repetibilidade da resposta do eletrodo impresso limpo em etanol com as técnicas VC e EIS

A repetibilidade da resposta dos eletrodos limpos foi avaliada por VC e EIS. Os valores referentes à área do pico catódico obtido na VC e à resistência de transferência de carga obtidas na EIS foram determinados em cada medida para um determinado número de eletrodos, permitindo estabelecer o desvio padrão relativo das medidas.

Os parâmetros empregados na VC foram os mesmos dos estudos anteriores: Intervalo de potencial de +0,45 a -0,20 V, $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$, em meio de solução de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-} 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em solução tampão PBS. Já para as medidas de EIS nesse mesmo meio, os parâmetros da técnica foram: Intervalo de frequência de 50 kHz a 10 mHz, amplitude de 10 mV (rms), com 10 pontos por década e tempo de 300 segundos para estabilização do potencial.

3.4.4 Estudo da imobilização dos anticorpos monoclonais anti-DR1 sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo e posterior bloqueio dos grupos carboxílicos ativados

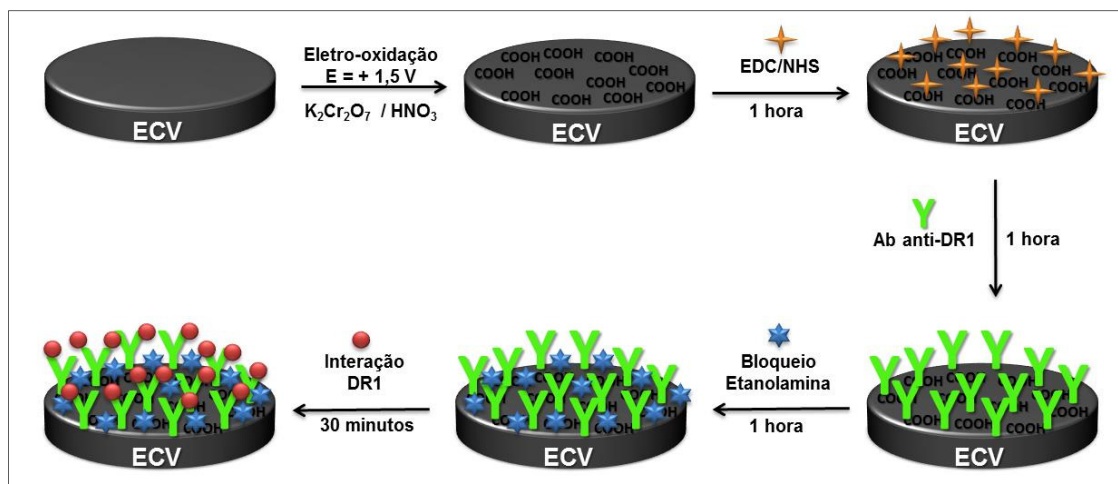
Nesta estratégia para desenvolvimento do imunossensor, o eletrodo de carbono vítreo foi submetido à uma eletro-oxidação, visando a geração de agrupamentos carboxílicos por toda a extensão de sua superfície. Para tal, um potencial de +1,5 V foi aplicado por 15 segundos em meio altamente oxidante (solução de dicromato de potássio 2,5% (m/m) contendo 10% de ácido nítrico (m/m)⁵⁰).

A seguir, o eletrodo foi enxaguado com água deionizada e incubado por 1 hora, à temperatura ambiente, em solução de EDC/NHS (na concentração 5×10^{-3} e 8×10^{-3} mol L⁻¹, respectivamente). O objetivo desta etapa é a ativação dos grupos carboxílicos da superfície, para posterior ligação com anticorpo anti-DR1.

Terminado o tempo de incubação em solução de EDC/NHS, o eletrodo foi lavado por imersão em água deionizada sob moderada agitação por 3 séries de 10 segundos e em seguida, foi incubado por mais 1 hora em solução de anticorpo anti-DR1 na concentração 0,05 mg mL⁻¹. Por fim, para remoção de moléculas fracamente ligadas, o eletrodo foi lavado em solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹, pH 7,5, por imersão sob moderada agitação em 3 séries de 10 segundos.

Tendo sido confirmada a efetiva imobilização dos anticorpos sobre o eletrodo, os grupos carboxílicos ativados remanescentes (que não foram utilizados na ligação com o anticorpo) foram bloqueados de modo a não contribuir com sinal inespecífico, já que poderiam favorecer a ligação de outra molécula através deles. Por isso, o eletrodo contendo anticorpo anti-DR1 incubou por 30 minutos em solução de etanolamina, seguido de lavagem por imersão em lavado em solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹, pH 7,5. Após esta etapa, o eletrodo está pronto para a interação com o antígeno (corante DR1). A Figura 16 sintetiza a metodologia de modificação do eletrodo de carbono vítreo (ECV) para construção do imunossensor.

Figura 16 - Esquema de modificação do eletrodo de carbono vítreo para construção do imunossensor.



As etapas referentes à imobilização do anticorpo e sucessivo bloqueio da superfície do eletrodo foram caracterizadas por VC e EIS. Os parâmetros empregados na VC foram os mesmos dos estudos anteriores: Intervalo de potencial de +0,45 a -0,20 V, $v = 25$ mV, em meio de solução de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 1×10^{-3} mol L⁻¹ preparada em solução tampão PBS. Já para as medidas de EIS nesse mesmo meio, os parâmetros da técnica foram: Intervalo de frequência de 50 kHz a 10 mHz, amplitude (rms) de 10 mV, com 10 pontos por década e tempo de 300 segundos para estabilização do potencial.

Antes e após a realização de qualquer modificação sobre o eletrodo de carbono vítreo, este foi cuidadosamente polido utilizando uma suspensão de alumina com partículas de 0,05 μm colocada sobre uma superfície úmida de feltro apoiada em suporte de vidro. Após ser polido, o eletrodo de carbono vítreo foi lavado abundantemente com etanol e água deionizada.

3.4.5 Estudo da estabilidade do eletrodo contendo anticorpo imobilizado após medidas de EIS sucessivas

A estabilidade da imobilização do anticorpo anti-DR1 sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo após a realização de medidas de impedância foi investigada.

O eletrodo foi modificado conforme descrito no item 3.4.4 até a etapa de imobilização do anticorpo e levado para realização da medida de EIS (os parâmetros da técnica utilizados foram os mesmos do item 3.4.4). Ao término da medida, o eletrodo foi enxaguado com água deionizada.

A seguir, o eletrodo permaneceu imerso em solução tampão PBS por 30 minutos, enxaguado novamente com água deionizada e levado para realização de uma nova medida.

Este ciclo foi realizado repetidamente por 4 horas e os resultados obtidos foram comparados buscando verificar se o perfil apresentado com o passar do tempo e após diversos enxagues, sofria qualquer alteração que pudesse indicar lixiviação das moléculas imobilizadas, ou outro tipo de alteração da superfície do eletrodo.

3.4.6 Estudo da adsorção do corante DR1 sobre o eletrodo bloqueado (na ausência de anticorpo anti-DR1)

De modo a verificar se o bloqueio dos grupos carboxílicos ativados era efetivo, o eletrodo de carbono vítreo foi modificado conforme descrito no item 3.4.4, à exceção da etapa de incubação em solução de anticorpo anti-DR1, e após a etapa de bloqueio foi realizada medida de impedância.

Depois disto, o eletrodo foi enxaguado com água deionizada, incubado em solução de corante DR1 na concentração $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ por 30 minutos, enxaguado novamente e então, uma nova medida foi realizada.

Os diagramas de Nyquist obtidos antes e após a incubação do eletrodo na presença do corante foram comparados para verificar a possível ocorrência de adsorção sobre a superfície bloqueada.

3.4.7 Imagens de microscopia de força atômica (AFM) da superfície do eletrodo de carbono vítreo limpo e após a imobilização do anticorpo

As superfícies do carbono vítreo limpo e após a imobilização do anticorpo anti-DR1 foram caracterizadas via AFM. Para tal, uma placa de carbono vítreo de dimensões 2 x 2 cm e 0,5 cm de espessura foi cuidadosamente polida utilizando suspensão de alumina com partículas de 0,05 μm colocadas sobre uma superfície úmida de feltro apoiada em suporte de vidro. Após ser polida, a placa de carbono vítreo foi lavada abundantemente com etanol e água deionizada.

Sobre a placa foi feita a imobilização do anticorpo anti-DR1 conforme descrito no item 3.4.4 e então, as imagens topográficas antes e após a modificação foram obtidas.

3.4.8 Caracterização da imobilização do anticorpo sobre o eletrodo de carbono vítreo através de infra-vermelho (FT-IR-ATR)

A superfície do carbono vítreo limpo e após a imobilização do anticorpo anti-DR1 foi caracterizada também por espectroscopia no infra-vermelho com Transformada de Fourier por reflectância total atenuada (FT-IR-ATR). A limpeza da placa de carbono vítreo e posterior modificação foram realizadas (conforme item 3.4.4) e os espectros foram obtidos.

3.4.9 Otimização dos parâmetros experimentais para realização das medidas de EIS

Tendo sido concluídas as etapas de caracterização da modificação do eletrodo de carbono vítreo, partiu-se para os estudos de otimização dos parâmetros a serem empregados nas medidas de EIS, que é a técnica na qual a metodologia analítica do imunossensor proposto se fundamenta.

Os seguintes parâmetros da técnica foram estudados: tempo de estabilização do potencial de circuito aberto (E_{OC}), amplitude de perturbação do potencial, intervalo de frequência e número de medidas por década de frequência.

A otimização foi realizada com o eletrodo de carbono vítreo modificado até a etapa do bloqueio, ou seja, com o imunossensor pronto para uso.

3.4.10 Otimização das etapas de construção do imunossensor via planejamento fatorial completo

A partir do estabelecimento das melhores condições para realização das medidas de EIS com o imunossensor foram realizados estudos quimiométricos através de planejamento fatorial completo para otimização das condições experimentais envolvidas na construção do imunossensor. Foram selecionadas para realização deste estudo as etapas que têm maior impacto no sinal de resposta medido após a interação com o analito.

O planejamento fatorial é classificado como um método simultâneo, no qual as variáveis de interesse e que apresentam influência significativa na resposta são avaliados ao mesmo tempo. Pode ser representado por b^k , no qual k é o número de variáveis e b é o número de níveis escolhidos. Planejamentos fatoriais do tipo 2^k são os mais comuns e o número de ensaios necessários aumenta rapidamente com k , o número total de fatores investigados⁶⁴.

Assim, os parâmetros avaliados foram: concentração de anticorpo anti-DR1 a ser imobilizado sobre o eletrodo, tempo de incubação do anticorpo anti-DR1 e tempo de

incubação em solução de antígeno DR1, em níveis alto e baixo, definidos a partir de trabalhos anteriores do grupo. A Tabela 2 resume o que foi descrito.

Tabela 2 - Parâmetros experimentais a serem otimizados e os respectivos valores utilizados no estudo quimiométrico.

Variável	Nível Alto	Nível Baixo
[Ab-anti DR1]	0,05 mg mL ⁻¹	0,005 mg mL ⁻¹
Tempo de incubação do Ab	60 minutos	30 minutos
Tempo de incubação Ag	60 minutos	30 minutos

Os estudos foram realizados em triplicata ($2^3 = 8$ experimentos, que em triplicata totalizam 24 experimentos) no período de seis dias (6 blocos de 4 experimentos), que foi o menor período possível para se concluir o estudo com o mínimo de variações possíveis de dia para dia.

O eletrodo foi modificado normalmente, seguindo as combinações de tempo e concentração estabelecidas no estudo e na etapa de interação com o antígeno todos os eletrodos foram incubados na mesma concentração de corante DR1, 1×10^{-7} mol L⁻¹.

Após a realização de cada experimento, o eletrodo de carbono vítreo foi devidamente limpo, conforme já descrito no item 3.4.4 para poder receber uma nova modificação correspondente a um novo experimento.

O parâmetro de resposta avaliado foi a variação do valor de resistência de transferência de carga (ΔR_{ct}), que foi calculado pela subtração do valor de R_{ct} obtido após a incubação com o antígeno, e o valor de R_{ct} obtido na etapa de bloqueio (última etapa de modificação).

3.4.11 Seletividade da resposta do imunossensor frente a outros corantes dispersos

De modo a avaliar a seletividade da resposta do imunossensor frente a diferentes corantes têxteis, o dispositivo foi incubado individualmente em soluções dos corantes dispersos Orange 1 (DO1), Red 73 (DR73) e Red 78/50 (DR78) na concentração 1×10^{-7} mol L⁻¹ por 30 minutos. O eletrodo foi então lavado cuidadosamente com água deionizada, as medidas de EIS foram registradas e o ΔR_{ct} obtido para cada caso foi analisado. Estes corantes foram escolhidos, pois são da mesma classe que o DR1 e também por apresentarem estrutura e massas moleculares similares.

3.4.12 *Curvas analíticas do corante DR1*

Ao fim dos estudos de otimização dos parâmetros da técnica e das condições experimentais envolvidas no ensaio, o desempenho do imunossensor foi avaliado. Para construção da curva analítica, o imunossensor foi incubado por 30 minutos, à temperatura ambiente, em solução de corante DR1 em diferentes concentrações (preparadas pela diluição da solução estoque de DR1 em solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹, pH 7,5). Após cada período de incubação, o imunossensor foi lavado cuidadosamente com água deionizada. Por fim, as medidas de EIS foram realizadas em meio de solução de Fe(CN)₆^{3-/4-} 1 x 10⁻³ mol L⁻¹ preparada em solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹, pH 7,5. O parâmetro de resposta avaliado nas diferentes concentrações de DR1 foi o ΔR_{ct} (calculado como descrito no item 3.4.10).

3.4.13 *Aplicação do imunossensor em amostra de água*

Experimentos preliminares para determinação de corante DR1 em amostras de água tratada foram também realizados. A resposta do imunossensor foi testada frente à uma amostra de água proveniente de torneira em diluição 1:5 (em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹, pH 7,5) pelo método de adição de padrão do corante DR1, nas mesmas condições utilizadas para determinação de DR1 empregadas na curva analítica, descrita no item 3.4.11.

A amostra de água de torneira utilizada neste estudo foi devidamente armazenada em um recipiente limpo e rotulado com as informações da coleta. Todos os estudos de desempenho do imunossensor foram realizados utilizando esta mesma amostra.

3.4.14 *Determinação da constante de dissociação anticorpo-antígeno*

A constante de dissociação para o corante DR1 e seu anticorpo imobilizado na superfície do eletrodo de carbono vítreo pôde ser determinada a partir dos dados de capacitância, C_d , obtidos nas medidas de EIS realizadas para a construção da curva analítica, assumindo o modelo da isoterma de Langmuir. Embora a R_{ct} seja mais sensível à ligação do corante DR1 que a capacitância, a isoterma de adsorção deve ser preferencialmente determinada a partir dos dados de capacitância⁶⁵.

Existem dois tipos de sítios de ligação no anticorpo neste sistema: os sítios de ligação já ocupados pelas moléculas de DR1 e os sítios livres, sendo que estes sítios correspondem a elementos de circuito elétrico dispostos em paralelo. Já que elementos capacitivos arranjos em paralelo, combinam-se de forma aditiva, espera-se uma relação linear entre a capacitância e o grau de cobertura da superfície⁶⁵.

A reação de dissociação para o corante DR1 e seu anticorpo (Ab) é apresentada abaixo, para a constante de equilíbrio K_d (do 8 a 13):



$$K_d = \frac{[DR1][Ab]}{[DR1Ab]} \quad (9)$$

Assumindo que o grau de cobertura do complexo antígeno-anticorpo é θ , a cobertura correspondente ao anticorpo não ligado será $1 - \theta$. Então:

$$K_d = \left(\frac{1 - \theta}{\theta} \right) [DR1] \quad (10)$$

Assumindo então a isoterma de adsorção de Langmuir, a mudança na C_d pode ser diretamente relacionada ao grau de cobertura da superfície:

$$\Delta C_d = \theta \Delta C_{d,max} \quad (11)$$

Onde:

$$\Delta C_{d,max} = [C_{d(\theta=0)} - C_{d(\theta=1)}] / C_{d(\theta=0)} \quad (12)$$

O uso da mudança nos dados da capacitância (ΔC_d , sem unidade) permite a transformação da isoterma de adsorção em uma equação na forma de Hanes-Woolf⁶⁵:

$$\frac{[DR1]}{\Delta C_d} = \frac{[DR1]}{C_{d,max}} + \frac{K_d}{\Delta C_{d,max}} \quad (13)$$

Por fim, a construção de um gráfico de $[DR1]/\Delta C_d$ versus $[DR1]$, permite calcular o valor da constante de dissociação, a partir da divisão do valor do intercepto pelo valor do coeficiente angular, obtidos pela regressão linear da curva⁶⁵.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De modo a facilitar o entendimento dos resultados obtidos neste trabalho, a apresentação destes foi dividida em duas partes, já que abrangem o desenvolvimento de imunossensor impedimétrico para detecção de DR1 por metodologias diferentes.

4.1 Desenvolvimento de imunossensor impedimétrico para detecção do corante DR1 empregando eletrodos impressos de ouro

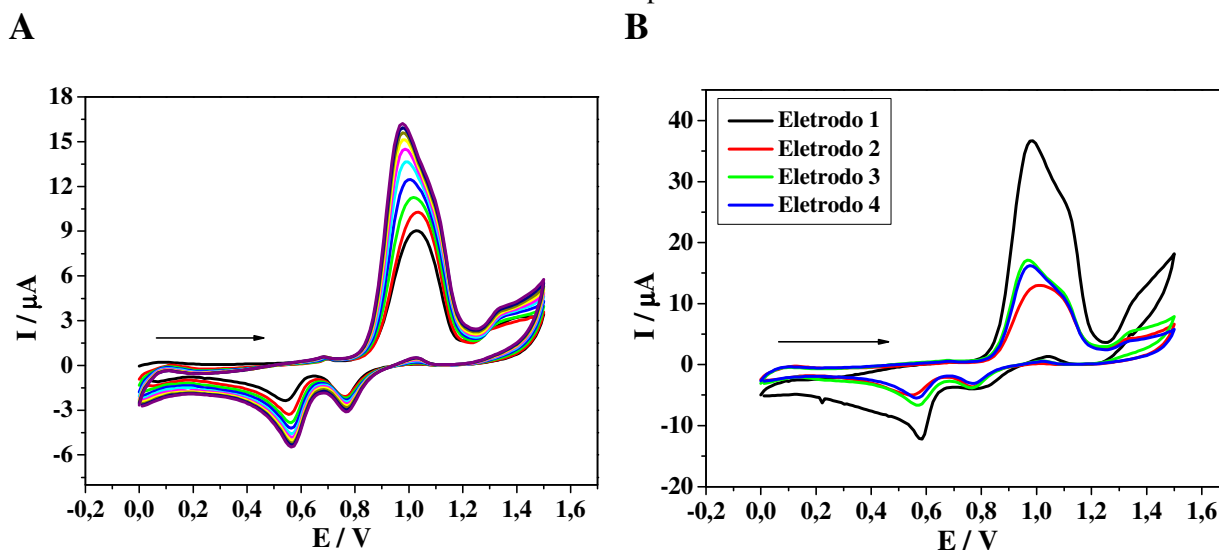
A princípio, o presente trabalho visou a construção do imunossensor utilizando eletrodos impressos comerciais. Estes eletrodos apresentam diversas vantagens tais como o fato de serem descartáveis, fáceis de usar, já serem adequados para uso em sistemas portáteis e miniaturizados, empregarem volume muito pequeno de soluções etc. Estas características os tornam muito atrativos para o desenvolvimento de sensores em geral, e por isso, o projeto inicial tinha sua proposta fundamentada somente com este tipo de eletrodo.

4.4.1 Estudo da limpeza da superfície do eletrodo impresso

Durante o processo de fabricação, embalagem e armazenamento dos eletrodos impressos, possíveis impurezas podem se depositar sobre sua superfície eletródica. Essas impurezas, por sua vez, podem comprometer a homogeneidade da condutividade do material, prejudicando o desempenho do eletrodo e a repetibilidade das medidas. Por conta disso foram investigados diferentes métodos para limpeza da superfície do eletrodo.

Na literatura podemos encontrar trabalhos⁶⁶⁻⁶⁷ que realizam a limpeza da superfície de eletrodos de ouro por VC na presença de ácido sulfúrico. Assim, o primeiro método estudado envolveu a limpeza por voltametria cíclica de 0 a +1,5 V, por 10 ciclos e $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ em solução de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $\text{KCl } 1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Os voltamogramas obtidos nesse processo estão ilustrados na Figura 17.

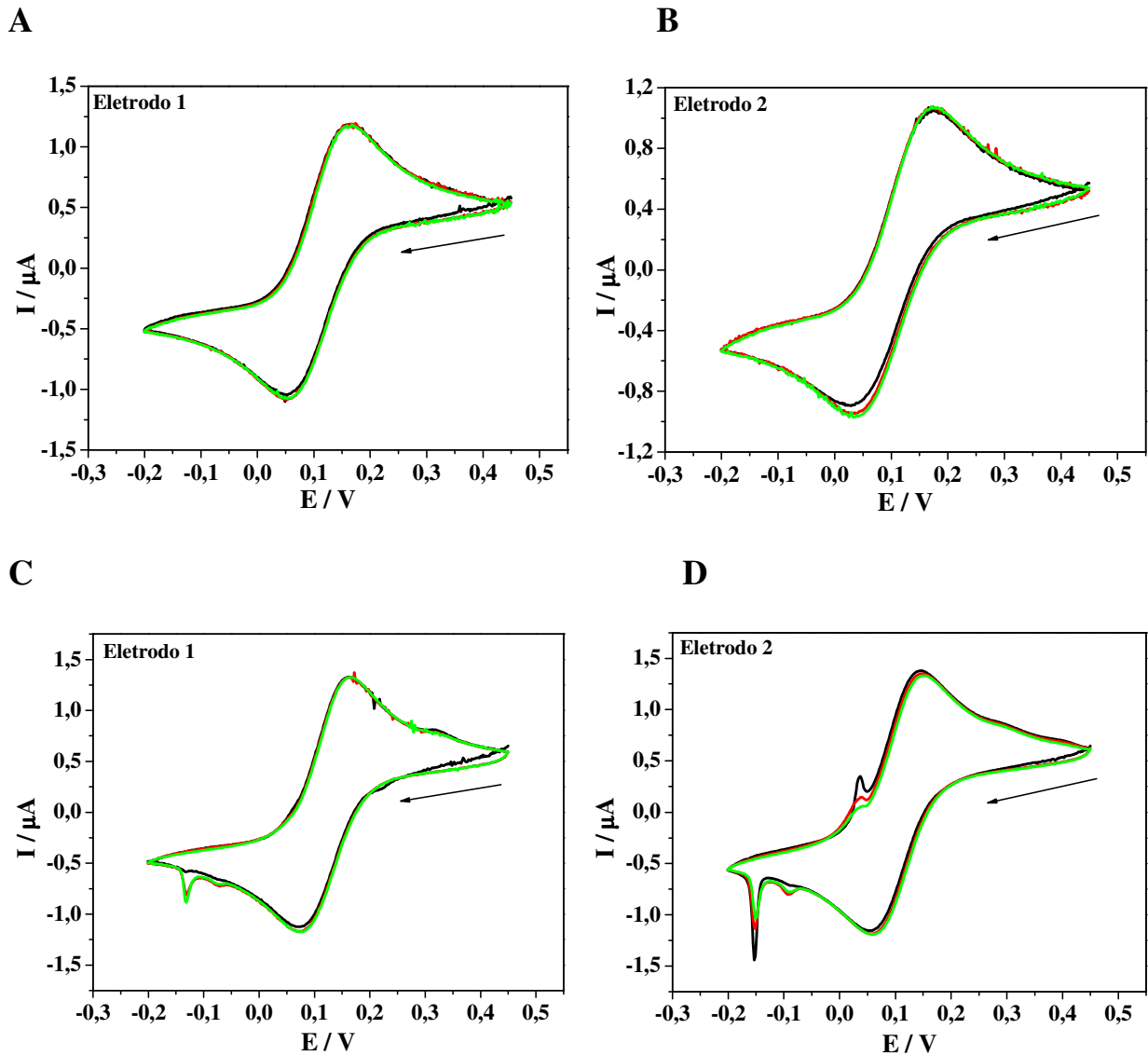
Figura 17 - A. Voltamogramas obtidos no processo de limpeza do eletrodo impresso em ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, 10 ciclos realizados em um mesmo eletrodo. **B.** 10^o ciclos de limpeza de quatro diferentes eletrodos impressos reunidos.



Como pode ser verificado na Figura 17B, o mesmo processo de limpeza gerou voltamogramas com perfis e valores de corrente diferentes de um eletrodo para outro, indicando que as superfícies dos eletrodos não são exatamente homogêneas.

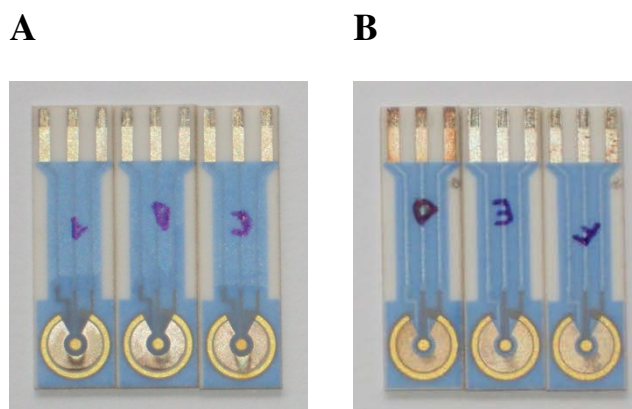
Para verificar o efeito do processo de limpeza dos eletrodos, voltametrias cíclicas no intervalo de potencial de $+0,45$ a $-0,20 \text{ V}$ em meio de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-} 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,5 foram realizadas antes e após o processo de limpeza em um mesmo eletrodo. A Figura 18 mostra que após o processo de limpeza surgiram distorções e picos não existentes anteriormente, demonstrando a ocorrência de reações não desejadas do ácido com o material do eletrodo ou até mesmo a lixiviação de parte desse material.

Figura 18 - Voltamogramas cíclicos obtidos em meio de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,5, sendo **A** e **B** antes e **C** e **D** após o processo de limpeza em ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ em dois diferentes eletrodos impressos de ouro.



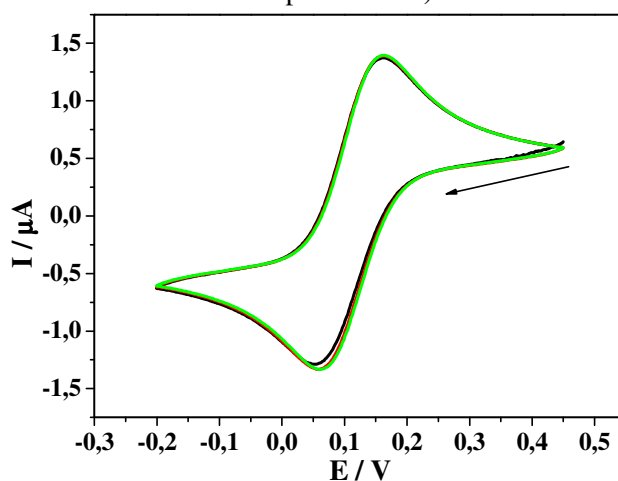
Por conta disso, um segundo método de limpeza foi testado visando tornar as condições de limpeza mais brandas. Um menor número de ciclos (5) e menor concentração de ácido sulfúrico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) foram empregados na limpeza de novos eletrodos e ainda assim foram verificados picos e distorções após o processo de limpeza. O dano causado aos eletrodos submetidos a essas duas condições de limpeza pode ser observado também visualmente conforme apresentado na Figura 19.

Figura 19 - A Aparência dos eletrodos impressos de ouro após serem submetidos à voltametria cíclica por 10 ciclos em ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e **B** por 5 ciclos em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.



Diante desse resultado decidiu-se utilizar um método de limpeza que não empregasse o ácido sulfúrico e que a presença de KCl afeta o eletrodo de referência. Assim, o terceiro método de limpeza estudado consistiu no enxague simples dos eletrodos novos em etanol, com auxílio de pisseta por alguns segundos. Após o enxague, os eletrodos secaram rapidamente à temperatura ambiente e então foram submetidos a voltametria cíclica. A Figura 20 apresenta o voltamograma obtido após esse processo.

Figura 20 - Voltamograma cíclico do eletrodo impresso obtido após enxague com etanol (os 3 ciclos estão apresentados).



Os voltamogramas obtidos após o enxague dos eletrodos em etanol apresentaram um perfil limpo, sem distorções ou picos, além daqueles referentes à redução e oxidação do par redox escolhido e por isso estabeleceu-se este método de limpeza como mais adequado para os eletrodos impressos, já que não ocasiona dano ao material do eletrodo. Esse procedimento foi

então empregado para todos os eletrodos antes de todos os estudos e antes que estes fossem submetidos a qualquer procedimento de modificação.

4.4.2 Estudo da imobilização dos anticorpos monoclonais anti-DR1 sobre a superfície dos eletrodos impressos

4.4.2.1 Rota 1 – Imobilização dos anticorpos via proteína A de *S. aureus*

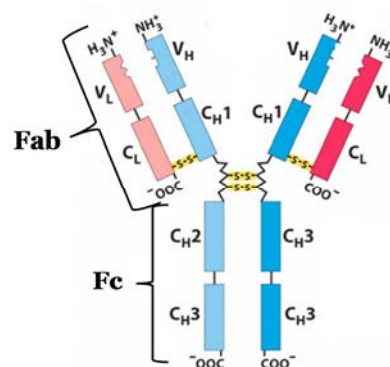
Inicialmente, este foi o único método proposto para a imobilização dos anticorpos no projeto de pesquisa.

A primeira etapa de modificação por essa rota compreende a formação de uma SAM de cistamina sobre a superfície do ouro. A formação da SAM ocorre pela quimissorção da cistamina sobre os eletrodos impressos de ouro via grupo tiol, deixando os grupos amino terminais expostos em direção à solução⁵⁶.

O próximo passo consiste na adição de solução 2,5% de glutaraldeído sobre os eletrodos com a SAM. A molécula de glutaraldeído é bifuncional e assim, um dos grupos carbonila desta molécula podem se ligar ao grupo amino primário da extremidade livre da SAM enquanto o outro permanece livre no topo da superfície.

Depois disto, solução de proteína A é adicionada à superfície já modificada. Neste passo, os grupos amino da proteína A provavelmente reagem com o grupo carbonila do glutaraldeído via formação de Base de Schiff. A imobilização de anticorpos via proteína A é vantajosa devido à grande afinidade desta proteína com a porção F_c dos anticorpos, o que garante uma conformação desejável ao anticorpo na superfície do eletrodo, já que a porção F_{ab} (onde estão os sítios de ligação com o antígeno) dos anticorpos ficará disponível. A Figura 21 ilustra a estrutura geral dos anticorpos.

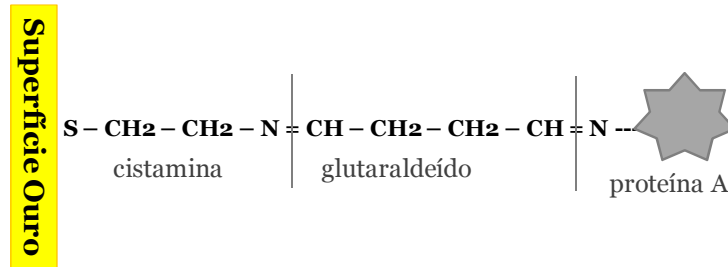
Figura 21 - Estrutura geral dos anticorpos.



Fonte: Nelson; Cox (2006, p. 177).

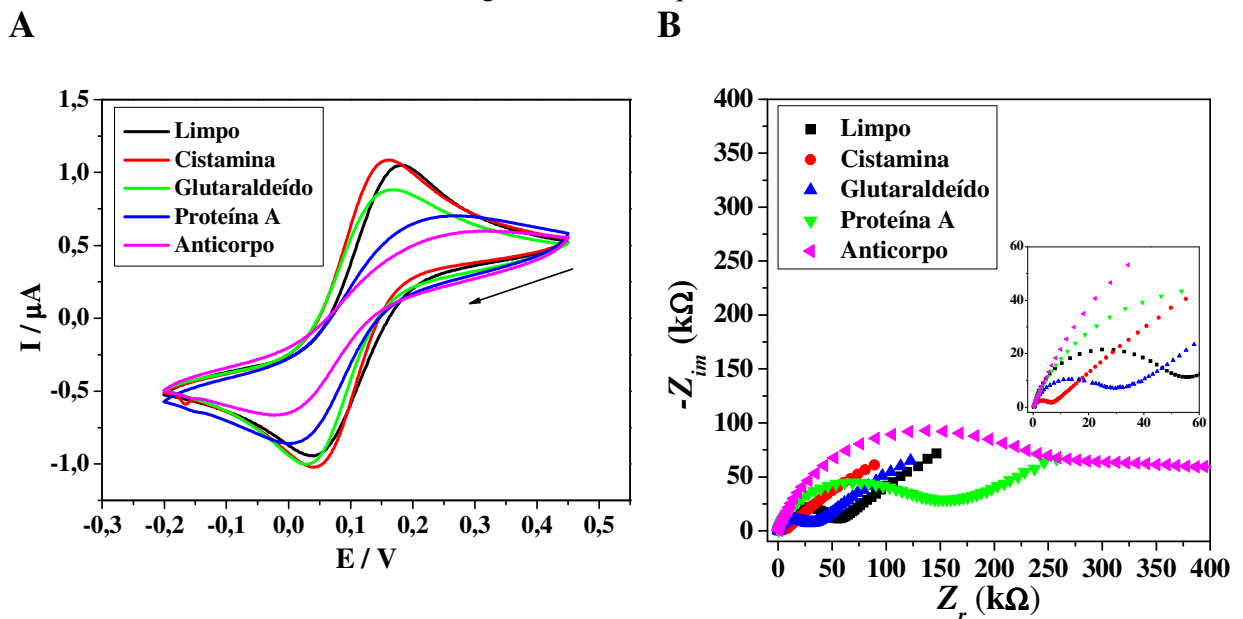
Para melhor entendimento das etapas envolvidas nesta rota de imobilização, o esquema da modificação está apresentado na Figura 22.

Figura 22 - Esquema das etapas empregadas para imobilização dos anticorpos monoclonais anti-Red 1 pela Rota 1.



Após a imobilização da proteína A, solução contendo os anticorpos monoclonais anti-DR1 foi adicionada sobre os eletrodos. A ligação dos anticorpos com a proteína A ocorre via ligação peptídica, formada a partir dos grupos carboxílicos da porção F_c do anticorpo com os grupos amino abundantes na molécula da proteína A, resultando em uma amida. Todas as etapas de modificação foram caracterizadas por VC e EIS em meio de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 1×10^{-3} mol L^{-1} em tampão PBS pH 7,5. A Figura 23 apresenta os resultados dessas caracterizações.

Figura 23 - Etapas de modificação empregadas para imobilização dos anticorpos monoclonais anti-DR1 via proteína A sobre eletrodos impressos de ouro caracterizadas **A** por VC e **B** por EIS. Inset: Região de altas frequências.



Os voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo limpo apresentam o perfil típico em meio do par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, com um par de picos de corrente em +0,042 V (pico catódico) e +0,18 V (pico anódico), como esperado para um modelo de transferência eletrônica quasi-reversível ($I_{pa}/I_{pc} \neq 1,0$ e ΔE_p diferente de 59 mV). O par ferri/ferrocianeto não exibe uma resposta completamente reversível em quase todas as soluções tampões fosfato (com pH ao redor de 7 e concentrações dos sais ao redor de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). As principais razões para isso podem ser um desvio do processo de controle difusional no eletrodo, adsorção de fosfato na superfície do eletrodo e influência da queda ôhmica⁵⁶.

Já os voltamogramas cíclicos referentes a modificação do eletrodo com cistamina mostram que houve um discreto deslocamento do pico anódico para potenciais mais negativos e mudanças pouco significativas nas intensidades dos picos anódico e catódico. O fato dos voltamogramas cíclicos obtidos após a formação da SAM apresentarem somente uma ligeira diferença em relação aos voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo limpo demonstra que uma superfície com baixo recobrimento possivelmente foi obtida, facilitando o acesso de espécies eletroativas por difusão nas áreas não cobertas do eletrodo.

Então, o recobrimento da superfície do eletrodo após a modificação com cistamina foi investigado através da equação 14, sendo $I_{p,SAM}$ e $I_{p,limpo}$, as correntes de pico anódico do eletrodo com a SAM e do eletrodo limpo, respectivamente⁵⁶. Foi obtido um valor de $\theta = 0,10$, que confirmou o baixo recobrimento da superfície do eletrodo pela SAM. Recobrimentos relativamente baixos por SAM de cistamina já foram anteriormente observados e relatados⁶⁸.

$$\theta = 1 - \left(\frac{I_{p,SAM}}{I_{p,limpo}} \right) \quad (14)$$

Esse baixo recobrimento pode ser devido a rugosidade do eletrodo, além da presença de cargas positivas na SAM, já que é possível que hajam grupos amino protonados neste pH. A existência de cargas positivas pode causar um aumento da repulsão lateral das moléculas de cistamina durante a formação da SAM, diminuindo assim a efetividade do recobrimento e também ocasionar por atração eletrostática, facilitação da redução dos íons $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$. Todos esses fatores podem justificar a similaridade das respostas do eletrodo com SAM de cistamina e dos eletrodos limpos⁵⁶.

Após a adição de glutaraldeído foi possível observar uma diminuição na intensidade nas correntes de pico do par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ e um aumento na diferença dos potenciais entre

os picos anódico (+0,17 V) e catódico (+0,030 V) indicando que houve algum bloqueio na reação de transferência eletrônica. Um recobrimento estimado de $\theta = 0,18$ foi obtido para esta etapa, sugerindo que o aumento no comprimento da cadeia sobre a superfície do eletrodo ocasionou um aumento na resistência de transferência eletrônica aparente.

A partir da Figura 23A também é possível verificar que após a etapa de modificação com a proteína A e da etapa de imobilização do anticorpo anti-DR1 os voltamogramas apresentaram correntes de pico pouco definidas, aumento na separação dos potenciais de pico ($\Delta E_p = 0,20$ V para a modificação com proteína A e $\Delta E_p = 0,24$ V para a imobilização do anticorpo) e aumento do recobrimento, com $\theta = 0,40$ para a etapa da proteína A e $\theta = 0,60$ para a etapa do anticorpo. Esses resultados demonstram que houve uma diminuição significativa na reação de transferência eletrônica devido ao bloqueio parcial da superfície e alongamento da camada modificadora.

As caracterizações realizadas por EIS confirmam os resultados observados pela VC. Os valores de resistência de transferência eletrônica foram obtidos em cada etapa e estão apresentados na Tabela 3.

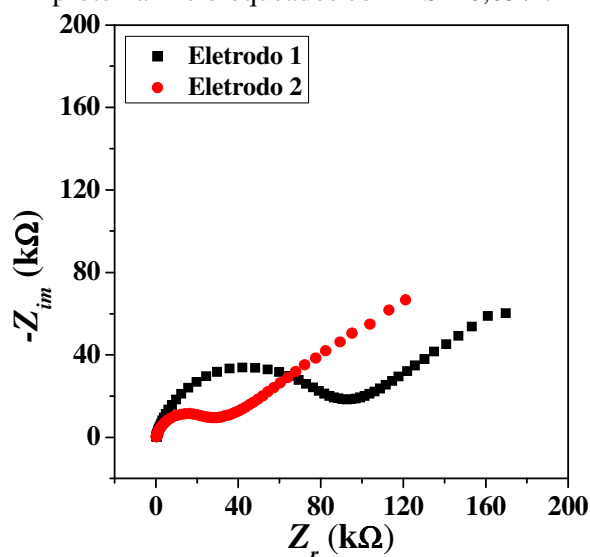
Tabela 3 - Parâmetros obtidos na caracterização do eletrodo por EIS em cada etapa de modificação.

Etapa da Modificação do Eletrodo	R_s (kΩ)	Z_{re} (kΩ)	R_{ct} (kΩ)
Limpo	0,34	24,70	48,72
SAM de cistamina	0,38	3,11	5,46
Glutaraldeído	0,37	13,29	25,48
Proteína A	0,36	60,36	120,00
Anticorpo	0,36	120,69	240,66

O aumento sucessivo dos valores de R_{ct} após cada etapa de modificação (exceto para a etapa da SAM de cistamina, pelas razões já citadas) estão em conformidade com os resultados obtidos por VC, confirmando que as modificações foram efetivamente realizadas com aparente sucesso na imobilização do anticorpo na superfície do eletrodo.

Após definir a metodologia de imobilização do anticorpo, os eletrodos foram incubados com solução de BSA 0,05% preparada em meio de solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹, pH 7,5 contendo 0,02% de Tween 20. O objetivo desta etapa foi bloquear os espaços não ocupados entre os anticorpos, evitando que moléculas possam se adsorver na superfície do eletrodo produzindo um sinal inespecífico, ou seja, que não é proveniente da reação de reconhecimento do antígeno pelo anticorpo. As medidas de EIS realizadas estão apresentadas na Figura 24.

Figura 24 - Diagramas de Nyquist obtidos para dois eletrodos impressos modificados pela rota da proteína A e bloqueados com BSA 0,05%.

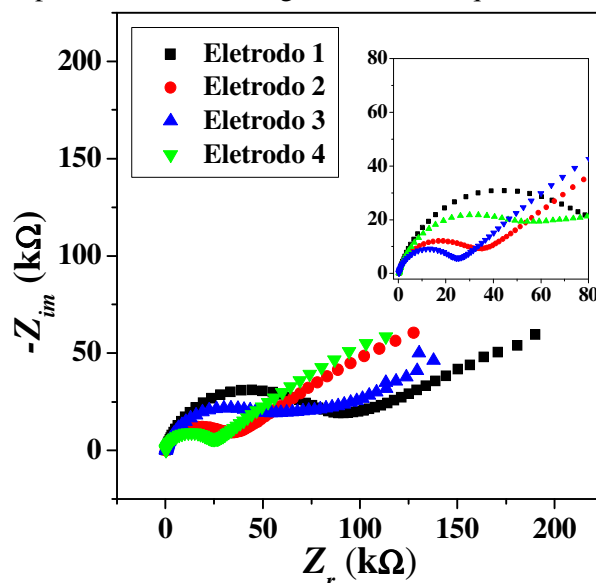


Foi verificada grande discrepância entre os valores de R_{ct} para os dois eletrodos que foram submetidos às mesmas modificações com as mesmas soluções. Além disso, ambos valores de R_{ct} para esses eletrodos (23,38 e 66,74 kΩ) foram bem inferiores ao obtido para a etapa de imobilização do anticorpo via glutaraldeído (240,66 kΩ) já apresentado.

De modo a investigar a repetibilidade de cada etapa de modificação, foram realizadas medidas de EIS para diversos eletrodos depois de lavados para todas as etapas de modificação. Foi obtida boa repetibilidade entre as medidas para os eletrodos limpos, modificados com cistamina e com glutaraldeído. Na etapa da proteína A, no entanto, foram obtidas medidas bastante dispersas, com pouca repetibilidade, sendo que em algumas delas nenhuma proteína A pareceu estar imobilizada (resposta similar à dos eletrodos limpos). A Figura 25 apresenta os resultados dessas medidas que obtiveram um desvio padrão relativo de 63,73%, em relação a R_{ct} de cada eletrodo.

Um novo lote de proteína A foi adquirido e as medidas refeitas. Da mesma forma, as modificações empregando a proteína A continuaram dispersas e sem repetibilidade, sendo que em muitos estudos a proteína não pareceu estar imobilizada. Provavelmente, a imobilização da proteína A não foi tão efetiva e estável como pareceu nos estudos preliminares, e esta molécula possivelmente se desprende com facilidade da superfície do eletrodo. Desse modo, sem o controle da quantidade de proteína A imobilizada e sem a garantia da presença dessa molécula na superfície do eletrodo, o uso desta molécula para o desenvolvimento do imunossensor foi descartado e novas rotas para imobilização do anticorpo foram exploradas.

Figura 25 - Diagramas de Nyquist obtidos para quatro eletrodos impressos modificados até a etapa da proteína A. Inset: Região de altas frequências.



4.4.2.2 Rota 2 – Imobilização dos anticorpos via SAM de ácido lipóico e agrupamentos carboxílicos ativados

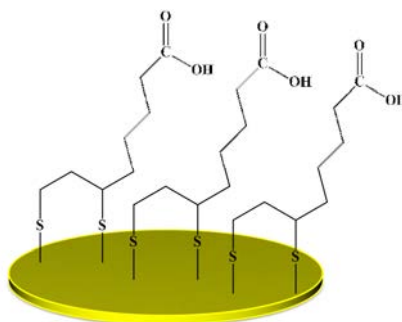
É importante ressaltar que os resultados apresentados daqui em diante foram obtidos com um novo lote de eletrodos impressos de ouro (de mesma marca e modelo), e por isso foram observadas diferenças em relação as intensidades das medidas para os eletrodos limpos tanto na VC como na EIS quando comparados com as medidas feitas com o lote anterior, o que influenciou na intensidade de todas as outras etapas de modificação.

Esta rota de imobilização de anticorpos já foi anteriormente utilizada com sucesso em nosso grupo de pesquisa na construção de imunossensor impedimétrico para detecção de Aflatoxina B₁⁶⁹.

A primeira etapa de modificação por esta metodologia envolve a formação de uma SAM de ácido lipóico. O ácido lipóico possui um agrupamento tiol, que da mesma forma que a cistamina, se ligará ao ouro presente na superfície do eletrodo. Na extremidade oposta, a molécula de ácido lipóico apresenta um grupo carboxílico terminal que ficará direcionado para a solução após a formação da SAM, conforme mostra a Figura 26.

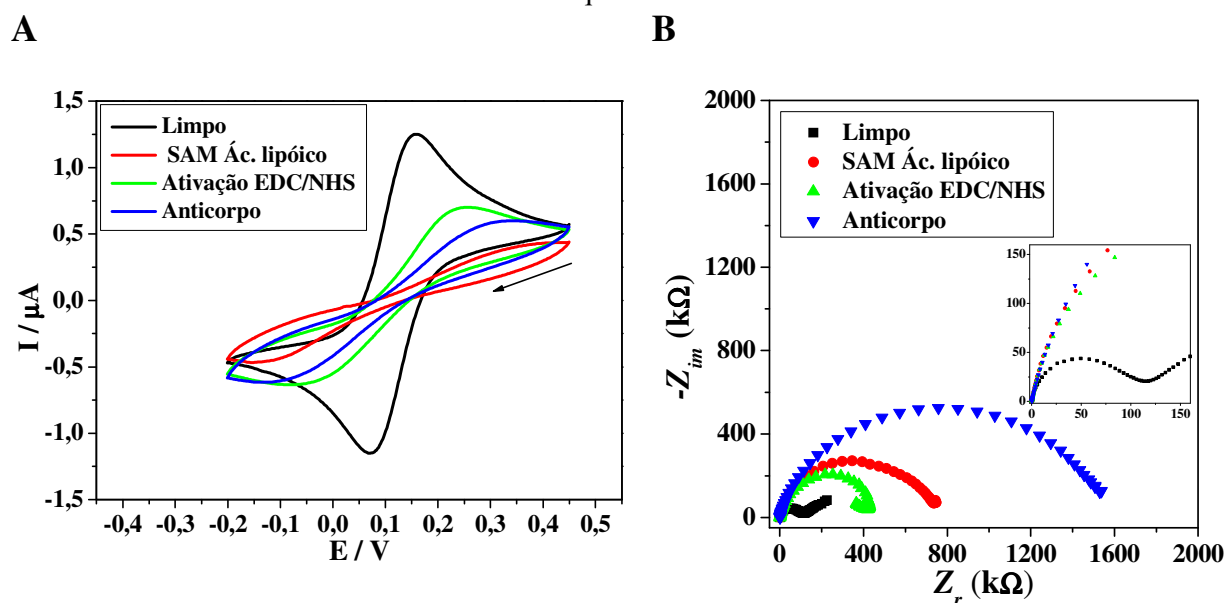
A seguir, os grupos carboxílicos terminais são ativados com solução de EDC/NHS conforme mecanismo já apresentado (Figura 8).

Figura 26 - Representação da superfície do eletrodo impresso de ouro modificada com a SAM de ácido lipóico.



As medidas de caracterização de cada etapa de modificação desta rota foram realizadas em triplicata por VC e EIS, apresentando boa repetibilidade e indicando efetiva imobilização do anticorpo (Figura 27).

Figura 27 - Etapas de modificação empregadas para imobilização dos anticorpos monoclonais anti-Red 1 via SAM de ácido lipóico caracterizadas **A** por VC e **B** por EIS. Inset: Região de altas frequências.



Novamente, os resultados obtidos pela VC e EIS estiveram em conformidade para cada etapa de modificação do eletrodo.

Pode-se verificar pelo voltamograma obtido após a formação da SAM, uma grande deformação do perfil de reversibilidade, indicando que houve grande recobrimento da superfície por esta SAM e considerável bloqueio da reação de transferência eletrônico do par redox. O valor do recobrimento não pôde ser calculado devido a dificuldade na determinação da corrente de pico no eletrodo modificado com a SAM.

Após a ativação dos grupos carboxílicos, houve uma melhora no perfil de reversibilidade em relação à etapa da SAM, porém com separação dos potenciais de pico por volta de 0,17 V e recobrimento estimado de $\theta = 0,60$ pode-se afirmar que ainda assim há grande bloqueio na superfície do eletrodo. Essa melhora no perfil, pode ser devido a presença de alguma carga presente no intermediário formado durante o processo de ativação, que pode por atração eletrostática ocasionar a facilitação da redução dos íons $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$.

No voltamograma referente à imobilização dos anticorpos ocorre novamente uma piora no perfil de reversibilidade, com separação dos potenciais de pico por volta de 0,3 V e recobrimento de $\theta = 0,78$, evidenciando que após essa etapa, mais moléculas estão presentes na superfície do eletrodo.

Pela EIS, os valores de R_{ct} em cada etapa de modificação foram determinados e estão apresentados na Tabela 4. Novamente, verificou-se o aumento sucessivo dos valores de R_{ct} após cada etapa de modificação, exceto para a etapa de ativação, provavelmente pela presença de cargas no intermediário ativado, que ocasionam o favorecimento da transferência eletrônica do par redox.

Tabela 4 - Parâmetros obtidos na caracterização do eletrodo por espectroscopia de impedância eletroquímica em cada etapa de modificação na rota.

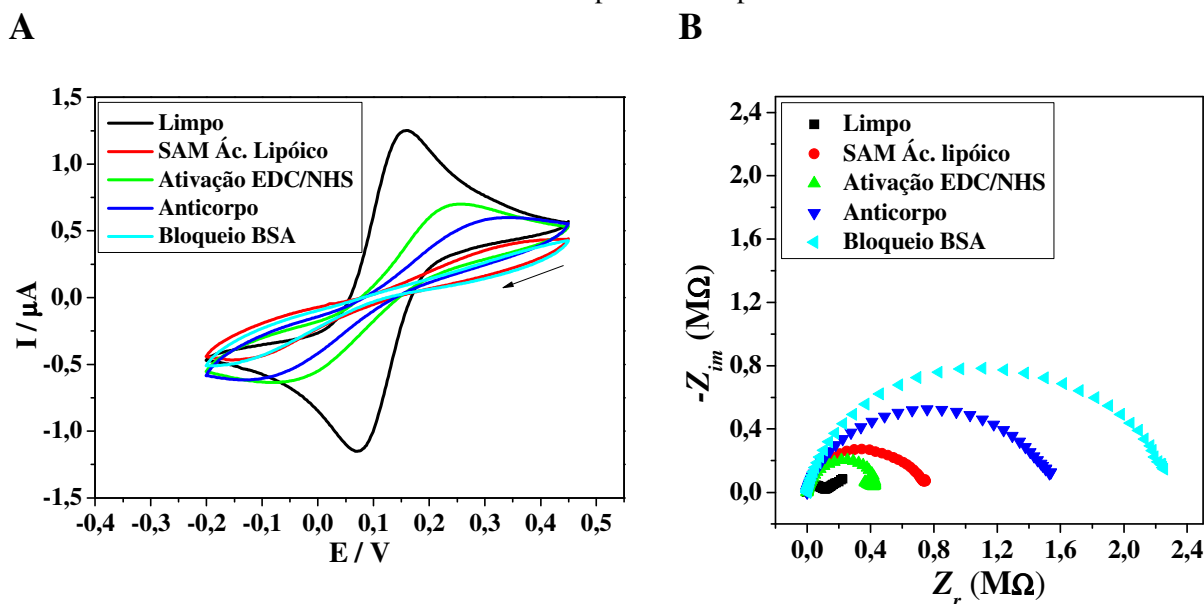
Etapas da Modificação do Eletrodo	R_s (kΩ)	Z_{re} (kΩ)	R_{ct} (kΩ)
Limpo	0,36	44,10	84,48
SAM de ác. lipóico	0,39	353,81	706,84
Ativação EDC/NHS	0,39	234,26	467,74
Anticorpo	0,37	750,00	1499,30

Pode-se verificar que os resultados das caracterizações obtidos pelas duas técnicas estão coerentes e indicam efetiva imobilização do anticorpo na superfície do eletrodo.

Após a imobilização do anticorpo sobre o eletrodo, solução de BSA foi utilizada para bloqueio dos espaços livres entre os anticorpos. O estudo foi realizado em triplicata, com boa repetibilidade tanto por VC e EIS. A Figura 28 mostra como a etapa de bloqueio da superfície aparece em relação às demais.

É fácil verificar que o voltamograma referente à etapa do bloqueio causou uma piora no perfil de reversibilidade em relação à etapa do anticorpo, indicando que as moléculas de BSA estão presentes na superfície do eletrodo. Pela EIS, o valor de $R_{ct} = 2174,24$ k Ω foi obtido para esta etapa, confirmando ter havido incremento no bloqueio da reação de transferência eletrônica do par redox em relação à etapa anterior.

Figura 28 - Etapas de modificação empregadas para imobilização dos anticorpos monoclonais anti-Red 1 via SAM de ácido lipóico e bloqueio da superfície dos eletrodos impressos de ouro modificados caracterizadas **A** por VC e **B** por EIS.

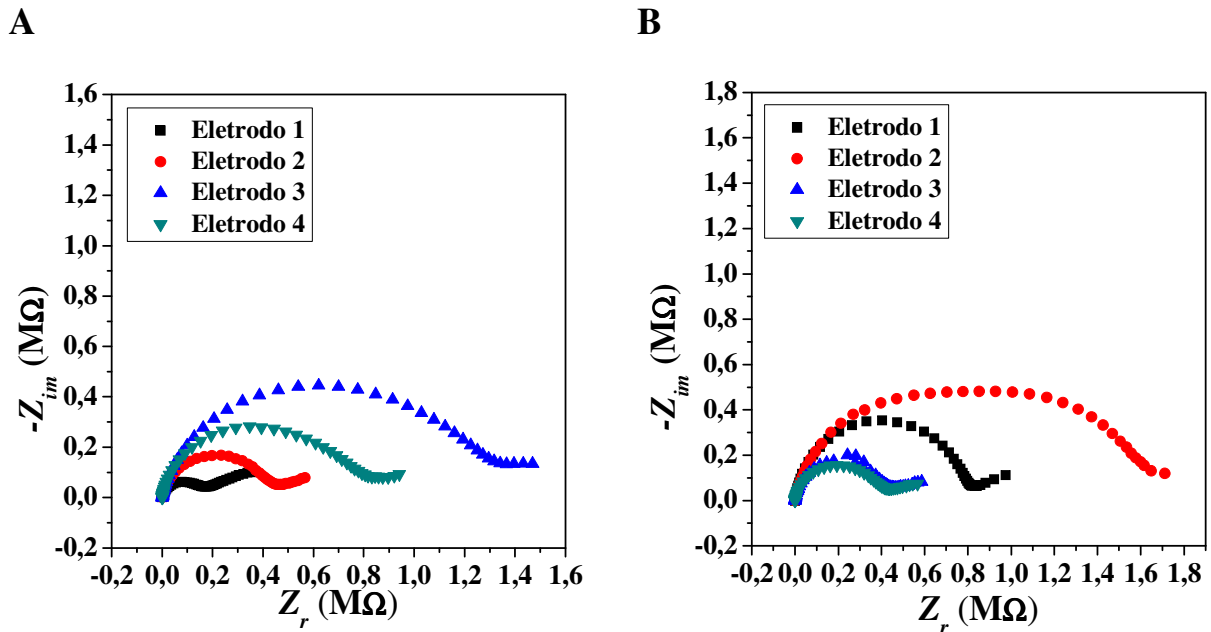


Então, baseados nos bons resultados para imobilização dos anticorpos e bloqueio da superfície por esta rota, o corante DR1 foi adicionado sobre os eletrodos modificados. Duas concentrações de corante, 1×10^{-5} e 1×10^{-6} mol L⁻¹, foram testadas em quadruplicata através da EIS. É importante ressaltar aqui, que estas soluções de corante foram obtidas pela diluição da solução estoque de corante (4×10^{-4} mol L⁻¹, em solução de bloqueio) preparada em água contendo 5% do dispersante comercial Fongranal para solubilização do corante, que é insolúvel em meio aquoso. A Figura 29 mostra os resultados dessas medidas.

Como pode ser verificado na Figura 29 não foi obtido nenhum comportamento aparente de aumento ou diminuição na intensidade das medidas nas diferentes concentrações de corante. As medidas ficaram dispersas apresentando desvio padrão relativo de 74 e 70% para as concentrações 1×10^{-5} e 1×10^{-6} mol L⁻¹, respectivamente.

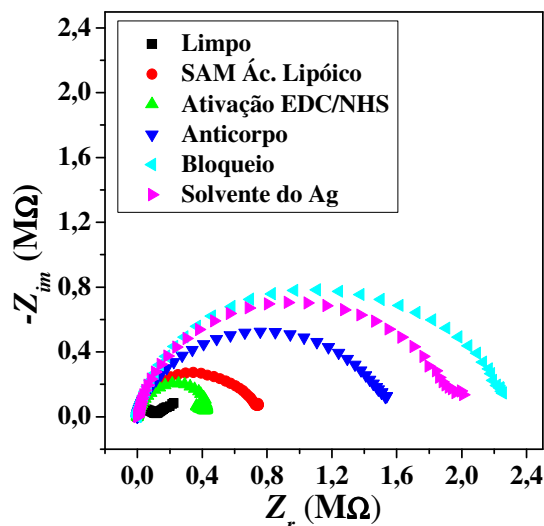
Uma característica, no entanto, foi observada para todas as medidas realizadas na presença do corante: a impedância obtida foi menor que a obtida na etapa do bloqueio. Este fato poderia ser explicado por duas hipóteses: lixiviação de moléculas já imobilizadas, provavelmente ocasionadas pela presença do Fongranal, ou, o corante DR1 facilitar o processo de transferência eletrônica. Essas hipóteses foram investigadas, como demonstrado a seguir.

Figura 29 - Medidas obtidas com eletrodos impressos de ouro modificados pela rota do ácido lipóico e bloqueados com BSA após a adição de corante DR1 nas concentrações **A** 1×10^{-5} e **B** 1×10^{-6} mol L⁻¹ (n=4).



De modo a investigar se o solvente Fongranal ocasiona lixiviação das moléculas já imobilizadas no eletrodo foram feitas medidas de EIS em triplicata nas quais, na etapa referente à adição do corante Red 1, foi adicionado apenas o solvente (água e Fongranal na proporção referente a uma solução 1×10^{-5} mol L⁻¹). As medidas apresentaram boa repetibilidade e a comparação com as demais etapas é apresentada na Figura 30.

Figura 30 - Medidas obtidas com eletrodos impressos de ouro modificados pela rota do ácido lipóico e bloqueados com BSA após a adição do solvente do corante (água e Fongranal na proporção referente a uma solução 1×10^{-5} mol L⁻¹).

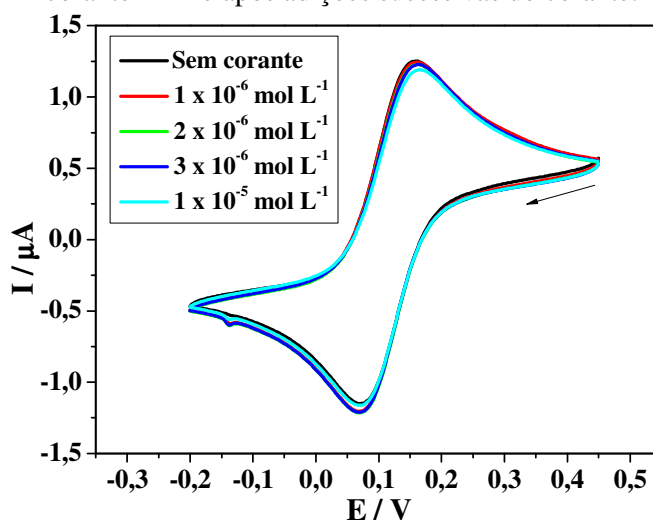


Foi verificado que apesar de haver uma diminuição na impedância em relação à etapa do bloqueio, não é possível atribuir ao solvente a diminuição tão significativa observada na presença do corante. Por isso, concluiu-se que o solvente do corante ocasiona pouca lixiviação das moléculas imobilizadas.

Assim, foi estudada a hipótese de que o corante DR1 poderia contribuir na reação de transferência eletrônica.

Na tentativa de verificar se o corante DR1 provoca qualquer facilitação no processo de transferência eletrônica, voltamogramas cíclicos foram obtidos com eletrodo limpo na ausência de corante e após adições sucessivas de corante DR1. O resultado deste estudo está apresentado na Figura 31.

Figura 31 - Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo impresso de ouro limpo na ausência de corante DR1 e após adições sucessivas do corante.



Não foi verificada nenhuma alteração no perfil dos voltamogramas obtidos na ausência e na presença do corante neste estudo, indicando que não há facilitação do processo de transferência eletrônica pela molécula do corante.

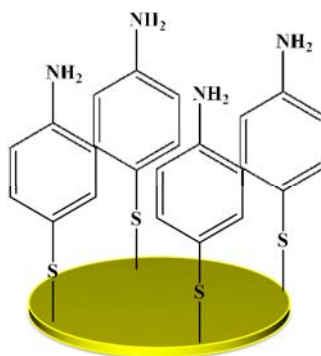
A rota de imobilização do anticorpo utilizando SAM de ácido lipóico mostrou ser mais vantajosa em relação à rota da proteína A, não só em termos de efetividade na imobilização, mas também em termos de tempo envolvido e simplicidade do ensaio. Enquanto a rota que emprega proteína A demanda 18 horas para imobilização dos anticorpos e quatro etapas de modificação do eletrodo, a rota que utiliza o ácido lipóico necessita de 6 horas e menor número de etapas (somente 3 etapas). No entanto, a rota do ácido lipóico apresenta uma

desvantagem: não há garantia da orientação final dos anticorpos na superfície do eletrodo após a imobilização. Como já demonstrado, os grupos carboxílicos ativados da SAM devem se ligar aos grupos amino laterais presentes no anticorpo. Porém, a porção F_{ab} do anticorpo possui terminações amino, que também podem se ligar à SAM, tornando os sítios de ligação com antígeno indisponíveis para reação. Esse fato poderia justificar o resultado disperso obtido após a adição de diferentes concentrações de corante, já que a quantidade de sítios de ligação do anticorpo disponíveis em cada eletrodo pode ser diferente. Desse modo, uma outra estratégia para imobilização orientada dos anticorpos foi estudada.

4.4.2.3 Rota 3 – Imobilização dos anticorpos via SAM de *p*-aminotiofenol

Esta proposta se fundamenta na formação de uma SAM de *p*-aminotiofenol sobre o eletrodo impresso de ouro. A molécula de *p*-aminotiofenol se liga através do grupo tiol no ouro, deixando um grupo amino terminal direcionado à solução, conforme mostrado na Figura 32.

Figura 32 - Representação da superfície do eletrodo impresso de ouro modificada com a SAM de *p*-aminotiofenol.



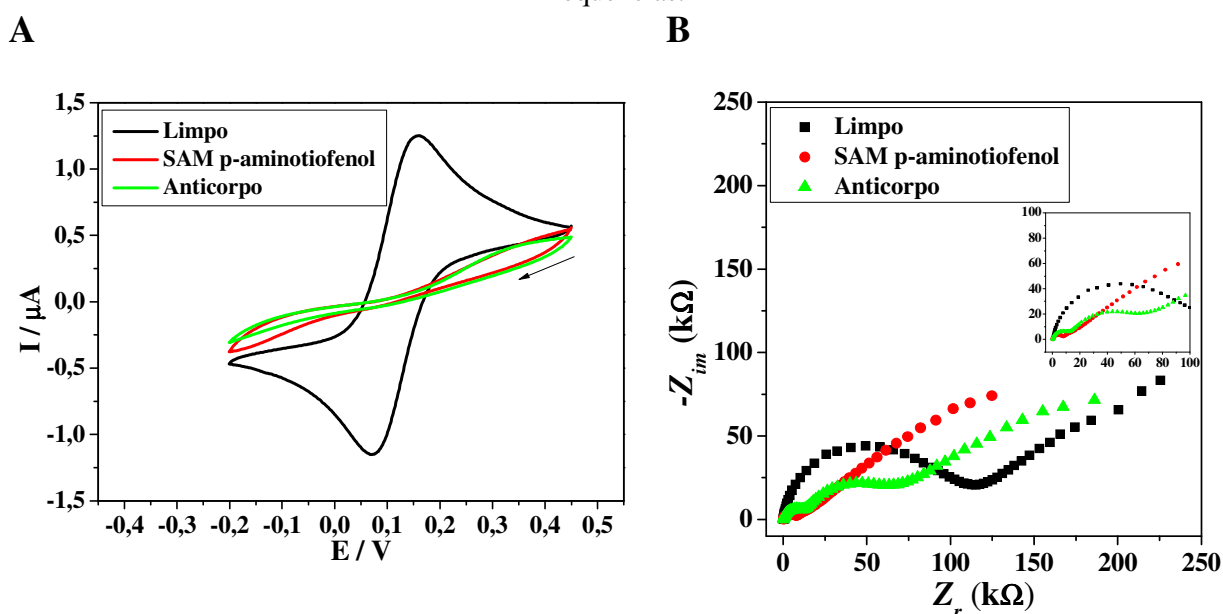
Após a formação da SAM, os anticorpos são adicionados sobre à superfície do eletrodo. A ligação do anticorpo na SAM ocorre através do grupo carboxílico da porção F_c com os grupo amino terminais da SAM via ligação peptídica. Desse modo, espera-se que a porção F_{ab} dos anticorpos fique direcionada à solução, disponível para interação com o antígeno. Esta rota de imobilização de anticorpo é a mais simples em termos de tempo (4 horas) e etapas de modificação (apenas 2 etapas).

Como nas outras rotas, as etapas de modificação foram caracterizadas por EIS e VC, apresentando boa repetibilidade. Os resultados estão apresentados na Figura 33.

Pode-se observar na Figura 33A, uma grande deformação no perfil de reversibilidade no voltamograma referente à etapa de formação da SAM, com grande recobrimento da superfície (que não pôde ser estimado pela ausência de picos). A deformação no perfil se mantém após a etapa de imobilização do anticorpo, o que não permite concluir se houve ou não imobilização dos anticorpos. Já através da EIS, podemos observar com clareza uma grande diminuição na impedância do sistema para a etapa da formação da SAM, e após a imobilização do anticorpo, o aparecimento de um segundo semi-círculo, indicando a imobilização do anticorpo.

Deve ser destacado aqui, que nos estudos apresentados daqui em diante, a solução estoque de corante ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi preparada em meio de água/ACN na proporção 1:1, pois foi observada degradação do Fongranal armazenado.

Figura 33 - Etapas de modificação empregadas para imobilização dos anticorpos monoclonais anti-DR1 via SAM de *p*-aminotiofenol caracterizadas **A** por VC e **B** por EIS. Inset: Região de altas frequências.



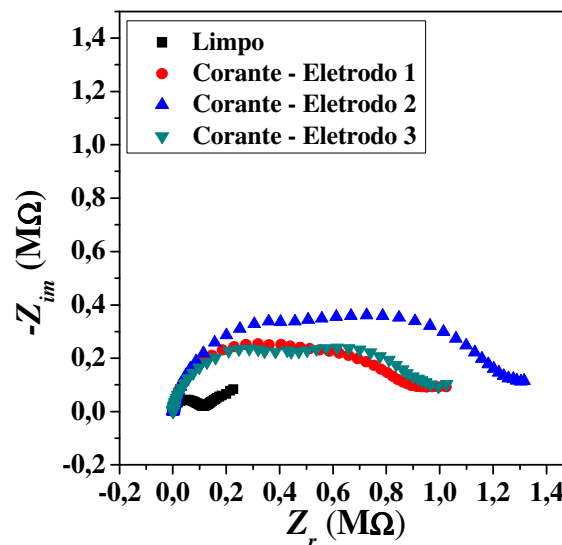
A seguir, foi efetuado o bloqueio com BSA dos eletrodo modificados por esta rota conforme descrito nos estudos anteriores. Não foi observado aumento na impedância do sistema para estas medidas, indicando que as moléculas de BSA não se ligaram ou se ligaram fracamente sobre a SAM, permitindo que fossem lixiviadas no processo de lavagem.

Por isso, foi realizado o estudo da adsorção do corante sobre a superfície limpa do eletrodo, pois caso as moléculas do corante não se adsorvessem na superfície do eletrodo, não seria necessária a etapa de bloqueio. Eletrodos impressos limpos foram incubados por 30

minutos na presença de solução de corante DR1 na concentração $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, e em seguida foram lavados e medidas de EIS foram realizadas. O resultado deste estudo está apresentado na Figura 34.

Observou-se uma grande adsorção do corante sobre a superfície do eletrodo impresso de ouro, demonstrando que é inviável descartar a etapa de bloqueio da superfície, pois será observado aumento no sinal que não será proveniente somente da reação de reconhecimento antígeno-anticorpo.

Figura 34 - Estudo da adsorção do corante Red 1 sobre a superfície de eletrodos impressos de ouro.



Diante deste resultado, foi testado um novo tipo de bloqueio do eletrodo modificado: solução de leite em pó desnatado 5% (m/v) preparada em solução tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,5. Com esta solução de leite em pó desnatado foi observado aumento do bloqueio da superfície quando comparado à etapa do anticorpo, porém de forma irregular, com valores de resistência muito discrepantes de um eletrodo para outro.

Esse fato inviabilizou a continuidade dos estudos, já que uma adequada repetibilidade e estabilidade das etapas de modificação não foram alcançadas com nenhuma das três rotas estudadas e por isso, um estudo simples para verificar a resposta exibida por diferentes eletrodos impressos limpos frente à VC e EIS foi conduzido.

4.4.3 Estudo da repetibilidade da resposta do eletrodo impresso limpo em etanol com as técnicas VC e EIS

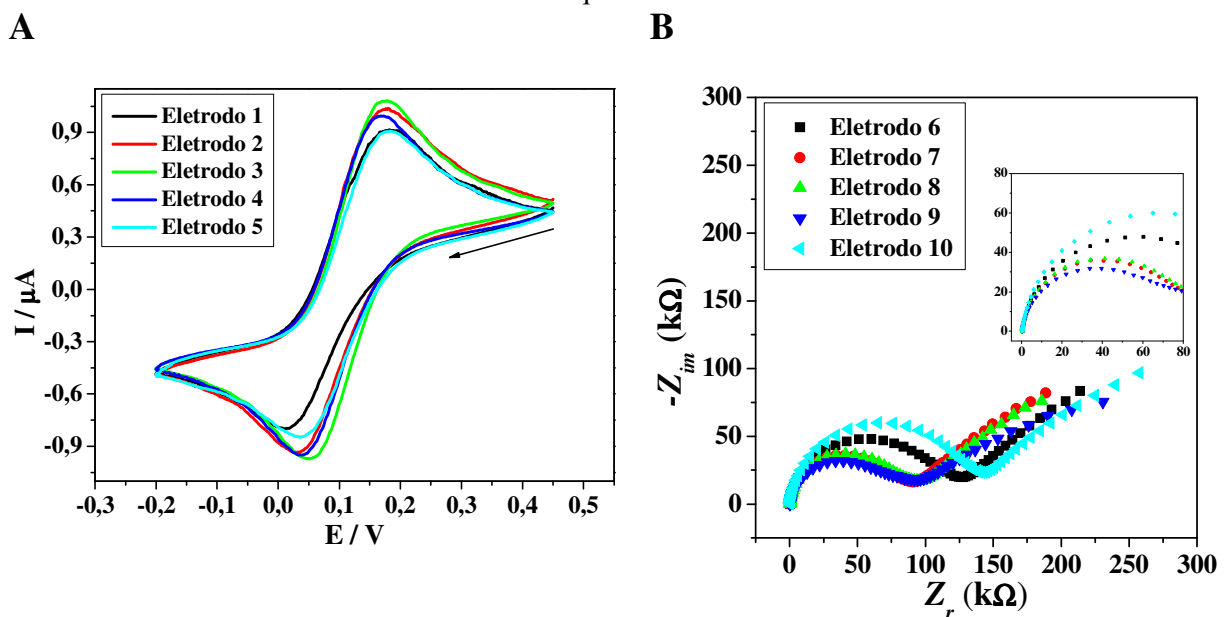
A repetibilidade da resposta de eletrodos impressos novos, limpos somente em etanol obtida frente à VC e EIS foi avaliada. A Figura 35 apresenta os voltamogramas e os diagramas do plano complexo para 5 eletrodos novos e limpos escolhidos aleatoriamente.

O parâmetro utilizado para avaliação da resposta dos eletrodos frente à VC foi a área de pico catódico, ou seja, a área correspondente ao primeiro pico que aparece no sentido em que a varredura foi feita. As medidas foram realizadas com cinco diferentes eletrodos e obteve-se um desvio padrão relativo de 29,16%.

Já na avaliação da repetibilidade da resposta dos eletrodos impressos usando a técnica de EIS, o parâmetro de resposta avaliado foi a resistência de transferência de carga (R_{ct}), cujos valores foram obtidos através dos diagramas de Nyquist em cada um dos experimentos. As medidas foram realizadas com cinco diferentes eletrodos obtendo-se um desvio padrão relativo de 27,81%.

Esses resultados foram preocupantes, pois a repetibilidade é um fator muito importante no desenvolvimento de sensores e os desvios obtidos demonstram que os eletrodos podem exibir respostas consideravelmente diferentes.

Figura 35 – **A** Voltamogramas cíclicos no intervalo de potencial de +0,45 a -0,20 V, $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$ e **B** Diagramas de Nyquist com intervalo de frequência de 50 KHz a 10 mHz e amplitude de 10 mV (rms) de eletrodos impressos sem modificação limpos em etanol ($n = 5$). Inset: Região de altas frequências.



Além disso, os estudos preliminares para limpeza dos eletrodos impressos demonstraram que estes não resistiam a um pré-tratamento ou limpeza mais efetiva que pudesse fornecer maior homogeneidade da superfície dos diferentes eletrodos. Diante dessa impossibilidade e dos resultados obtidos, a utilização destes eletrodos foi questionada.

Constatou-se neste momento que os eletrodos impressos comerciais adquiridos não apresentavam boa qualidade. Os dados deste estudo foram então apresentados à empresa fornecedora dos eletrodos que, por sua vez, admitiu haver problemas com o lote em questão.

Apesar das muitas vantagens já citadas relacionadas aos eletrodos impressos, cabe destacar aqui que eles também apresentam problemas. As diferenças que os eletrodos podem vir a apresentar de lote para lote não pode ser controlada por quem os adquire e assim, caso ocorram, comprometem sua utilização.

Portanto, considerando o tempo restante para realização da dissertação e os recursos à disposição, uma outra metodologia para construção do imunossensor empregando eletrodo de carbono vítreo foi investigada.

4.2 Desenvolvimento de imunossensor impedimétrico para detecção do corante DR1 empregando eletrodo de carbono vítreo

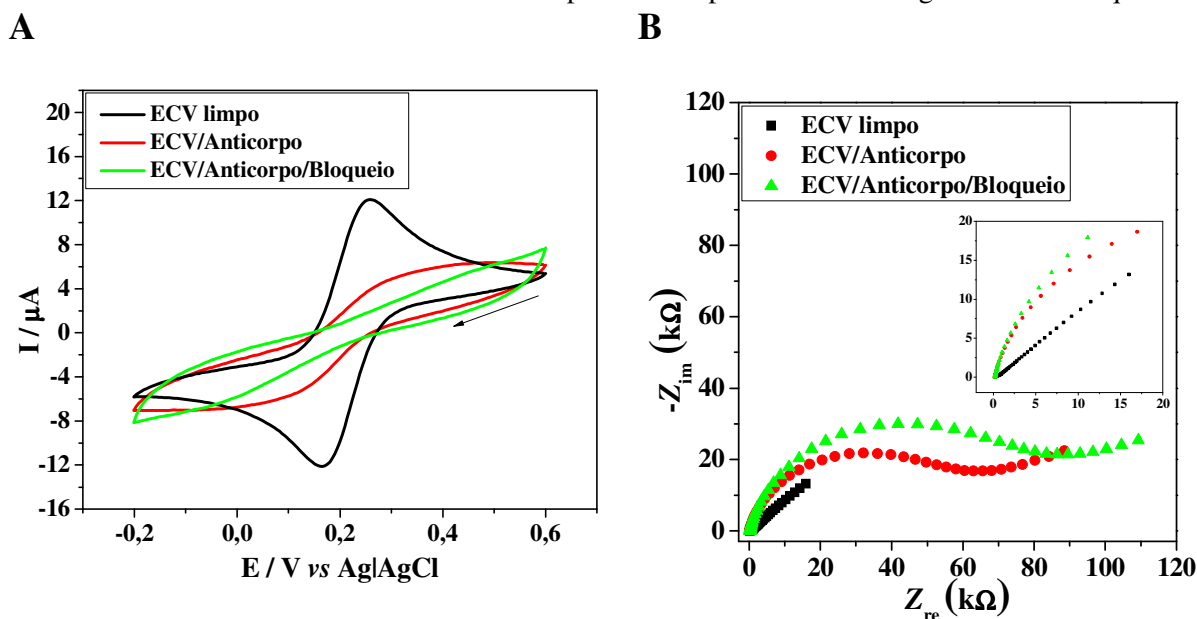
A nova proposta metodológica para construção do imunossensor consistiu em promover uma eletro-oxidação sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo, para desta forma, gerar agrupamentos carboxílicos sobre toda sua extensão. A seguir, estes grupos foram ativados através da solução de EDC/NHS, conforme já demonstrado, com o objetivo de promover o ancoramento das moléculas dos anticorpos monoclonais anti-DR1. Por fim, os agrupamentos ativados remanescentes (que não se ligaram às moléculas de anticorpo), foram bloqueados com solução de etanolamina, seguida da interação com o antígeno (corante DR1) em diversas concentrações. Os resultados abaixo apresentados, detalham o desenvolvimento deste imunossensor.

4.2.1 Estudo da imobilização dos anticorpos monoclonais anti-DR1 sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo e posterior bloqueio dos grupos carboxílicos ativados

A modificação do eletrodo de carbono vítreo foi primeiramente caracterizada por VC e EIS. Os resultados dessas caracterizações foram determinantes na avaliação da viabilidade da metodologia empregada.

Os resultados, que estão apresentados na Figura 36, indicaram a efetiva imobilização dos anticorpos sobre a superfície do eletrodo, bem como a existência de um bloqueio, após a incubação em solução de etanolamina.

Figura 36 - Etapas de modificação empregadas para imobilização dos anticorpos monoclonais anti-DR1 via eletro-oxidação da superfície com ativação dos grupos carboxílicos e bloqueio da superfície do eletrodo de carbono vítreo caracterizadas **A** por VC e **B** por EIS. Inset: Região de altas frequências.



Seguindo o mesmo raciocínio de análise empregado com os eletrodos impressos, podemos ver claramente pela Figura 36A que na VC ocorre uma deformação no perfil de reversibilidade do sistema, com diminuição sucessiva dos picos de oxidação e redução da espécie redox ao fim da etapa de imobilização do anticorpo e do bloqueio com etanolamina. O recobrimento calculado para a etapa de imobilização do anticorpo foi $\theta = 0,65$ e não pôde ser determinado para a etapa de bloqueio, devido ao perfil praticamente sem picos obtido, indicando grande recobrimento. Esse resultado pode ser portanto, atribuído ao efetivo acoplamento das moléculas modificadoras à superfície do eletrodo.

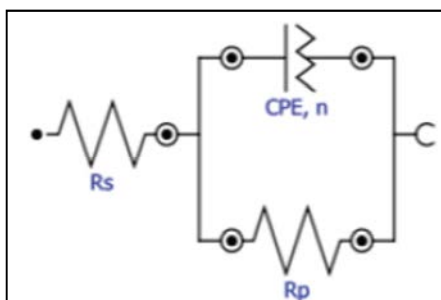
Em relação aos resultados de EIS, ocorreu aumento sucessivo dos valores de R_{ct} ao fim das etapas de modificação. A Tabela 5 apresenta os dados referentes à caracterização das etapas de modificação obtidos através do software Nova.

Tabela 5 - Parâmetros obtidos na caracterização do eletrodo de carbono vítreo por EIS nas diferentes etapas de modificação.

Etapa da Modificação do Eletrodo	R_s (k Ω)	R_{ct} (k Ω)	CPE (μ F)	χ^2	n
Limpo	0,19	0,58	5,67	$1,31 \times 10^{-6}$	0,75
Anticorpo	0,19	58,91	4,54	$7,11 \times 10^{-6}$	0,80
Bloqueio	0,19	81,22	4,26	$1,74 \times 10^{-6}$	0,81

O software utilizado possui uma ferramenta simples para análise de dados de medidas de impedância chamada “electrochemical circle fit”. Essa ferramenta realiza a estimativa dos valores dos parâmetros de interesse a partir do ajuste de determinados pontos de uma porção circular do diagrama de Nyquist (correspondente a uma única constante de tempo) ao circuito equivalente apresentado na Figura 37. Este modelo de circuito equivalente é baseado no trabalho de Boukamp⁷⁰. Todos os estudos empregando EIS realizados deste ponto em diante, foram analisados por este software.

Figura 37 - Circuito equivalente utilizado na ferramenta de análise “electrochemical circle fit”.



Os elementos do circuito são: R_s (Ohm) é utilizado para simular o valor da resistência não compensada (solução), R_p (Ohm) é utilizado para simular o valor da resistência de polarização (referente a resistência de transferência de carga), CPE é o valor do argumento do elemento de fase constante e n é o valor do expoente do elemento de fase constante. O CPE substitui o capacitor no circuito equivalente, e nos casos em que o CPE está em paralelo com R_p para formar um semicírculo “clássico”, o valor da capacitância pode ser determinado, já que corresponde ao valor de CPE na frequência máxima do eixo imaginário⁷³.

O valor de χ^2 (chi-quadrado) apresentado na Tabela 4 é referente ao Teste de Kronig-Kramers (outra ferramenta de análise disponibilizada pelo software). As relações de Kronig-Kramers são propriedades matemáticas que conectam a parte real e a parte imaginária de qualquer função complexa. Estas relações são geralmente utilizadas para relacionar as partes real e imaginária de uma função de transferência complexa (como é o caso da EIS, Z). Este

teste pode ser utilizado para verificar se os dados medidos estão em conformidade com os pressupostos da transformação Kronig-Kramers⁷¹. Estes pressupostos são:

- Causalidade: A resposta está relacionada somente com o sinal de excitação;
- Linearidade: A resposta é linear e a perturbação é pequena;
- Estabilidade: O sistema não muda com o tempo.

Se o sistema sob investigação muda com o tempo, o teste falha. Falha no Teste de Kronig-Kramers significa que não pode ser obtido um bom ajuste usando o método de circuitos equivalentes.

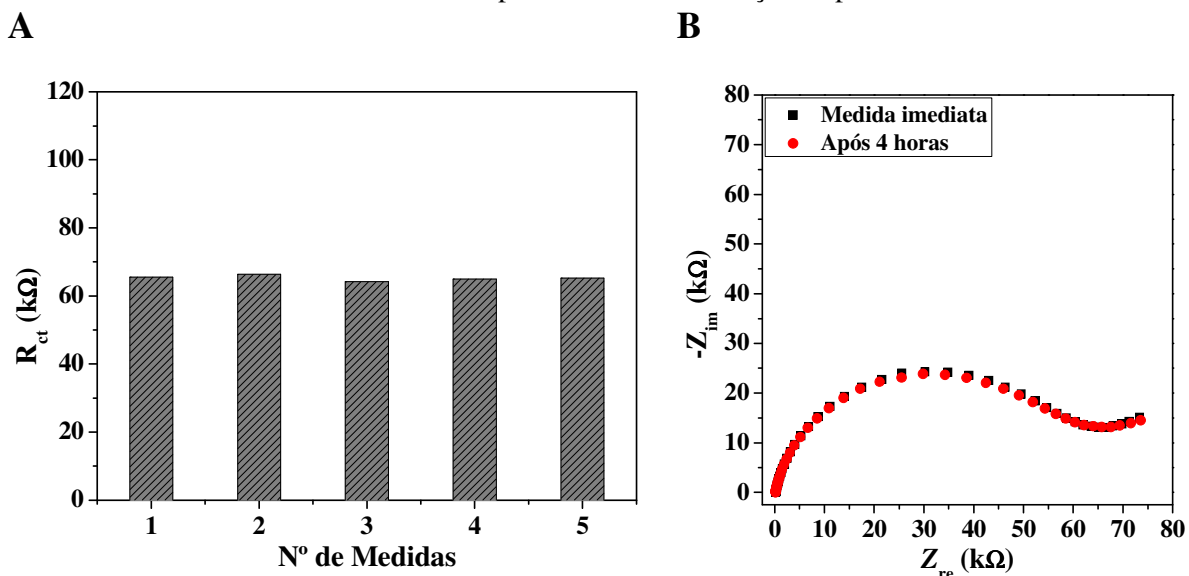
O resultado do teste é o valor do pseudo χ^2 , que é a soma dos quadrados dos resíduos relativos à parte real e imaginária. Valores de χ^2 grandes indicam que a qualidade dos dados é baixa. Valores pequenos, por sua vez, geralmente indicam um bom ajuste. O que diz se o valor obtido pode ser considerado como grande ou pequeno depende do número de pontos e de seus valores. Como regra geral, valores inferiores a 10^{-6} indicam um excelente ajuste, valores entre 10^{-6} e 10^{-5} ajustes bons, valores entre 10^{-5} e 10^{-4} ajustes que estão na margem do aceitável, e valores acima disto indicam ajustes ruins.

Assim sendo, os resultados obtidos nessa caracterização indicam que os dados obtidos estão adequados, já que foram obtidos valores de χ^2 ao redor de 10^{-6} , além de corroborarem os dados de VC, indicando êxito na imobilização do anticorpo e no bloqueio dos agrupamentos carboxílicos ativados.

4.2.2 Estudo da estabilidade do eletrodo contendo anticorpo imobilizado após medidas de EIS sucessivas

Visando verificar se a imobilização do anticorpo era estável após medidas de EIS sucessivas, este estudo foi realizado. Ao todo foram feitas cinco medidas (incluindo a medida imediata) com um processo de enxague entre cada uma delas e incubação por 30 minutos em solução tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,5, ao longo de quatro horas. Os valores de R_{ct} obtidos variaram muito pouco (Figura 38A), apresentando um desvio padrão relativo de apenas 1,23% entre eles. O diagrama de Nyquist obtido imediatamente após o término do processo e ao fim do estudo está apresentado na Figura 38B.

Figura 38 - A. Valores de R_{ct} obtidos em cada medida e **B.** Diagramas de Nyquist referentes à medida realizada ao término do processo de imobilização e após 4 medidas.



A partir da Figura 38B verificou-se que o perfil da medida imediata quando comparado ao da última medida, são muito similares, descartando a possibilidade de haver lixiviação das moléculas com o passar das medidas e dos diversos processos de enxague. Esse resultado é bastante positivo na construção de um sensor pois já que a imobilização do anticorpo sobre o eletrodo de carbono vítreo é bastante estável, possibilita seu uso por diversas horas.

4.2.3 Estudo da adsorção do corante DR1 sobre o eletrodo bloqueado (na ausência de anticorpo anti-DR1)

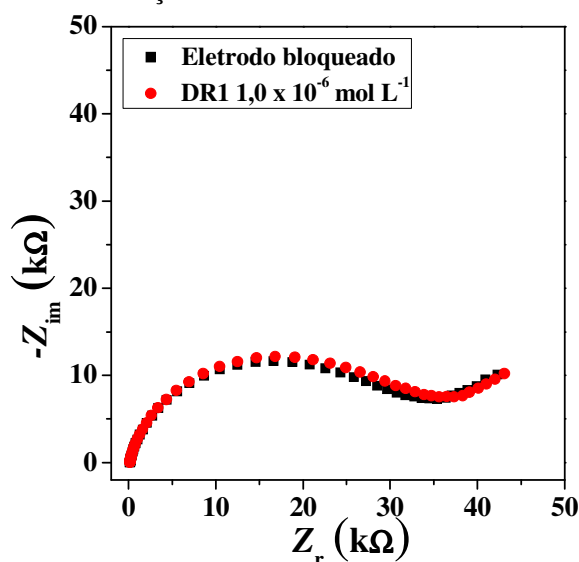
Já foi destacado no texto, que a etapa de bloqueio da superfície do eletrodo modificado é fundamental no desenvolvimento de um imunossensor, e de biossensores de modo geral. Mesmo que a imobilização do anticorpo (ou da biomolécula responsável pelo reconhecimento do analito de interesse) seja bem sucedida, se houverem espaços livres na superfície do eletrodo, a molécula do antígeno (analito) pode se adsorver. Isso ocasiona uma alteração no sinal medido e leva a um falso resultado, já que o sinal de excitação não estará sendo proveniente somente do biorreconhecimento antígeno-anticorpo.

Nesta metodologia, o bloqueio da superfície modificada foi feito com etanolamina. A ideia aqui, é que o grupo amino terminal da molécula de etanolamina se ligue aos grupos carboxílicos ativados remanescentes da etapa de imobilização do anticorpo. Deste modo, o

grupo terminal álcool da molécula fica direcionado para a solução, o que já diminui consideravelmente as chances de uma ligação espontânea de outra molécula através deles.

Assim, neste estudo foi investigada a eficiência desse bloqueio em impedir que o analito (corante DR1) se adsorva sobre a superfície do eletrodo. O estudo foi conduzido na ausência de anticorpo, pois dessa forma a exposição da superfície é bem grande, explorando ao máximo a capacidade deste bloqueio. O eletrodo bloqueado incubou por 30 minutos em solução de DR1 na concentração $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, e após o enxague, foi realizada a medida de EIS. O resultado deste estudo está apresentado na Figura 39.

Figura 39 - Diagramas de Nyquist correspondentes ao eletrodo bloqueado antes e após incubação em solução de DR1 $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.



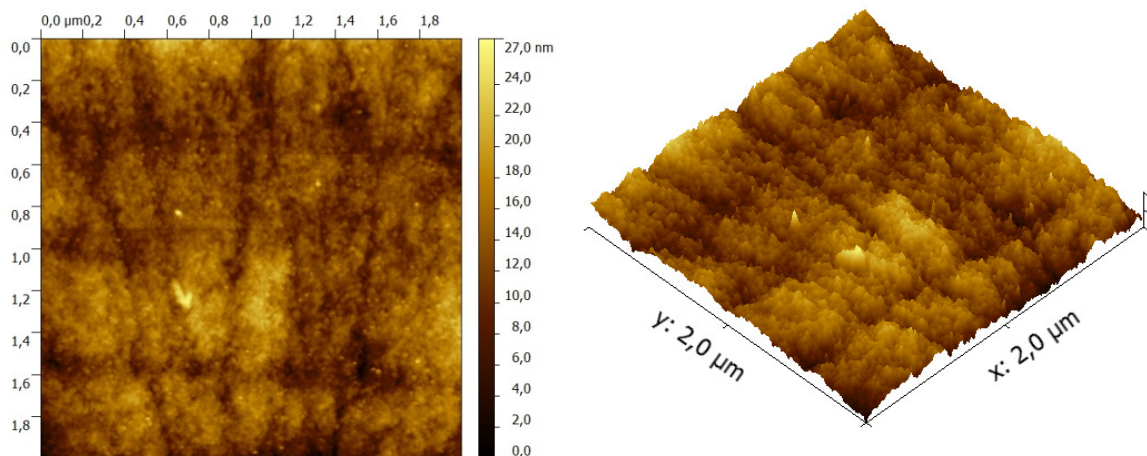
Pode ser verificado que os diagramas de Nyquist obtidos são muito similares, indicando que praticamente não há adsorção do corante DR1 sobre o eletrodo bloqueado. Em termos numéricos, houve o aumento de 1,68 k Ω entre a primeira e a última medida, o que representou uma variação de 5,5%. Esta variação foi considerada aceitável, até porque os anticorpos não estavam presentes. Com a presença dos anticorpos, o acesso do analito à superfície do eletrodo se tornará ainda mais difícil e por isso, deu-se continuidade aos estudos empregando esta metodologia.

4.2.4 Imagens de microscopia de força atômica (AFM) da superfície do eletrodo de carbono vítreo limpo e após a imobilização do anticorpo

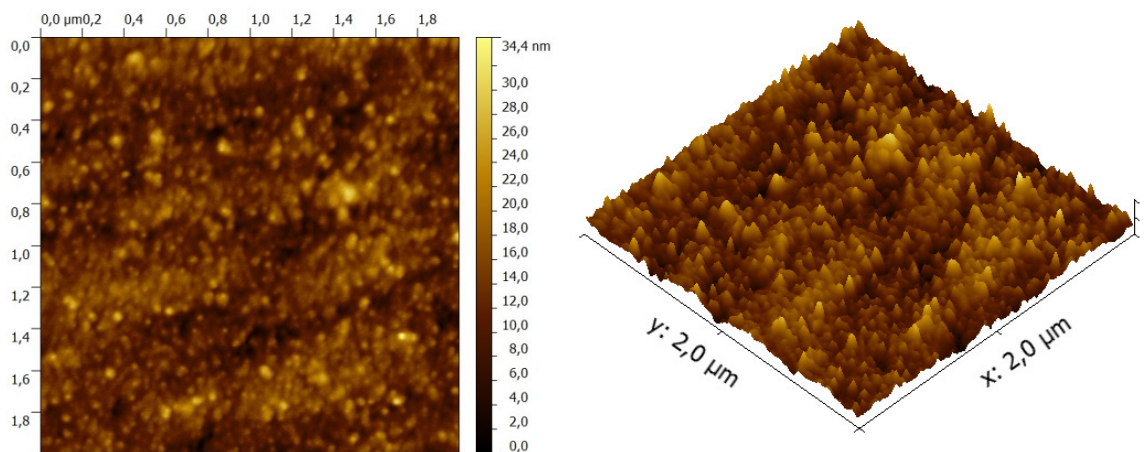
Buscando obter evidências da imobilização do anticorpo sobre a superfície do carbono vítreo que não se fundamentassem unicamente em dados eletroquímicos, foram realizadas imagens topográficas da superfície limpa e após o término do processo de imobilização. Este estudo foi realizado sobre uma de carbono vítreo de dimensões 2 x 2 cm, com 0,5 cm de espessura, ao invés de serem realizados sobre o próprio eletrodo devido à limitações de tamanho do porta-amostra do equipamento de AFM. As imagens de AFM 2D e sua correspondente tridimensional estão apresentadas na Figura 40.

Figura 40 - Imagens de AFM 2D e sua correspondente tridimensional para **A** carbono vítreo limpo e **B** carbono vítreo contendo anticorpo anti-DR1 imobilizado.

A



B



A partir das imagens realizadas verificou-se que a superfície do carbono vítreo limpo possui uma morfologia bastante irregular, podendo-se verificar inclusive a presença de riscos sobre sua extensão. Porém, é possível perceber também que esses defeitos não implicaram em um impedimento significativo para a imobilização do anticorpo, já que a comparação das imagens permite verificar que houve modificação, atribuída à presença de moléculas que não eram presentes anteriormente (anticorpos). Evidencia-se também que a modificação é bem distribuída sobre toda a região analisada.

O fator de rugosidade (r_a) da superfície de carbono vítreo limpa obteve valor de 1,8 e após a imobilização do anticorpo esse valor aumentou para 3,4, o que representa mais uma indicação de que os anticorpos estão presentes sobre o material.

4.2.5 Caracterização da imobilização do anticorpo sobre o eletrodo de carbono vítreo através de infravermelho (FT-IR-ATR)

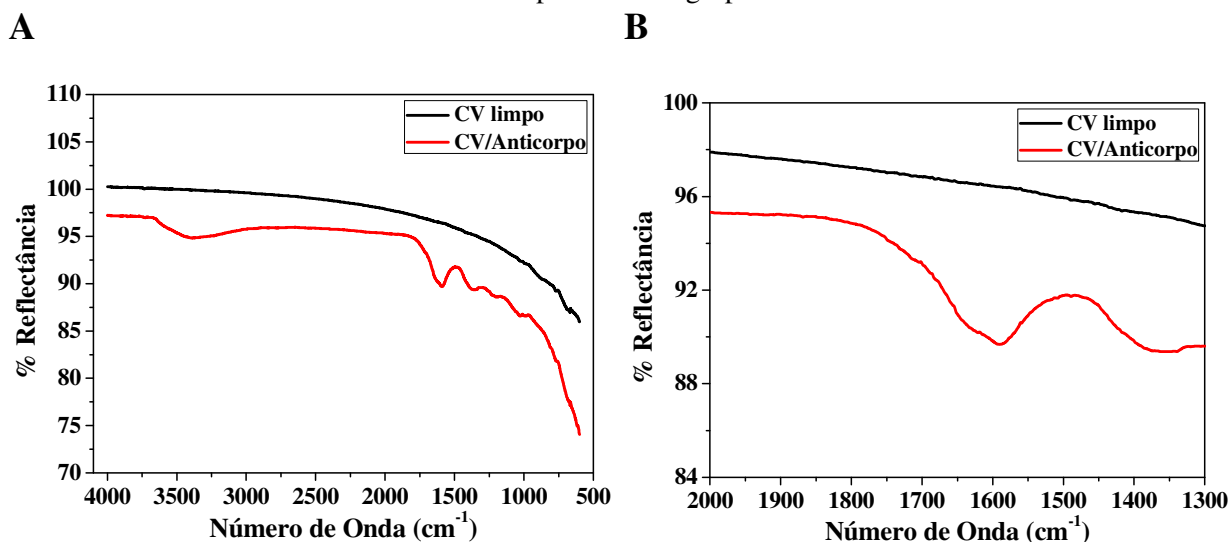
A caracterização eletroquímica (por VC e EIS) e as imagens de AFM indicaram que os anticorpos anti-DR1 provavelmente foram acoplados à superfície do carbono vítreo. No entanto, estas técnicas não nos fornecem informações relacionadas à identidade daquilo que está sobre a superfície. É evidente nestes estudos que algo foi modificado, alterado na superfície após a realização da metodologia descrita, porém não é possível dizer com absoluta certeza que os anticorpos estão sobre o eletrodo. Por isso, foram obtidos os espectros de infravermelho da placa de carbono vítreo limpa e após a imobilização do anticorpo, já que por esta técnica obtemos informações relacionadas aos grupo funcionais das moléculas presentes em determinada amostra. Os espectros obtidos estão apresentados na Figura 41.

Em geral, proteínas (incluindo os anticorpos) e peptídeos apresentam bandas largas, difíceis de serem diferenciadas devido à ocorrência de sobreposição de algumas bandas, por conta do grande número de diferentes amino ácidos que compõem a estrutura complexa de biomoléculas⁷².

O espectro de todas as proteínas exibem entretanto, bandas de absorção características do grupo amida (resultante das ligações peptídicas) e estas bandas são similares às de amidas secundárias comuns. As bandas de infravermelho mais úteis para a caracterização de proteínas são as bandas amida I (referente à absorção da carbonila) e amida II (referente à deformação de NH_2 ou NH)⁶¹, que ocorrem próximos a 1565 e 1655 cm^{-1} , respectivamente.

A exata posição destas bandas dependem da natureza da ligação de hidrogênio que ocorre entre os grupos amino e carboxílico, que é determinada pelo arranjo molecular exibido pela parte da proteína responsável pela banda⁷².

Figura 41 - **A** Espectro de infravermelho referente ao carbono vítreo limpo e ao carbono vítreo que passou pelo processo de imobilização do anticorpo. **B** Destaque da região do espectro referente à banda correspondente ao grupo amida.



Com base nestes pressupostos, a análise dos espectros obtidos neste estudo pôde ser realizada. Primeiramente, foi observado que o carbono vítreo limpo não produziu qualquer característica significativa no espectro. Entretanto, o espectro referente ao carbono vítreo contendo anticorpo imobilizado apresentou uma banda com absorção característica de grupos amida. A banda de absorção em questão, ocorreu em 1580 cm^{-1} , indicativo de amida I. Além disto, esta banda parece estar sobreposta a uma outra banda ao redor de 1640 cm^{-1} (Figura 41B), o que pode indicar a ocorrência também de amida II.

Assim, com base nos resultados obtidos neste estudo entende-se que de fato existe anticorpo sobre a superfície do carbono vítreo.

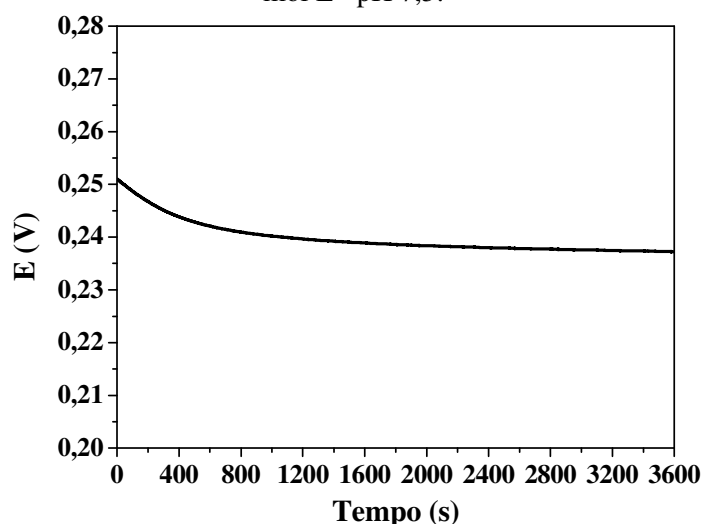
4.2.6 Otimização dos parâmetros experimentais para realização das medidas de EIS

A EIS é uma técnica que trabalha com perturbações de potencial ou corrente pequenas e com os sistemas eletroquímicos no estado de equilíbrio. É bastante importante que as condições das medidas realizadas com esta técnica sejam escolhidas de modo a se adequar aos pressupostos de causalidade, estabilidade e linearidade, já citados. Cada sistema eletroquímico

tem suas características, e por isso, nem sempre os mesmos parâmetros podem ser utilizados da mesma maneira para todos os tipos de sistemas.

O primeiro parâmetro estudado foi o tempo de estabilização de potencial de circuito aberto (E_{OC}). Antes que a medida comece de fato, é fundamental que o potencial de circuito aberto esteja estável, pois caso ele varie com o decorrer da medida, os dados obtidos serão relacionados à diferentes estágios do sistema (como se fossem sistemas diferentes) sob investigação e assim, o pressuposto de estabilidade já não está sendo obedecido. A Figura 42 apresenta o resultado deste estudo.

Figura 42 - Variação do potencial de circuito aberto do eletrodo modificado ao longo de 1 hora. Medida realizada em solução de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em solução tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,5.



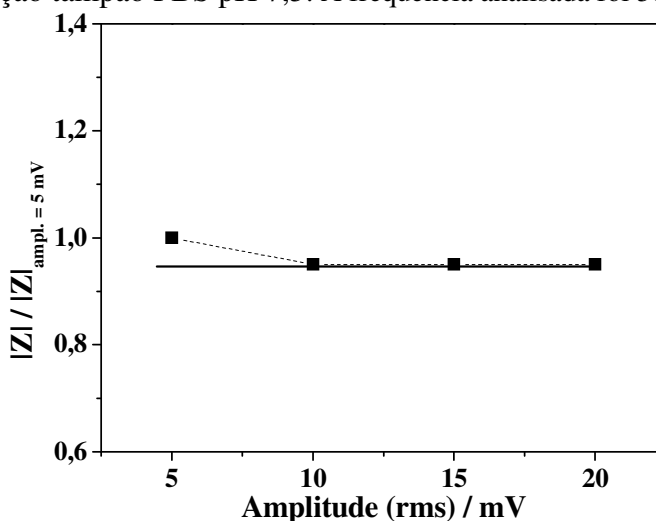
Verificou-se que ao longo de 1 hora, o E_{OC} variou em 13 mV (0,013 V) do momento imediato até o ponto final da medida. É fácil perceber pelo perfil obtido, que não ocorrem variações significativas de potencial neste estudo. Adotou-se portanto, um tempo de estabilização de 120 segundos, já que após este tempo a variação de potencial que ocorre até o término da medida é inferior a 10 mV, e podemos dizer que o potencial está bastante estável.

Outro parâmetro muito importante em uma medida de EIS é a amplitude de perturbação do potencial. A obediência ao princípio da linearidade depende da amplitude da onda senoidal, a qual deve ter um valor tal que esteja compreendido entre o desejo de minimizar uma resposta não-linear, pelo uso de uma pequena amplitude, e minimizar o ruído, pelo uso de uma amplitude grande de perturbação. Portanto, a escolha de uma amplitude apropriada é sempre muito importante para garantir a melhor resposta do sistema em cada frequência aplicada e isso deve ser demonstrado experimentalmente⁷³.

Para avaliar se o sistema está ou não sob o regime de linearidade, realizam-se diversas medidas de impedância aplicando diferentes amplitudes (neste caso, as amplitudes 5, 10, 15 e 20 mV (rms) foram investigados) e mantendo todos os outros parâmetros fixos. Depois disto, os valores do módulo da impedância $|Z|$ são obtidos a partir dos diagramas para uma certa frequência. É possível escolher um ou mais valores de frequência, porém é muito importante examinar a região de baixas frequências, já que é a região mais suscetível à resposta não-linear. Neste estudo foi escolhida a frequência 50 mHz.

Por fim, os valores da razão $|Z|/|Z|$ medidos na frequência escolhida (sendo o denominador obtido em 5 mV (rms)) são plotados *versus* a amplitude (rms). Na Figura 43 temos o gráfico dos valores de $|Z|/|Z|$ *versus* a amplitude para o eletrodo de carbono vítreo modificado. As medidas foram realizadas em solução de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 1×10^{-3} mol L^{-1} preparada em solução tampão PBS pH 7,5.

Figura 43 - Valores da razão de $|Z|/|Z|_{5\text{mV}}$ *versus* amplitude (rms) para o eletrodo de carbono vítreo modificado. Medidas realizadas em solução de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 1×10^{-3} mol L^{-1} preparada em solução tampão PBS pH 7,5. A frequência analisada foi 50 mHz.



Verifica-se claramente pelo gráfico que o sistema não responde linearmente em amplitudes (rms) inferiores a 10 mV na frequência de 50 mHz. Adicionalmente, verificou-se que não há impedimento em se utilizar as amplitudes 10, 15 e 20 neste sistema, pois todas responderam linearmente. Assim, adotou-se a amplitude de 10 mV (rms) como amplitude otimizada, pois foi a amplitude utilizada também nos estudos anteriores à esta otimização.

Outro parâmetro analisado foi o intervalo de frequência. Todas as medidas realizadas até este ponto do projeto, foram realizadas no intervalo de frequência de 50 kHz a 10 mHz, que pode ser considerado um amplo intervalo, abrangendo frequências altas, intermediárias e

baixas. Ou seja, o sistema está sendo perturbado em frequências representativas que permitem visualizar diferentes etapas dos processo eletroquímicos que ocorrem na superfície do eletrodo modificado. Por isso, o intervalo utilizado foi mantido, pois não foi verificada a necessidade de alterações.

Por fim, o número de medidas por década de frequência é o parâmetro relacionado com a quantidade e distribuição das respotas obtidas, em outras palavras, quanto mais medidas por década de frequência forem feitas, mais pontos de resposta obteremos com igual distribuição ao longo de todo o diagrama. Com mais pontos de respostas, menores são as suposições necessárias a respeito da qualidade de um ajuste que pode vir a ser feito. Nas medidas realizadas neste trabalho, o número de medidas por década de frequência escolhido foi de 10, o que fornece uma medida de boa qualidade, com 67 pontos de resposta no total. Não entendendo haver a necessidade de aumentar ou diminuir este número, este parâmetro foi mantido.

4.2.7 Otimização das etapas de construção do imunossensor via planejamento fatorial completo

Neste projeto, o desenvolvimento do imunossensor impedimétrico envolve basicamente a modificação de um eletrodo de carbono vítreo submetendo-o a etapas de incubação em diferentes soluções modificadores (à exceção da etapa de eletro-oxidação, já investigada e caracterizada⁵⁰). Assim, se as melhores condições de concentração e tempo de incubação são estabelecidas, o sinal medido ao final do processo pode ser bastante intensificado, pois o ensaio estará ocorrendo nas condições que mais favorecem a reação de reconhecimento antígeno-anticorpo. Assim, buscando otimizar as condições experimentais, um estudo empregando planejamento fatorial completo de dois níveis e três variáveis (2^3) foi realizado.

As variáveis analisadas foram concentração da solução de anticorpo anti-DR1, tempo de incubação do eletrodo em solução de anticorpo e tempo de incubação em solução de corante DR1. Os valores de variação do valor da resistência de transferência de carga (ΔR_{ct}) entre a etapa de bloqueio e a etapa de interação com o antígeno obtidos em cada experimento foram empregados e, utilizando o software MinitabTM Statistical foi possível identificar os efeitos de cada parâmetro sobre o sistema. A Tabela 6 apresenta as diversas combinações geradas pelo software para realização dos experimentos e os respectivos valores de ΔR_{ct} obtidos.

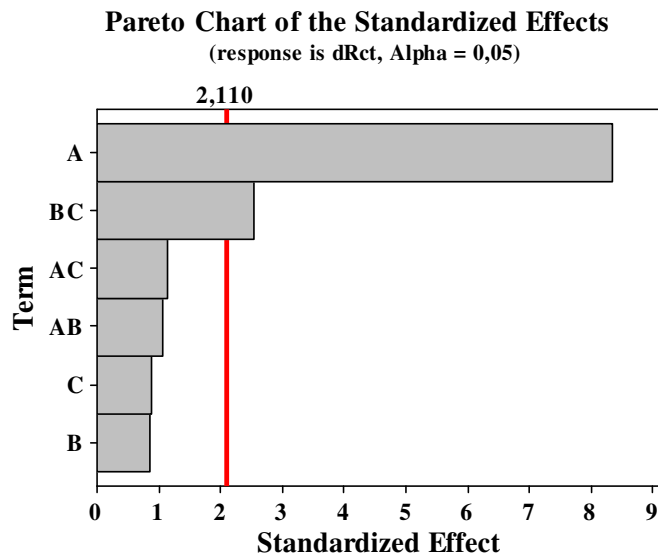
Tabela 6 - Matriz de planejamento fatorial completo com 3 variáveis e dois níveis (2^3). Estudo realizado em triplicata ($n=3$).

Experimento	[Ab] (mg mL ⁻¹)	t _{inc. Ab} (minutos)	t _{inc. DR1} (minutos)	ΔR_{ct} (k Ω)
1	0,005	30	30	20,03
2	0,050	60	30	21,82
3	0,050	30	60	8,56
4	0,005	60	60	8,74
5	0,050	30	30	34,89
6	0,005	60	30	1,75
7	0,005	30	60	1,56
8	0,050	60	60	28,56
9	0,005	30	30	2,55
10	0,050	60	30	29,76
11	0,050	30	60	23,11
12	0,005	60	60	0,1
13	0,050	30	30	24,80
14	0,005	60	30	0,003
15	0,005	30	60	3,60
16	0,050	60	60	29,34
17	0,005	30	30	1,47
18	0,050	60	30	28,70
19	0,050	30	60	20,22
20	0,005	60	60	15,31
21	0,050	30	30	23,21
22	0,005	60	30	0,33
23	0,005	30	60	0,21
24	0,050	60	60	24,07

Observa-se pelo Gráfico de Pareto, na Figura 44, que a concentração da solução de anticorpo anti-DR1 é a variável mais significativa estatisticamente (apresentou valor superior a 2,110), ou seja, é a variável que mais influi na resposta do imunossensor. Outra variável estatisticamente significativa foram os tempos de incubação do anticorpo e do antígeno, quando relacionados. Sozinhos, eles não têm grande efeito, mas dependendo do tempo

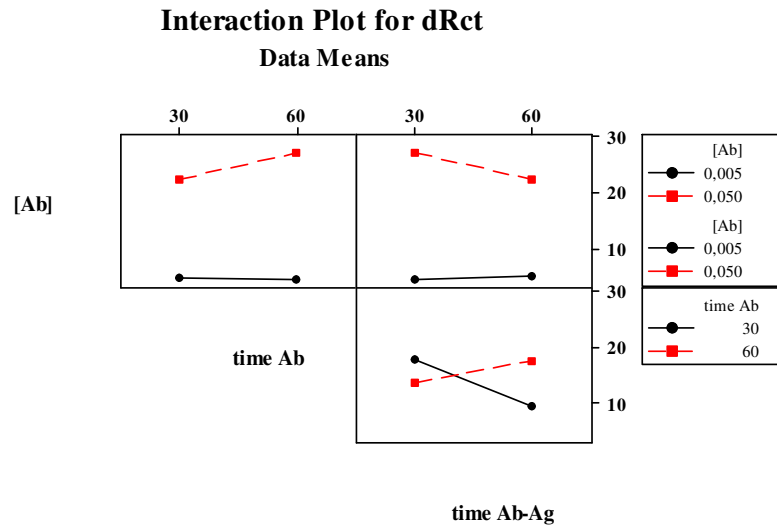
utilizado para incubação em um deles, a resposta do outro é afetada. Isto fica mais fácil de ser compreendido através do Gráfico de Interação.

Figura 44 - Gráfico de Pareto: Influência das condições experimentais na resposta obtida com o imunossensor, sendo A, a concentração da solução de anticorpo; B, o tempo de incubação do anticorpo e C, o tempo de incubação do antígeno.



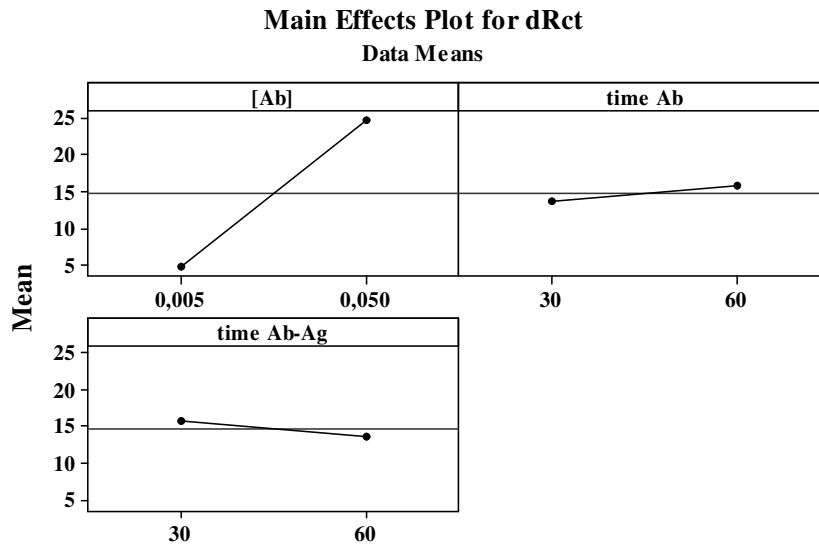
O Gráfico de Interação (Figura 45) permite visualizar o efeito da interação entre duas variáveis na resposta obtida, bem como comparar a força relativa destes efeitos. Se as linhas estão paralelas umas às outras não há interação presente, porém se as linhas não estão paralelas a mudança da resposta média de um nível baixo para um nível alto depende de um segundo fator. Quanto mais distante de uma posição paralela, mais forte é o efeito da interação, no entanto, só as variáveis significativas estatisticamente devem ser consideradas. Assim, vemos claramente pelo gráfico apresentado que os tempos de incubação (estatisticamente significantes aqui) apresentam interação bastante forte na resposta. Em outras palavras, a resposta tende a ser maior quando o nível baixo (30 minutos) para incubação do anticorpo é utilizado, seguido do nível baixo (30 minutos) para a incubação do antígeno.

Figura 45 - Gráfico de Interação: Influência da interação das variáveis de estudo na resposta obtida com o imunossensor.



Trabalhando um pouco mais na análise dos resultados podemos verificar e comparar a força relativa exercida pelas variáveis estudadas individualmente sobre a resposta do imunossensor através do Gráfico dos Efeitos Principais (Figura 46).

Figura 46 - Gráfico dos Efeitos Principais resultante do planejamento fatorial completo 2^3 para otimização das condições experimentais envolvidas no desenvolvimento do imunossensor.

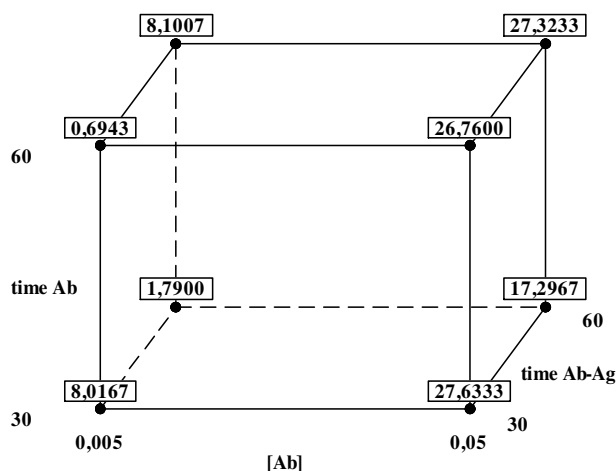


Pode-se interpretar este gráfico da seguinte maneira: se a linha é horizontal (paralela ao eixo x), não existe efeito presente, ou seja, a resposta média não se altera dependendo do nível daquela variável. Porém, se a linha não é horizontal, algum efeito está presente e assim, a resposta média sofre alteração dependendo do nível da variável, sendo que quanto mais

inclinada a linha estiver (quanto maior o coeficiente angular) mais forte é o efeito da alteração naquela variável. Assim, podemos facilmente observar que neste estudo, a concentração do anticorpo é a variável com maior influência sobre a resposta, que tende a ser maior, quando a concentração de anticorpo empregada é a mais alta, $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ (nível alto). É importante ressaltar que somente as variáveis estatisticamente significantes devem ser consideradas aqui.

Outra forma de visualizar a relação entre as variáveis e as respostas obtidas é através do Gráfico de Cubo, apresentado na Figura 47. Em cada vértice do cubo temos os valores das médias das respostas para todas as combinações formadas no planejamento fatorial completo. Assim, fica fácil verificar que o maior ΔR_{ct} registrado acontece quando utiliza-se a concentração da solução de anticorpo empregada é de $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ (nível alto), o tempo de incubação do eletrodo em solução de anticorpo é de 30 minutos (nível baixo) e o tempo de incubação em solução do antígeno é de 30 minutos (nível baixo). Portanto, estas foram as condições adotadas para a construção do imunossensor.

Figura 47 - Gráfico de Cubo: Relação entre a média das respostas obtidas e as variáveis estudadas em cada combinação.



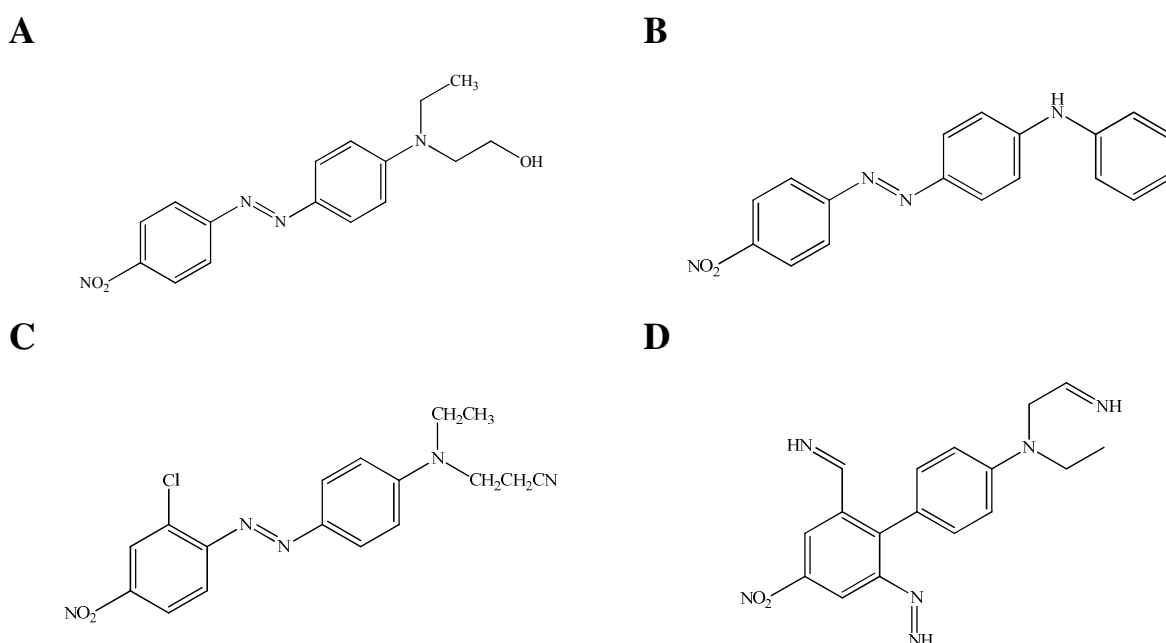
4.2.8 Seletividade da resposta do imunossensor frente a outros corantes dispersos

Buscando investigar a seletividade do anticorpo anti-DR1 frente a outros corantes têxteis, o imunossensor foi construído e, após a etapa de bloqueio, foi incubado individualmente em soluções dos corantes DO1, DR73 e DR78/50 na concentração $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ por 30 minutos, à temperatura ambiente.

Após a incubação nos diferentes corantes, o eletrodo foi cuidadosamente lavado, e o ΔR_{ct} apresentado entre a medida da etapa de bloqueio e a medida após incubação com corante foi determinado em cada caso.

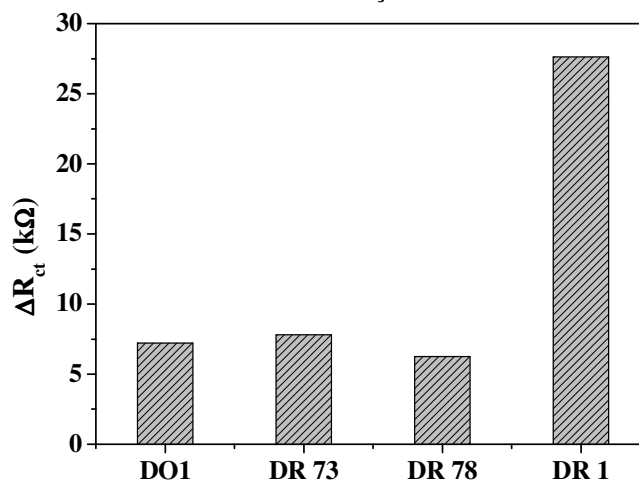
Estes corantes, cujas estruturas estão apresentadas na Figura 48, foram escolhidos, pois são da mesma classe que o DR1, e possuem estruturas e massas moleculares relativamente próximas. Assim, a seletividade do anticorpo foi avaliada com interferentes muito parecidos ao antígeno DR1.

Figura 48 - Estruturas das moléculas dos corantes **A. DR1**, **B. DO1**, **C. DR78/50** e **D. DR73**.



O resultado obtido neste estudo está apresentado na Figura 49. Apesar do valor de ΔR_{ct} observado para o corante DR1 (27,63 k Ω) ser mais de 3 vezes superior ao valor observado para os demais corantes (7,23 k Ω para o DO1; 7,82 k Ω para o DR73 e 6,82 k Ω para o DR 78/50), é inegável a ocorrência de reação cruzada. A reação cruzada não é muito pronunciada, porém se uma amostra contiver uma mistura destes corantes, o sinal observado para o DR1 seja um pouco mais elevado que o verdadeiro. No entanto, considerando que estas moléculas são muito similares, o resultado encontrado também pode ser considerado satisfatório.

Figura 49 - ΔR_{ct} obtido após a incubação do imunossensor em soluções dos corantes DO1, DR73, DR78/50 e DR1 na concentração de $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.



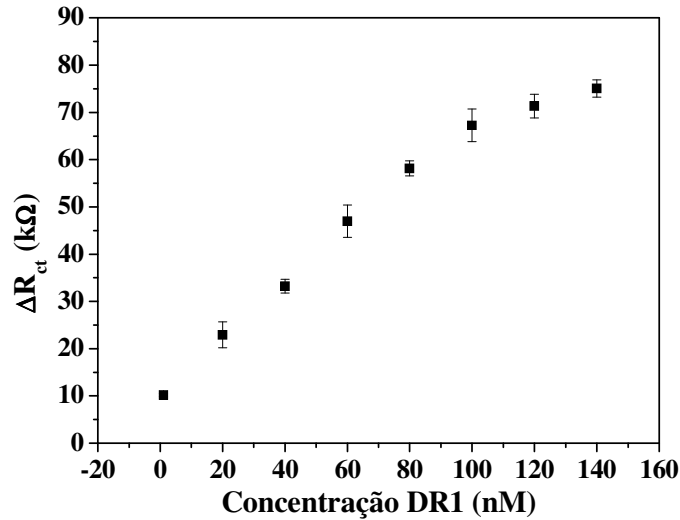
4.2.9 Curvas analíticas do corante DR1

O desempenho do imunossensor foi avaliado a partir da análise da variação do valor de R_{ct} obtidos nas medidas de EIS após a reação de afinidade com diferentes concentrações de corante DR1 em meio de solução de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em solução tampão PBS pH 7,5.

Foi verificado o aumento proporcional de ΔR_{ct} com o aumento da concentração de antígeno, o que é atribuído a um número maior de moléculas de DR1 sendo ligadas aos anticorpos imobilizados, promovendo uma barreira cinética para transferência eletrônica do par redox utilizado como sonda.

Uma curva analítica (Figura 50) foi construída empregando as condições otimizadas, visando verificar a faixa linear de resposta do imunossensor frente ao DR1. Uma relação linear entre ΔR_{ct} e a concentração de antígeno DR1 foi observada no intervalo de 1 a 100 nM (de 1×10^{-9} a $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$), com saturação em concentrações mais elevadas de DR1.

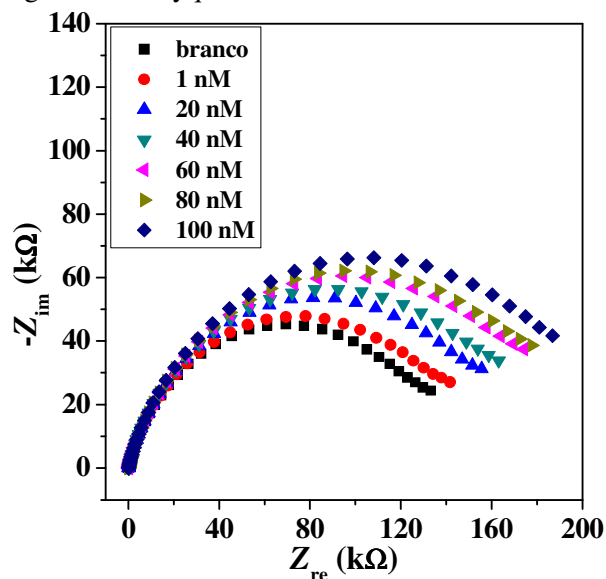
Figura 50 - Gráfico de ΔR_{ct} em função da concentração de DR1 expressa em nanomolar. As barras de erro mostram o desvio padrão obtido a partir da triplicata dos dados dos experimentos.



A regressão linear da curva analítica, $\Delta R_{ct} = 9,61 + 0,59 [DR1]$ no intervalo de 1 a 100 nM, apresentou coeficiente de correlação de 0,9991, limite de detecção de LD = 2,52 nM e limite de quantificação de LQ = 8,40 nM.

Os diagramas de Nyquist (apenas no intervalo útil de concentração) mostram o efeito da concentração de DR1 na resposta medida (Figura 51). Vê-se claramente o aumento da resistência de transferência eletrônica com o aumento da concentração de corante DR1, ou seja, ocorre um aumento sucessivo no impedimento do par redox sofrer transferência eletrônica.

Figura 51 - Diagramas de Nyquist obtidos em diferentes concentrações de DR1.



Assim, tendo como base os resultados apresentados aqui, considerou-se que o imunossensor impedimétrico apresenta bom desempenho na detecção e quantificação do corante DR1, apresentando LD e LQ relativamente baixos, o que o torna viável para análise de amostras de água tratada.

Os desvios padrão relativo das triplicatas registradas para cada concentração de DR1, ficaram todos abaixo de 10%, demonstrando que o imunossensor também apresenta boa repetibilidade.

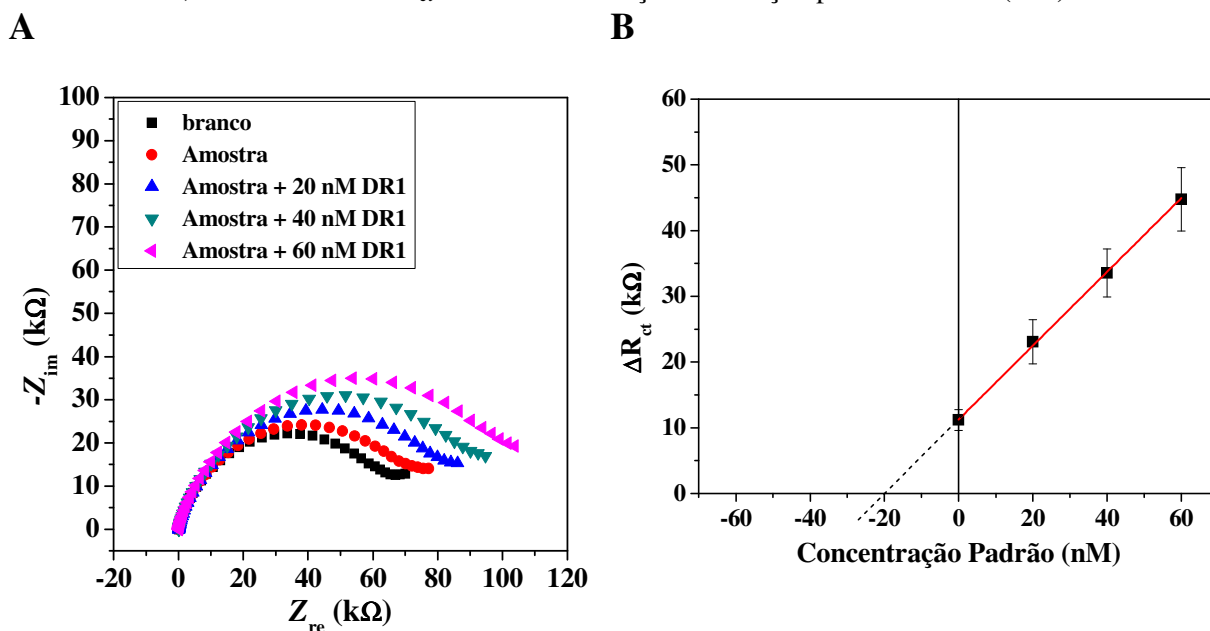
4.2.10 Aplicação do imunossensor em amostra de água – Estudo de recuperação

O desempenho do imunossensor frente a uma amostra de água de torneira foi avaliado. Primeiramente, o experimento foi conduzido com a água de torneira sem qualquer fortificação do analito, pois não sabíamos se porventura, a água de torneira coletada continha corante DR1. A água de torneira foi diluída na proporção 1:5 em solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹, pH 7,5 e as condições experimentais da EIS foram as mesmas empregadas para construção da curva analítica (em meio contendo o par redox Fe(CN)₆^{3-/4-} como sonda).

Não foi verificada variação no valor de R_{ct} obtido entre a medida do eletrodo bloqueado e após a incubação por 30 minutos na amostra, o que indicou não haver DR1 na amostra estudada.

A seguir então, foi realizada fortificação da amostra (água de torneira) na concentração de 20 nM de corante DR1, e medidas de EIS foram realizadas após a incubação na amostra fortificada, e em soluções padrão contendo 20,0; 40,0 e 60,0 nM de DR1, respectivamente. O valor de ΔR_{ct} foi determinado em cada medida e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 52.

Figura 52 - A. Diagramas de Nyquist obtidos após a etapa de bloqueio, incubação em amostra fortificada com 20 nM de DR1 e após adições sucessivas de solução padrão DR1 nas concentrações 20, 40 e 60 nM. **B.** ΔR_{ct} versus concentração de solução padrão de DR1 (n=3).

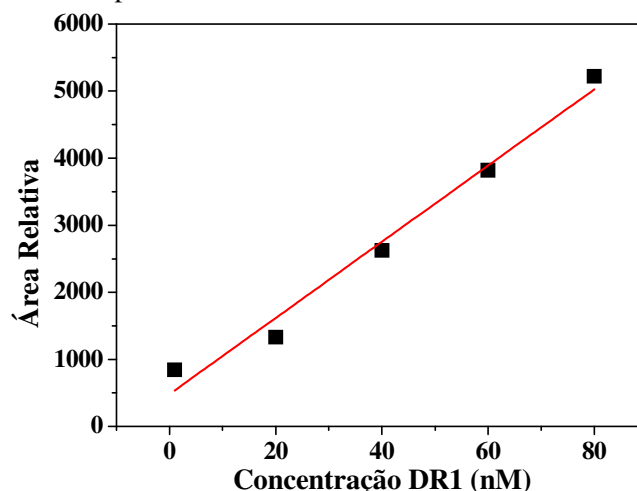


A partir da regressão linear obtida, $\Delta R_{ct} = 11,05 + 0,56 [\text{DR1}]$, foi possível calcular a concentração média recuperada com as triplicatas. O valor encontrado foi de 19,7 nM, o que corresponde a uma recuperação média de 98,7%, demonstrando que o desempenho do imunossensor frente à amostra de água de torneira foi satisfatório.

De modo a apurar se a amostra de água coletada realmente não continha corante DR1, fato que comprometeria a confiabilidade dos resultados encontrados, foram realizadas medidas por HPLC-MS/MS da amostra.

Soluções padrão de corante DR1 foram preparadas pela diluição da solução estoque em ACN:Água na proporção 1:1 até as concentrações desejadas e a banda referente ao DR1 foi monitorada. Uma relação linear foi observada entre a área da banda correspondente ao composto DR1 ($m/z = 315$, tempo de retenção 3,4 minutos) e a concentração de DR1 para as soluções padrão e assim, construiu-se uma curva analítica que compreendeu o intervalo de concentração de DR1 entre 1 e 80 nM (Figura 53).

Figura 53 - Curva analítica para o corante DR1 obtida através de medidas de HPLC-MS/MS.



A regressão linear da curva analítica, $\text{Área} = 480,84 + 56,82 [\text{DR1}]$, apresentou coeficiente de correlação de 0,98, limite de detecção de $\text{LD} = 1,48 \text{ nM}$ e limite de quantificação de $\text{LQ} = 4,92 \text{ nM}$. Mesmo sabendo que não foram realizadas otimizações da metodologia para análise do DR1 por HPLC-MS/MS, não se pode deixar de ressaltar que os limites obtidos com o imunossensor foram comparáveis aos obtidos com HPLC-MS/MS.

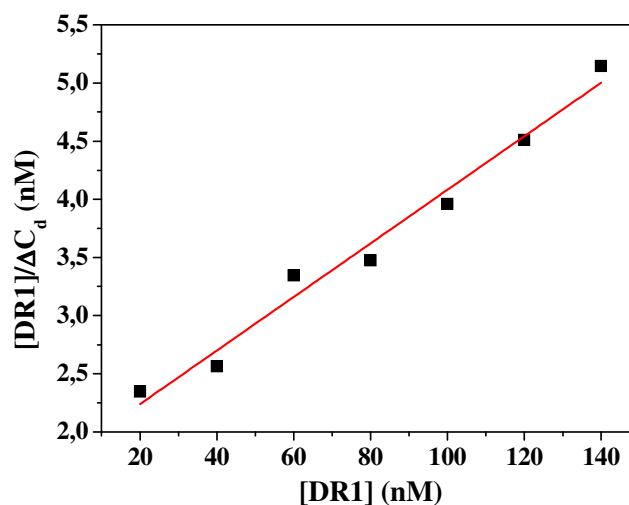
Em seguida, a amostra de água de torneira coletada foi injetada e não foi observada a ocorrência da banda referente ao corante DR1, confirmando que dentro dos limites de detecção destas técnicas, não há a presença do corante DR1 na amostra.

4.2.11 Determinação da constante de dissociação anticorpo-antígeno

As interações antígeno-anticorpo são consideradas bastante fortes, com valores de constante de dissociação relatadas no intervalo de nanomolar a micromolar, de modo que se poderia esperar que a camada de anticorpo na superfície do eletrodo se torne saturada, mesmo com concentrações relativamente baixas de corante DR1 (antígeno). Isto foi verificado experimentalmente pelo platô que pode ser observado na Figura 50, referente à ΔR_{ct} com o aumento da concentração do corante.

Um gráfico de $[\text{DR1}]$ versus a $[\text{DR1}]/\Delta C_d$ foi construído com os dados das triplicatas obtidos para construção da curva analítica, incluindo os pontos de saturação. O resultado referente a uma das curvas está apresentado na Figura 54.

Figura 54 - Gráfico de Hanes-Woolf para determinação da constante de dissociação, K_d .



A partir da regressão linear das curvas, o valor da constante de dissociação, K_d , foi obtido. Ele é determinado a partir da divisão do intercepto pelo coeficiente angular da curva. Assim, o valor de K_d médio encontrado foi de $6,92 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, o que está de acordo com o que se espera para este tipo de interação forte⁶⁵.

5. CONCLUSÃO

A utilização de eletrodos impressos de ouro para o desenvolvimento de imunossensor impedimétrico para detecção do corante têxtil DR1 empregando monocamadas tioladas foi investigado por três diferentes rotas de imobilização dos anticorpos anti-DR1. Nas três rotas, que compreenderam o uso de monocamadas de cistamina, ácido lipóico e p-aminotiofenol, respectivamente, foram realizadas caracterizações por VC e EIS que demonstraram a efetiva imobilização dos anticorpos sobre a superfície dos eletrodos impressos, com aumento sucessivo no valor de resistência de transferência de carga (ΔR_{ct}). No entanto, na rota que empregou monocamada de cistamina foi verificada uma dificuldade na imobilização estável da molécula de proteína A (essencial para imobilização orientada dos anticorpos sobre os eletrodos) e nas rotas que empregaram monocamadas de ácido lipóico e p-aminotiofenol não foi observada uma relação linear entre os valores de ΔR_{ct} e a concentração do antígeno DR1. Estudos visando investigar o efeito do solvente e do próprio corante DR1 sobre o sistema eletroquímico foram conduzidos na tentativa de entender a não observância de comportamento linear, porém os resultados encontrados não apresentaram respostas que fornecessem justificativas para este problema. Por fim foi verificado que os eletrodos

impressos limpos apresentavam comportamentos bastante diferentes de eletrodo para eletrodo, frente à VC e EIS, exibindo um valor de desvio padrão relativo de 29,16% e 27,81%, respectivamente, com cinco replicatas. O problema apresentado por este lote de eletrodos impediu então a continuidade dos estudos por esta estratégia.

Diante disto, uma nova estratégia para construção do imunossensor impedimétrico empregando eletrodo de carbono vítreo foi investigada. Através da eletro-oxidação da superfície do carbono vítreo, visando a geração de grupos carboxílicos, que posteriormente foram ativados com EDC/NHS, o acoplamento dos anticorpos foi realizado. As caracterizações realizadas por VC e EIS demonstraram que a imobilização dos anticorpos anti-DR1 foi bem sucedida, assim como o bloqueio dos grupos carboxílicos ativados remanescentes sobre a superfície do eletrodo. Imagens obtidas por AFM e espectros de IR também confirmaram a imobilização dos anticorpos. Após serem realizadas as otimizações referentes aos parâmetros da EIS e das condições experimentais na construção do imunossensor via planejamento fatorial completo (sendo elas: concentração de anticorpo e tempos de incubação em solução de Ab e de Ag), o desempenho do imunossensor foi avaliado frente às soluções padrões de DR1. Foi obtida uma relação linear entre a ΔR_{ct} e a concentração de DR1 no intervalo de 1 a 100 nM, o que permitiu a construção de uma curva analítica, que apresentou valores de coeficiente de correlação de 0,9991, LD = 2,52 nM e LQ = 8,40 nM. Ensaios preliminares do desempenho do imunossensor frente à uma amostra de água de torneira fortificada com DR1 na concentração de 20,0 nM também foram realizados, onde uma satisfatória recuperação de 98,7% foi encontrada, indicando que o imunossensor desenvolvido é capaz de realizar este tipo de análise. Por fim, a constante de dissociação DR1-anticorpo anti-DR1 foi determinada a partir dos dados de capacitância obtidos nas diferentes concentrações de DR1, e o valor de $6,92 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ foi encontrado, indicando a forte interação existente, típica para uma ligação antígeno-anticorpo.

Assim, levando-se em conta a relativa simplicidade, baixo custo (aproximadamente R\$ 5,00 por modificação) e o desempenho apresentado pelo imunossensor utilizando eletrodo de carbono vítreo, é possível que esta metodologia venha a se tornar uma proposta viável na detecção do corante têxtil DR1, bem como de outros corantes têxteis em amostras de água tratada também. Para tal, ainda é necessária a investigação mais profunda de alguns aspectos, tais como estabilidade de armazenamento do imunossensor após muitos dias de preparo e aplicação do imunossensor em diferentes e diversas amostras de água, com comparação do desempenho frente às técnicas já estabelecidas, como HPLC-MS/MS (com método otimizado).

Além disto, a construção deste imunossensor empregando eletrodos descartáveis de carbono também deve ser alvo de investigação, já que torna a proposta do sensor mais atrativa e viável comercialmente.

Por fim, o trabalho desenvolvido explora ainda a versatilidade dos imunossensores, já que se trata de um trabalho inédito para determinação de corantes têxteis com este tipo de dispositivo.

REFERÊNCIAS

- 1 GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 71-78, 2000.
- 2 CHENGALORYEN, M. D.; DABBS, E. R. The microbial degradation of azo dyes: minireview. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 389-399, 2013.
- 3 ZOLLINGER, H. Synthesis, properties of organic dyes and pigments. In:_____. **Color chemistry**. Nova York: VCH Publishers, 1987. p. 92-102.
- 4 INGAMELLS, W. **Colour for textile: a user's handbook**. Bradford: Society of Dyers and Colourists, 1993. 179 p.
- 5 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA. **Corantes e pigmentos: mercado**. São Paulo, 2012. Disponível em:
<<http://www.abiquim.org.br/comissao/setorial/corantes-pigmentos/especificidade/mercado>>. Acesso em: 15 jul. 2014.
- 6 ZANONI, M. V. B.; CARNEIRO, P. A. O descarte dos corantes têxteis. **Ciência Hoje**, v. 29, p. 61-64, 2001.
- 7 FORGACS, E.; CSERHATI, T.; OROS, G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. **Environment International**, v. 30, p. 953-971, 2004.
- 8 UMBUZEIRO, G. A.; FREEMAN, H.; WARREN, S. H.; KUMMROW, F.; CLAXTON, L. D. Mutagenicity evaluation of the commercial product CI Disperse Blue 291 using different protocols of the Salmonella assay. **Food and Chemical Technology**, v. 43, p. 49-56, 2005.
- 9 OSUGI, M. E.; ZANONI, M. V. B.; CHENTHAMARAKSHAN, C. R.; TACONI, N. R. de; WOLDEMARIAM, G. A.; MANDAL, S. S.; RAJESH, K. Toxicity assessment and degradation of disperse azo dyes by photoelectrocatalytic oxidation on Ti/TiO₂ nanotubular array electrodes. **Journal of Advanced Oxidation Technologies**, v. 11, p. 425-434, 2008.
- 10 KARIYAJJANAVARA, P.; JOGTTAPPAA, N.; NAYAKA, Y. A. Studies on degradation of reactive textile dyes solution by electrochemical method. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, p. 952-961, 2011.
- 11 PHUGARE, S. S.; KALYANI, D. C.; PATIL, A. V.; JADHAV, J. P. Textile dye degradation by bacterial consortium and subsequent toxicological analysis of dye and dye metabolites using cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, p. 713-723, 2011.
- 12 PEREIRA, W. S.; FREIRE, R. S. Ferro zero: uma nova abordagem para o tratamento de águas contaminadas com compostos orgânicos poluentes. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 130-136, 2005.

13 UNITED STATE ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Dyes derived from benzidine and its congeners**. Washington, D.C., 2010. Disponível em: <<http://www.epa.gov/oppt/existingchemicals/pubs/actionplans/DCB%20Action%20Plan06232010.noheader.pdf>>. Acesso em: 14 set. 12.

14 AL-SABTI, K. Chlorotriazine reactive azo red 120 textile dye induces micronuclei in fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 47, p. 149-155, 2000.

15 CHUNG, K. T.; CERNIGLIA, C. E. Mutagenicity of azo-dyes: structure-activity relationships. **Mutation Research**, v. 277, p. 201-220, 1992.

16 MACWANA, S. R.; PUNJ, S.; COOPER, J.; SCHWENK, E.; JOHN, G. H. Identification and isolation of an azoreductase from *Enterococcus faecium*. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 12, p. 43-48, 2010.

17 PRICELIUS, S.; HELD, C.; MURKOVIC, M.; BOZIC, M.; KOKOL, V.; CAVACO-PAULO, A.; GUEBITZ, G. M. Enzymatic reduction of azo and indigoid compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 321-327, 2007.

18 CHEQUER, F. M. D.; ANGELI, J. P. F.; FERRAZ, E. R. A.; TSUBOY, M. S.; MARCARINI, J. C.; MANTOVANI, M. S.; OLIVEIRA, D. P. The azo dyes disperse red 1 and disperse orange 1 increase the micronuclei frequencies in human lymphocytes and in HepG2 cells. **Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 676, p. 83-86, 2009.

19 FERRAZ, E. R. A.; UMBUZEIRO, G. A.; ALMEIDA, G. de; CALOTO-OLIVEIRA, A.; CHEQUER, F. M. D.; ZANONI, V. M. B.; DORTA, D. J.; OLIVEIRA, D. P. Differential toxicity of disperse red 1 and disperse red 13 in the Ames test, HepG2 cytotoxicity assay, and Daphnia acute toxicity test. **Environmental Toxicology**, v. 26, p. 489-497, 2011.

20 HATCH, K. L.; MAIBACH, H. I. Textile dye dermatites: a review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 12, n. 6, p. 1079-1092, 1985.

21 AHUJA, V.; PLATZEK, T.; FINK, H.; SONNENBURG, A.; STAHLMAN, R. Study of the sensitising potential of various textile dyes using a biphasic murine local lymph node assay. **Archives of Toxicology**, v. 84, p. 709-718, 2010.

22 FRIJTERS, C. T. M. J.; VOS, R. H.; SCHEFFER, G.; MULDER, R. Decolorizing and detoxifying textile wastewater, containing both soluble and insoluble dyes, in a full scale combined anaerobic/aerobic system. **Water Research**, v. 40, p. 1249-1257, 2006.

23 BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 357/05. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2005. 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em: 09 jun. 2014.

-
- 24 OLIVEIRA, G. A. R.; FERRAZ, E. R. A.; CHEQUER, F. M. D.; GRANDO, M. D.; ANGELI, J. P. F.; TSUBOY, M. S.; MARCARINI, J. C.; MANTOVANI, M. S.; OSUGI, M. E.; LIZIER, T. M.; ZANONI, M. V. B.; OLIVEIRA, D. P. Chlorination treatment of aqueous samples reduces, but does not eliminate, the mutagenic effect of the azo dyes disperse red 1, disperse red 13 and disperse orange 1. **Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 703 p. 200-208, 2010.
- 25 FERNÁNDEZ, C.; LARRECHI, M. S.; CALLAO, M. P. An analytical overview of process for removing organic dyes from wastewater effluents. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 10, p. 1202-1211, 2010.
- 26 ANDLEEB, S.; ATIQ, N.; PARMAR, A.; ROBSON, G. D.; AHMED, S. An HPLC method development for the assessment of degradation products of anthraquinone dye. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 176, p. 597-604, 2011.
- 27 FANG, G.; WU, Y.; DONG, X.; LIU, C.; HE, S.; WANG, S. Simultaneous determination of banned acid orange dyes and basic orange dyes in food stuffs by liquid chromatography - tandem electrospray ionization mass spectrometry via negative/positive ion switching mode. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 3834-3841, 2013.
- 28 LECH, K.; JAROSZ, M. Novel methodology for the extraction and identification of natural dyestuffs in historical textiles by HPLC-UV-Vis-ESI-MS. Case study: chasubles from the wawel cathedral collection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, p. 3241-3251, 2011.
- 29 ZOU, T.; HE, P.; YASEN, A.; LI, Z. Determination of seven synthetic dyes in animal feeds and meat by high performance liquid chromatography with diode array and tandem mass detector. **Food Chemistry**, v. 138, p. 1742-1748, 2013.
- 30 DOSSI, N.; TONIOLO, R.; PIZZARIELO, A.; SUSMEL, S.; PERENNES, F.; BONTEMPELLI, G. A capillary electrophoresis microsystem for the rapid in-channel amperometric detection of synthetic dyes in food. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 601, p. 1-7, 2007.
- 31 XIANG, C. C.; HU, X. Z.; LI, Y. Q.; SHANG, Y. J.; LIU, Y. Z.; FENG, G.; WANG, J. P. Multi-determination of Para red and Sudan dyes in egg by a broad specific antibody based enzyme linked immunosorbent assay. **Food Control**, v. 22, p. 1770-1775, 2011.
- 32 OPLATOWSKAA, M.; CONNOLLYA, L.; STEVENSONB, P.; STEADC, S.; ELLIOTT, C. T. Development and validation of a fast monoclonal based disequilibrium enzymelinked immunosorbent assay for the detection of triphenylmethane dyes and their metabolites in fish. **Analytica Chimica Acta**, v. 698, p. 51-60, 2011.
- 33 YE, X.; DU, Y.; LU, D.; WANG, C. Fabrication of β -cyclodextrin-coated poly (diallyldimethylammonium chloride)-functionalized graphene composite film modified glassy carbon-rotating disk electrode and its application for simultaneous electrochemical determination colorants of sunset yellow and tartrazine. **Analytica Chimica Acta**, v. 779, p. 22-34, 2013.

-
- 34 ZHANG, Y.; ZHANG, X.; LU, X.; YANG, J.; WU, K. Multi-wall carbon nanotube film based electrochemical sensor for rapid detection of Ponceau 4R and Allura Red. **Food Chemistry**, v. 122, p. 909-913, 2010.
- 35 ZHAO, J.; ZHANG, Y.; WU, K.; CHEN, J.; ZHOU, Y. Electrochemical sensor for hazardous food colourant quinoline yellow based on carbon nanotube-modified electrode. **Food Chemistry**, v. 128, p. 569-572, 2011.
- 36 ROUHANI, S. Novel electrochemical sensor for sunset yellow based on a platinum wirecoated electrode. **Analytical Letters**, v. 42, n. 1, p. 141-153, 2009.
- 37 YAMANAKA, H.; ALEGRET, S.; PIVIDORI, M. I.; FERREIRA, A. A. P. **Biossensores eletroquímicos**. São Paulo: Letra Boreal, 2009. 104 p.
- 38 MEDYANTSEVA, E. P.; KHALDEEVA, E. V.; BUDNIKOV, G. K. Immunosensors in biology and medicine: analytical capabilities, problems and prospects. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 56, n. 10, p. 886-900, 2001.
- 39 LUPPA, P. B.; SOKOLL, L. J.; CHAN, D. W. Immunosensors - principles and applications to clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 314, p. 1-26, 2001.
- 40 BILLAH, M.; HAYS, W. C. W.; HODGES, C. S.; PONNAMBALAM, S.; VOHRA, R.; MILNER, P. A. Mixed self-assembled monolayer (mSAM) based impedimetric immunosensors for cardiac troponin I (cTnI) and soluble lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (sLOX-1). **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 173, p. 361-366, 2012.
- 41 ZHANG, L.; WANG, M.; HU, X.; WANG, G. Label-free impedimetric immunosensor for sensitive detection of 2,4-dichlorophenoxybutyric acid (2,4-DB) in soybean. **Talanta**, v. 101, p. 226-232, 2012.
- 42 BACHER, G.; PAL, S.; KANUNGO, L.; BHAND, S. A label-free silver wire based impedimetric immunosensor for detection of aflatoxin M1 in milk. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 168, p. 223-230, 2012.
- 43 ANSARI, A. A.; KAUSHIK, A.; SOLANKI, P. R.; MALHOTRA, B. D. Nanostructured zinc oxide platform for mycotoxin detection. **Bioelectrochemistry**, v. 77, p. 75-81, 2010.
- 44 MOCCELINI, S. K.; FERNANDES, S. C.; VIEIRA, I. C. Bean sprout peroxidase biosensor based on l-cysteine self-assembled monolayer for the determination of dopamine. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 133, p. 364-369, 2008.
- 45 ARYA, S. K.; SOLANKI, P. R.; DATTA, M.; MALHOTRA, B. D. Recent advances in self-assembled monolayer and its application to surface plasmon resonance immunosensor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 678-682, 2004.
- 46 ASAV, E.; AKYILMAZ, E. Preparation and optimization of a bienzymic biosensor based on self-assembled monolayer modified gold electrode for alcohol and glucose detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 1014-1018, 2010.

-
- 47 LIU, J.; DONG, S. Grafting of diaminoalkane on glassy carbon surface and its functionalization. **Electrochemistry Communications**, v. 2, p. 707-712, 2000.
- 48 TANG, M.; CHEN, S.; YUAN, R.; CHAI, Y.; GAO, F.; XIE, Y. Amperometric biosensor for hydrogen peroxide based on direct electrocatalysis by hemoglobin immobilized on gold nanoparticles/1,6- diaminohexane modified glassy carbon electrode. **Analytical Sciences**, v. 24, p. 487-491, 2008.
- 49 RAJ, M. A.; JOHN, S. A. Fabrication of electrochemically reduced graphene oxide films on glassy carbon electrode by self-assembly method and their electrocatalytic application. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 117, p. 4326-4335, 2013.
- 50 MILLAN, K. M.; MIKKELSEN, S. R. Sequence-selective biosensor for DNA based on electroactive hybridization indicators. **Analytical Chemistry**, v. 65, p. 2317-2323, 1993.
- 51 HERMANDON, G. T. Zero-length cross-linkers. In: _____. **Bioconjugate techniques**. San Diego: Academic Press, 1996. cap. 3, p. 169-173.
- 52 BARSOUKOV, E.; MacDONALD, J. R. **Impedance spectroscopy**: theory, experiment and applications. 2nd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2005. 616 p.
- 53 ORAZEM, M. E.; TRIBOLLET, D. **Electrochemical impedance spectroscopy**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2008. 518 p.
- 54 GIROTTO, E. M.; DE PAOLLI, M. -A. Transporte de massa em polímeros intrinsecamente condutores: importância, técnicas e modelos teóricos. **Química Nova**, v. 22, n. 3, p. 358-368, 1999.
- 55 DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 970-979, 2004.
- 56 FERREIRA, A. A. P.; FUGIVARA, C. S.; BARROZO, S.; SUEGAMA, P. H.; YAMANAKA, H.; BENEDETTI, A. V. Electrochemical and spectroscopic characterization of screen-printed gold-based electrodes modified with self-assembled monolayers and Tc-85 protein. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 634, n. 2, p. 111-122, 2009.
- 57 FERREIRA, A. A. P.; ALVES, M. J. M.; BARROZO, S.; YAMANAKA, H.; BENEDETTI, A. V. Optimization of incubation time of protein Tc85 in the construction of biosensor: is the EIS a good tool? **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 643, n. 1/2, p. 1-8, 2010.
- 58 HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; WEST, D. M. T. Voltametria. In: _____. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo: Thomson, 2005. cap. 23, p. 627-666.
- 59 BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. Potential sweep methods. In: _____. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2001. cap. 6, p. 226-260.

-
- 60 ZANETTE, S. I. **Introdução à microscopia de força atômica**. São Paulo: Livraria da Física, 2010. p. 112.
- 61 SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Espectrometria no infravermelho. In:_____. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006. cap. 2, p. 70-76.
- 62 XIAO, F.; ZHANG, N.; GU, H.; QIAN, M.; BAI, J.; ZHANG, W.; JIN, L. A monoclonal antibody-based immunosensor for detection of Sudan I using electrochemical impedance spectroscopy. **Talanta**, v. 84, p. 204-211, 2011.
- 63 ULIANA, C. V. **Estudos da lesão ao DNA por corantes têxteis e da capacidade protetora de flavonoides empregando biossensor eletroquímico**. 2013. 150 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.
- 64 ELLISON, S. L. R.; BARWICK, V. J.; FARRANT, T. J. D. Designing effective experiments. In:_____. **Practical statistics for the analytical scientist: a bench guide**. Cambridge: The Royal Chemistry Society, 2009. cap. 8, p. 114-143.
- 65 HUANG, Y.; BELL, M. C.; SUNI, I. I. Impedance biosensor for peanut protein Ara h 1. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 9157-9161, 2008.
- 66 FISCHER, L. M.; TENJE, M.; HEISKANEN, A. R.; MASUDA, N.; CASTILLO, J.; BENTIEN, A.; EMNEUS, J.; JAKOBSEN, M. H.; BOISEN, A. Gold cleaning methods for electrochemical detection applications. **Microelectronic Engineering**, v. 86, p. 1282-1285, 2009.
- 67 NOH, M. F. M.; TOTHILL, I. E. Development and characterization of disposable gold electrodes, and their use for lead(II) analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 386, p. 2095-2106, 2006.
- 68 YAM, C. M.; PRADIER, C. M; SALMAIN, M.; MARCUS, P.; JAOUEN, G. Binding of biotin to gold surfaces functionalized by self-assembled monolayers of cystamine and cysteamine: combined FTI-RRAS and XPS characterization. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 235, p. 183-189, 2001.
- 69 FOGUEL, M. V. **Desenvolvimento de imunossensores para aflatoxina B₁**. 2000. 93 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.
- 70 BOUKAMP, B. A. A nonlinear least squares fit procedures for analysis of immitance data of electrochemical systems. **Solid State Ionics**, v. 20, p. 31-44, 1986.
- 71 BOUKAMP, B. A.; MacDONALD, J. R. Alternatives to Kronig-Kramers transformation and testing, and estimation of distributions. **Solid State Ionics**, v. 74, p. 85-101, 1994.

72 SOCRATES, G. Biological molecules - macromolecules. In:_____. **Infrared and Raman characteristic group frequencies**. 3rd ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2001. cap. 23, p. 328-340.

73 FERREIRA, A. A. P.; FUGIVARA, C. S.; YAMANAKA, H.; BENEDETTI, A. V. Preparation and characterization of immunosensors for disease diagnosis. In:_____. **Biosensors for health, environment and biosecurity**. Rijeka: Intech Open Access Publisher, 2011. cap. 8, p. 183-214.