

RAPHAEL MAZZINE BARBOSA DE OLIVEIRA

DESENVOLVIMENTO DE SUPERFÍCIES NANOESTRUTURADAS CAPACITIVAS E
ELETROQUIMICAMENTE ATIVAS PARA APLICAÇÕES EM DIAGNÓSTICO CLÍNICO

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

Orientador: Professor Dr. Paulo Roberto Bueno
Coorientador: Dr. Flávio Cesar Bedatty Fernandes

Araraquara

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

O48d Oliveira, Raphael Mazzine Barbosa de
Desenvolvimento de superfícies nanoestruturadas capacitivas e eletroquimicamente ativas para aplicações em diagnóstico clínico / Raphael Mazzine Barbosa de Oliveira. – Araraquara : [s.n.], 2018
71 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Paulo Roberto Bueno
Coorientador: Flávio Cesar Bedatty Fernandes

1. Biossensores. 2. Eletroquímica. 3. Espectroscopia de impedância. 4. Grafeno. 5. Filmes finos. I. Título.

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "DESENVOLVIMENTO DE SUPERFÍCIES NANOESTRUTURADAS CAPACITIVAS E ELETROQUIMICAMENTE ATIVAS PARA APLICAÇÕES EM DIAGNÓSTICO CLÍNICO"

AUTOR: RAPHAEL MAZZINE BARBOSA DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: PAULO ROBERTO BUENO

COORDENADOR: FLÁVIO CESAR BEDATTY FERNANDES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. PAULO ROBERTO BUENO

Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof^a. Dr^a. HIDEKO YAMANAKA

Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof^a. Dr^a. MARINA RIBEIRO BATISTUTI

Departamento de Física e Química / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - Ribeirão Preto

Araraquara, 21 de agosto de 2018

Dados Curriculares

Nome: Raphael Mazzine Barbosa de Oliveira

Formação acadêmica:

2016 – Atual

Mestrado em Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
UNESP, Araraquara, Brasil.

Título: desenvolvimento de superfícies nanoestruturadas
capacitivas e eletroquimicamente ativas para aplicações em
diagnóstico clínico

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno

Coorientador: Dr. Flávio Cesar Bedatty Fernandes

Bolsista CAPES

2011 – 2015

Bacharel em Nanotecnologia

Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro,
Brasil.

Período de graduação sanduíche CAPES pelo Ciências Sem
Fronteiras (2014-2015) na Universidade de Limerick, Irlanda.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a minha família e pelo suporte e incentivo incondicional dado em todos os momentos.

Ao meu Orientador Professor Dr. Paulo Roberto Bueno pela compreensão e oportunidade.

Ao meu coorientador Dr. Flávio Cesar Bedatty Fernandes por toda ajuda conferida tanto na construção e lapidação do presente trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, Dr. Adriano dos Santos, Beatriz Garrote, Elielma de Araújo, Fernanda Bernardo, Dra. Juliana Andrade, Juliana Cachetto, Matheus Orloski, Melany Nicholson, Neshmi Salgues, Sandra Corzo, Rute Lopes e Dr. Tiago Azevedo por todo apoio e amizade.

A UNESP e todo seu corpo docente, direção, administração e associados que fazem jus a sua posição de melhor curso de pós-graduação em Química no Brasil.

A CAPES pelo provimento da bolsa durante todo o período do Mestrado.

E a todos que fizeram direta ou indiretamente parte da minha formação acadêmica, o meu muito obrigado.

RESUMO

Desde a primeira descrição de biossensor reportada por Clark e Lyons em 1962, houve um extenso trabalho no desenvolvimento e aprimoramento de novas técnicas de biossensoriamento para detecção de biomarcadores com relevância médica. Destaca-se nesse processo o estudo de superfície de eletrodos, pois esse influencia diretamente em aspectos como; sensibilidade, estabilidade e qualidade do sinal. Portanto, este projeto consiste em avaliar comparativamente três superfícies de eletrodos baseadas em nanoestruturas contendo nanopartículas de azul da Prússia, funcionando com sonda redox do sistema, e materiais carbonáceos (como óxido de grafeno e nanotubos de carbono) para aplicação em biossensores. Foram avaliados aspectos como composição, características capacitivas redox e estabilidade de sinal. A técnica de análise utilizada é a espectroscopia de capacitância eletroquímica (ECE) que apresenta vantagens como não usar amplificadores de sinal (sondas redox) em solução, configuração esta, importante para métodos de diagnóstico *point-of-care*. Das superfícies analisadas, a composta por nanopartículas de azul da Prússia e óxido de grafeno (PBNP+GO) apresentou os melhores parâmetros de estabilidade e compatibilidade com os aspectos teóricos da técnica de ECE, sendo então selecionada para realização de testes de biossensoriamento que, através da funcionalização da superfície com anticorpos Anti-IL-6, detectaram seletivamente a presença do biomarcador IL-6.

Palavras-chave: Biossensor eletroquímico, Biossensor Capacitivo, Grafeno, Azul da Prússia, Espectroscopia de Capacitância Eletroquímica.

ABSTRACT

Since the first description of biosensor reported by Clark and Lyons in 1962, numerous works related to the development and enhancement of novel medical biosensing techniques have been published. In that context, it must be highlighted the study of electrode surfaces as it has direct influence in aspects like; sensitivity, stability and signal quality. Therefore, this project aims to evaluate three electrode surfaces based on nanostructures with Prussian blue nanoparticles, as redox probe, and carbonaceous materials (like graphene oxide and carbon nanotubes) and their application in biosensors. It was evaluated aspects like composition, redox capacitive characteristics and signal stability. The electrochemical capacitance spectroscopy technique (ECE) was used as it offers several advantages like no need of signal amplifiers (redox probes) in solution and, then, making this technique more adequate for point-of-care diagnosis. Among the analysed surfaces, the one composed by Prussian blue nanoparticles and graphene oxide (PBNP+GO) was identified as the best surface in terms of stability and compatibility to the theoretical aspects of ECE. Therefore, that structure was selected to further biosensing essays, by functionalizing the surface with Anti-IL-6 antibodies, that indicated the selective detection of the IL-6 biomarker.

Keywords: Electrochemical Biosensor, Capacitive Biosensor, Graphene, Prussian Blue, Electrochemical Capacitance Spectroscopy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Estrutura do biossensor, sua funcionalização e detecção da molécula alvo e suas respectivas alterações nos valores de capacitância eletroquímica. Nesta sequência de figuras vemos que a aproximação de moléculas aos centros redox (nanopartículas de azul da Prússia) causa interferências na densidade de estados das nanopartículas (representado ilustrativamente na figura pela mudança de cor dos quadrados que representam as nanopartículas de azul da Prússia para tons mais claros). Essa alteração da densidade de estados é traduzida para menores valores de capacitância eletroquímica observada nos gráficos abaixo. O biossensoriamento ocorre, portanto, pelo acoplamento das moléculas alvo aos seus respectivos anticorpos o que causa diminuição do sinal capacitivo mensurado ($C_1 > C_2 > C_3$) [10].17
- Figura 2** Estrutura geral de um anticorpo explicitando suas principais regiões.19
- Figura 3** Circuito equivalente de Randles e suas respectivas associações com características do gráfico de Nyquist de impedância.24
- Figura 4** Exemplo de um circuito equivalente de Randles para monocamadas com sondas redox em solução, *RSOL* é a resistência na solução, *RCT* é a resistência da transferência de cargas, *CDL* é a capacitância de dupla camada.25
- Figura 5** Circuito similar ao de Randles, proposto por Bueno et al para descrever superfícies com sonda redox confinadas na superfície. Em azul, o componente não faradaico, correspondente aos elementos de circuito não relacionados a transferência de elétrons – capacitância da monocamada (*Cm*), resistência não compensada (*Ru*) e capacitância não compensada (*Cu*) – e componente faradaico, com componentes relacionados a fenômenos que envolvem transferência de carga – resistência de transferência de carga (*RCT*) e capacitância redox (*Cr*). Também se considera a resistência da solução (*RSOL*).26
- Figura 6** Representação do composto de azul da Prússia e sua respectiva estrutura cristalina. Figuras obtidas da referência [37].31
- Figura 7** Voltamograma cíclico de uma superfície de azul da Prússia em eletrodo de vidro de ITO. Nota-se dois pares de picos redox, sendo o primeiro referente a oxidação e formação de superfície composta por azul da Prússia e na sua respectiva redução há a formação do branco da Prússia. Em potenciais mais elevados, há um segundo pico de oxidação referente a transformação da superfície de azul da Prússia para verde de Berílio. Figura baseada da referência [38].32

Figura 8 Esquema ilustrativo da imobilização de anticorpos sobre moléculas de óxido de grafeno. As moléculas de EDC e NHS alteram hidroxilas de grupos carboxílicos do óxido de grafeno favorecendo a formação de ligação peptídica com o grupo amino do anticorpo. O tamanho do anticorpo é meramente ilustrativo, sendo em realidade, muito maior do que demonstrado na figura.37

Figura 9 Gráfico de voltametria cíclica da superfície funcionalizada com monocamada de 11-ferroceno em solução de perclorato de tetrabutilamônio 0,02 M (proporção acetonitrila e água 20:80), taxa de varredura de 0,1 mVs-1, faixa de potencial de 0V a 0,7V e eletrodo de referência de Ag|AgCl (KCl 3M). Percebe-se picos do potencial máximo de redução (Pr) e potencial máximo de oxidação (Po). A média destes potenciais resulta no potencial formal da superfície eletroativa que também é o potencial do nível de Fermi do sistema.38

Figura 10 Gráfico mostrando medição de ECE da superfície de azul da Prússia com óxido de grafeno em eletrólito de KCl 0,1M realizadas no potencial formal. Neste caso é possível observar claramente a capacitância redox do sistema (Cr) que é intimamente relacionado ao número de estados eletrônicos disponíveis na superfície.40

Figura 11 Fluxograma de trabalho mostrando os procedimentos básicos realizados para obtenção de dados de espectroscopia de capacitância eletroquímica (ECE) de eletrodos funcionalizados. Onde a representa o contra eletrodo de platina e b representa o eletrodo de referência de Ag|AgCl.41

Figura 12 Fluxograma para produção do compósito molecular (NL) constituído de óxido de nanotubos de grafeno, PDDA e óxido de grafeno.43

Figura 13 Etapas da produção da superfície RNL+PBNP+NL. (1) – Depósito da camada de nanocompósito (NL). (2) – Redução eletroquímica da camada de nanocompósito. (3) – Adição da camada de azul da Prússia. (4) – Depósito de outra camada de nanocompósito.44

Figura 14 (a) e (b) Voltametria cíclica feita nas superfícies de ECV (linha vermelha), NL (linha laranja), RNL (linha oliva) e RNL+PBNP+NL (linha verde) na faixa de potencial de -0,2V até 0,6V, taxa de varredura de 100 mVs-1 e PBS pH 7,4 como eletrólito suporte. Verifica-se potenciais de oxidação e redução bem definidos na superfície contendo as moléculas de azul da Prússia, podendo ser relacionado ao acesso de sua densidade de estados eletrônicos.45

Figura 15 Gráfico de Nyquist de capacitância para medições com ECV (pontos pretos), NL (pontos vermelhos), RNL (triângulos verdes), e RNL+PBNP+NL após sua formação (triângulos verdes), após uma lavagem (1W, quadrados azuis escuros) e após duas lavagens (2W, quadriláteros cinzas). Medidas realizadas em PBS pH 7,4 como eletrólito suporte, potencial fixado em 0,176V e faixa de frequência de 1MHz até 30mHz. No canto superior direito, amplificação do gráfico para menores valores de capacitância. Nota-se que mesmo em baixas frequências não foi observado o ponto da capacitância redox, tal situação não permite a aplicação da teoria de capacitância redox.46

Figura 16 Etapas da produção da superfície RGO+PBNP+GO. (1) – Depósito da camada de óxido de grafeno (GO). (2) – Redução eletroquímica da camada de óxido de grafeno (RGO).

(3) – Adição da camada de azul da Prússia. (4) – Depósito de nova camada de óxido de grafeno.....47

Figura 17 (a) Gráfico dos experimentos de voltametria cíclica realizados nas superfícies de ECV (linha preta), GO (linha vermelha), RGO (linha verde) e RGO+PBNP+GO (linha vermelha escura) em PBS pH 7,4 como eletrólito suporte, faixa de potencial de -0,4V até 0,8V (para RGO+PBNP+GO) e -0,2V até 0,4V (demais superfícies) e taxa de varredura de 100 mV s⁻¹. Foi constatado o aumento da densidade de corrente já esperado na redução do GO e o aparecimento de potenciais definidos de oxidação e redução na superfície de RGO+PBNP+GO dos quais são relacionadas as moléculas de azul da Prússia do sistema. (b) Gráfico de Nyquist de capacitância para as superfícies compostas de ECV (pontos pretos), GO (pontos vermelhos), RGO (triângulos verdes), RGO+PBNP+GO (triângulos vinhos) e após repetidos ciclos de imersão (1W, triângulos verdes escuros). Experimento realizado com PBS pH 7,4 como eletrólito suporte, potencial fixado em 0,14V e faixa de frequência de 1MHz até 30mHz. Nota-se a não definição do ponto de capacitância redox do sistema e instabilidade do sinal em 1W.....48

Figura 18 Etapas da produção da superfície PBNP+GO. (1) – Depósito da camada de azul da Prússia (PBNP). (2) – Depósito da camada de óxido de grafeno (GO).....49

Figura 19 (a) Voltamograma cíclico da superfície de ECV (linha preta) e PBNP+GO (linha vermelha) onde é mostrado picos de redução e oxidação muito bem definidos. (b) Gráfico de Nyquist de capacitância para a superfície de ECV (pontos pretos), PBNP+GO após sua produção (pontos vermelhos) e após incubação (1W, triângulos verdes). Nota-se neste gráfico a grande estabilidade pós-incubação e a definição do ponto de relaxação faradaica, importante para a aplicação da teoria da capacitância redox em sistemas eletroativos. Todos os experimentos foram realizados em meio de KCl 0.1M, na voltametria cíclica, taxa de varredura de 100mV/s e faixa de potencial de -0,2 V até 0,6 V. Na ECE, o potencial foi fixado em 0,186 V e faixa de frequência de 1 MHz até 50 mHz.50

Figura 20 *Comparação da redução percentual da componente real do sinal capacitivo, em frequência fixa, após incubação com eletrólito suporte. Verifica-se a estabilidade do sistema CGE+PBNP+GO diante das outras superfícies analisadas.*51

Figura 21 Comparação da redução percentual da componente imaginária do sinal capacitivo, em frequência fixa, após incubação com eletrólito de suporte das nanoestruturas produzidas. A superfície composta por CGE+PBNP+GO mostra-se a mais estável e, portanto, adequada para a utilização em posteriores estudos analíticos.52

Figura 22 Caracterização por MEV com aumento de 100.000 vezes (A) de uma superfície de eletrodo de carbono vítreo. Verifica-se uma superfície sem presença de partículas, conforme o esperado para uma superfície não funcionalizada. (B) Superfície de eletrodo de carbono vítreo que foi mergulhada por 15 minutos em uma solução 1 mM de azul da

Prússia. Neste caso é possível verificar diversas partículas com dimensões nanométricas, indicando assim, a formação de agregados de nanopartículas de azul da Prússia.....	56
Figura 23 Dispersão do tamanho das nanopartículas de azul da Prússia obtidos por experimento de microscopia eletrônica de varredura e análise por imagem. A média de tamanho das nanopartículas foi 23 nanômetros, ordem de grandeza verificada em outros experimentos [51,52,53]. Para medição e contagem das nanopartículas foi utilizado o software ImageJ com espaço amostral de 170 nanopartículas.	56
Figura 24 Espectro de EDS da superfície funcionalizada com nanopartículas de azul da Prússia, percebe-se claramente picos referentes a átomos de ferro que estão presentes nas nanopartículas.	57

Figura 25 Voltamogramas cíclicos de diferentes tempos de imersão com soluções de azul da Prússia. Nota-se que em tempos maiores há maiores densidades de correntes, mas, também há uma maior distância entre os picos de oxidação e redução.	58
--	----

Figura 26 (a) Experimento de voltametria cíclica e (b) espectroscopia de capacitância eletroquímica nas superfícies de PBNP+GO e PBNP+GO mais PBNP+GO+AIL-6 respectivamente. Todos os experimentos utilizaram KCl 0,1M como eletrólito suporte. Na VC a taxa de varredura utilizada foi 100mVs-1 e faixa de potencial varrido de -0,2 V até 0,6 V. Na ECE, o potencial foi fixado em 0,186 V e faixa de frequência varrida de 1 MHz até 50 mHz.....	60
--	----

Figura 27 (a) Resposta de capacitância em função das concentrações do antígeno alvo IL-6 e (b) respectiva curva analítica. Experimento realizado em KCl 0,1 M como eletrólito suporte, potencial fixado em 0,188V e faixa de frequência varrida de 1 MHz até 50 mHz.	61
--	----

Figura 28 (a) Resposta de capacitância da superfície de PBNP+GO+Anti-IL-6 contra concentrações do controle negativo (fetuína) – teste realizado com eletrodos testados anteriormente contra concentrações de IL-6 - e (b) respectiva comparação da resposta contra IL-6. Experimento realizado em KCl 0,1M como eletrólito suporte, potencial fixado em 0,182V e faixa de frequência de 1 MHz até 50 mHz.	62
---	----

Figura 29 (a) Resposta de capacitância da superfície de PBNP+GO+Anti-IL-6 contra concentrações do controle negativo (fetuína) – neste caso testado diretamente contra concentrações de fetuína - e (b) respectiva comparação da resposta contra IL-6. Experimento realizado em KCl 0,1M como eletrólito suporte, potencial fixado em 0,182V e faixa de frequência de 1 MHz até 50 mHz.	63
--	----

Figura 30 (a) Resposta de capacitância da superfície de PBNP+GO+Anti-HER2 contra concentrações do controle negativo (fetuína) e (b) respectiva comparação da resposta contra Anti-IL6- vs IL-6. Experimento realizado em KCl 0,1M como eletrólito suporte, potencial fixado em 0,182V e faixa de frequência de 1 MHz até 50 mHz.	63
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Parâmetros eletroquímicos gerais de uma superfície de 11-ferroceno e da superfície de RNL+PBNP+NL. Verifica-se que a distância entre os potenciais de oxidação e redução ΔE_{C-A} é muito menor na superfície de 11-Fcc, isso pode indicar maior caráter de irreversibilidade na reação redox do RNL+PBNP+NL.....	46
Tabela 2 Parâmetros eletroquímicos gerais de uma superfície de 11-ferroceno e da superfície de RGO+PBNP+GO. A distância entre os potenciais de oxidação e redução ΔE_{C-A} é cerca de 10 vezes maior na superfície de RGO+PBNP+GO, podendo ser indicativo de instabilidade da superfície pela não reversibilidade do processo redox.	48
Tabela 3 Parâmetros eletroquímicos gerais de superfícies produzidas a partir de 11-ferroceno e da superfície de PBNP+GO. Nota-se a que a distância entre os potenciais de oxidação e redução (ΔE_{C-A}) é similar em ambos os casos, demonstrando assim, que a superfície de PBNP+GO tem boa reversibilidade no processo redox.	50
Tabela 4 Valores de ajuste de curva dos componentes real e imaginário da curva de impedância organizados em termos qualitativos para a avaliação das superfícies eletroativas. Quanto menor valor a curva apresentar, mais próximo ao modelo ideal o sistema se encontra. Valores de referência obtidos do manual do software NOVA 1.11.2, Metrohm Autolab, Holanda.....	53
Tabela 5 Resultado dos valores de curva para cada superfície analisada. Verifica-se que a única superfície que apresenta valores compatíveis ao teste de Kramers-Kronig é a superfície PBNP+GO. Todas as outras estruturas tiveram resultados insatisfatórios.	53
Tabela 6 Relação dos tempos de imersão com parâmetros eletroquímicos da superfície: jpc – pico de corrente catódica; jpa – pico de corrente anódica; ΔE – diferença entre picos de corrente anódico e catódico; Pc/Pa – razão entre pico de corrente catódico e anódico.....	59
Tabela 7 Medidas de variação de sinal capacitivo ($\Delta C''$) de alvos ou superfícies inócuas (variação de sinal não relacionada a fenômenos de detecção) e de detecção (da superfície de anti-IL-6 contra seu respectivo antígeno). Para medidas inócuas: Média = 1,41%, desvio padrão = 0,76%, número de amostras 27. Para medidas de detecção: Média = 8%, desvio padrão = 2,04%, número de amostras 8.	64

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

11-Fcc - 11-ferrocenil-undecatiol

AIL-6 – Anticorpo contra Interleucina-6

Anti-HER2 - Anticorpo contra o antígeno HER2

Anti-IL-6 - Anticorpo contra o antígeno Interleucina-6

BSA – Albumina Bovina Sérica

C_{DL} - Capacitância de dupla camada

C_m - Capacitância da monocamada

C_u - Capacitância não compensada

Cr – Capacitância Redox

E_{eq} - Potencial de equilíbrio redox

E^0 - potencial padrão da célula

ECE – Espectroscopia de Capacitância Eletroquímica

ECV – Eletrodo de Carbono Vítreo

EDC – N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida

EIE – Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

F - Constante de Faraday

f - fração de ocupação

Fab - Fragmento de união ao antígeno

Fc - Fragmento cristalizável

GO – Óxido de Grafeno

IL-6 – Interleucina-6

k_{ET} - Taxa de transferência de elétrons

NHS – N-Hidroxisuccinimida

NL – Nanocompósito formado por nanotubos de carbono e grafeno

PBNP – Nanopartículas de Azul da Prússia

PBNP+ GO - Superfície formada por uma camada de nanopartículas de azul da Prússia e Óxido de Grafeno

PBS – Tampão Fosfato-Salino

R - Constante universal dos gases

R_{CT} - Resistência de transferência a cargas

R_{SOL} - Resistência da solução

R_u - Resistência não compensada

RGO – Óxido de Grafeno Reduzido

VC – Voltametria Cíclica

W - Elemento de Warburg

Z - Impedância

ρ - Resistividade da solução

SUMÁRIO

1 – Introdução	15
1.1 – Biossensores	18
1.2 – Técnicas eletroquímicas	20
1.2.1 – Voltametria Cíclica:	20
1.2.2 – Espectroscopia de Impedância Eletroquímica	22
1.2.3 – Espectroscopia de Capacitância Eletroquímica.....	26
1.3 – Engenharia de superfície em biossensores eletroquímicos	29
1.4 – Azul da Prússia.....	31
2 – Objetivos	35
3 – Materiais e métodos.....	36
3.1 – Materiais.....	36
3.2 – Metodologia	36
4 – Resultados e discussão	42
4.1 – Construção e avaliação de superfícies com atividade eletroquímica	42
4.1.1 - Superfície 1 - Eletrodo de Carbono Vítreo + Nanocompósito de Nanotubo e Grafeno + Nanopartículas de Azul da Prússia (ECV+RNL+PBNP+NL)	42
4.1.2 - Superfície 2 - Eletrodo de Carbono Vítreo + Óxido de Grafeno + Nanopartículas de Azul da Prússia (ECV+RGO+PBNP+GO):	47
4.1.3 - Superfície 3 - Eletrodo de Carbono Vítreo + Óxido de Grafeno + Nanopartículas de Azul da Prússia (ECV+PBNP+GO):	49
4.2 – Comparação da estabilidade das superfícies estudadas	51
4.3 – Definição da superfície eletroativa para ensaios de biossensoriamento	53
4.4 - Estudo da superfície de ECV+PBNP+GO e Biossensoriamento	54
4.4.1 - Caracterização morfológica por MEV e composição por EDS	55
4.4.2 - Tempo de imersão com Azul da Prússia	57
4.5 - Funcionalização da superfície com anticorpo.....	59
4.6 – Desempenho analítico da superfície receptiva PBNP+GO+Anti-IL-6:.....	60
5. Conclusões	66
Referências.....	67

1 – Introdução

O atual crescimento populacional aliado ao aumento da expectativa de vida está mudando a composição demográfica da população drasticamente. O número de pessoas com mais de 60 anos dobrou nas últimas quatro décadas e é estimado que em 2050 esse número chegue a 2 bilhões de pessoas [1]. O aumento populacional nesta faixa etária faz aumentar o número de doenças relacionadas ao envelhecimento como câncer, doenças cardiovasculares e degenerativas, e o tratamento de tais casos depende de novos métodos e dispositivos de diagnósticos rápidos e precisos [1]. Também podemos destacar a importância de tais dispositivos e metodologias em locais com precária infraestrutura médica e no desenvolvimento de novos fármacos [2], salienta-se que todos casos almejam aspectos como rapidez, confiabilidade e baixo custo.

Essa necessidade tem reflexos no mercado de dispositivos médicos, segundo dados da Global Market Insights (2015) é estimado que em 2024 as tecnologias de biossensoriamento atinjam a cifra de 29,6 bilhões de dólares mundialmente. Mais especificadamente, biossensores para diagnóstico médico com característica *point-of-care* representam 47% do total do mercado de biossensores.

Atualmente contamos com uma ampla gama de ensaios para o diagnóstico médico, podemos citar como exemplos o sequenciamento genético e a eletroforese de proteínas e ácidos nucleicos. No entanto, devemos destacar o ELISA (do inglês enzyme-linked immunosorbent assay) como uma das metodologias mais utilizadas e eficientes para o diagnóstico médico. O ELISA funciona como uma técnica de diagnóstico molecular, da qual usa a detecção e quantificação de marcadores biológicos (geralmente proteínas e enzimas) para o prognóstico e diagnóstico de determinadas doenças. Apesar de apresentar boa reprodutibilidade e sensibilidade, a técnica apresenta diversos aspectos negativos e que limitam o uso do diagnóstico molecular em maior extensão. Dentre esses aspectos, considerando os protocolos mais comumente utilizados em laboratórios clínicos, podemos citar a necessidade de mão de obra altamente especializada, de infraestrutura laboratorial com equipamentos de alto custo e de ser um procedimento laborioso. Adicionalmente, tal metodologia apresenta limitações técnicas como a necessidade da derivatização do analito em amostras que apresentem coloração intrínseca, como por exemplo, sangue e urina [3].

Diante desses desafios as metodologias de biossensoriamento baseadas em técnicas eletroquímicas mostram-se eficientes, pois apresentam aspectos como baixo custo,

sensibilidade elevada, rapidez, alto rendimento, portabilidade (permitindo testes *point-of-care*) e outros [4].

Dentre as técnicas de medida eletroquímica, as mais utilizadas são as que utilizam medidas voltamétricas [5], amperométricas [6] e as de resposta em frequência, das quais podemos citar a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e, recentemente, a espectroscopia de capacitância derivada da impedância eletroquímica (ECE) [7]. Essas duas últimas apresentam características de grande interesse, por exemplo, propiciar análises menos deletérias, rápidas e de alta sensibilidade [8].

Todavia, a EIE depende de grande quantidade de sondas redox (atuando como amplificadoras de sinal) no eletrólito de suporte utilizado nas medições, representando assim, uma desvantagem da metodologia em aplicações *point-of-care* (pois há necessidade de manipulação da amostra para o cumprimento deste requisito). Neste aspecto, a técnica de ECE mostra-se vantajosa, pois as sondas redox estão incluídas na própria estrutura do biossensor, sendo assim, não há necessidade da presença de nenhum amplificador de sinal na solução avaliada [7].

Tendo-se em mente as vantagens da técnica de ECE, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de uma superfície eletroativa que possa ser utilizada na detecção de marcadores de interesse clínico. Para tanto, é necessário o desenvolvimento de superfícies que tenham moléculas eletroquimicamente ativas confinadas à superfície do eletrodo e que essas possam ser funcionalizadas com elementos de reconhecimento biológico (por exemplo, anticorpos) [9].

Diversas superfícies foram criadas utilizando moléculas com atividade redox, por exemplo, azul da Prússia ou elevada densidade de corrente como o óxido de grafeno reduzido em conjunto com materiais compatíveis para o acoplamento com a elemento de reconhecimento biológico. A atividade eletroquímica de cada superfície foi verificada em sua compatibilidade com os requerimentos teóricos da metodologia de ECE assim como a sua estabilidade para a aplicação em biossensores.

Em seguida, a superfície com melhores parâmetros analíticos foi testada para detecção do biomarcador molecular IL-6 (relacionado a processos inflamatórios) utilizando a técnica de ECE cujo princípio de detecção é ilustrado na Figura 1. Para tanto, foi necessário funcionalizar a superfície com anticorpo respectivo (Anti-IL-6) e realizar ensaios para a confirmação da detecção seletiva do alvo testado. Ressalta-se que o biomarcador testado tem relativamente baixo peso molecular (26 kDa) se comparado com o anticorpo

(aproximadamente 150 kDa), portanto sendo de difícil detecção por técnicas convencionais de sensoriamento eletroquímico.

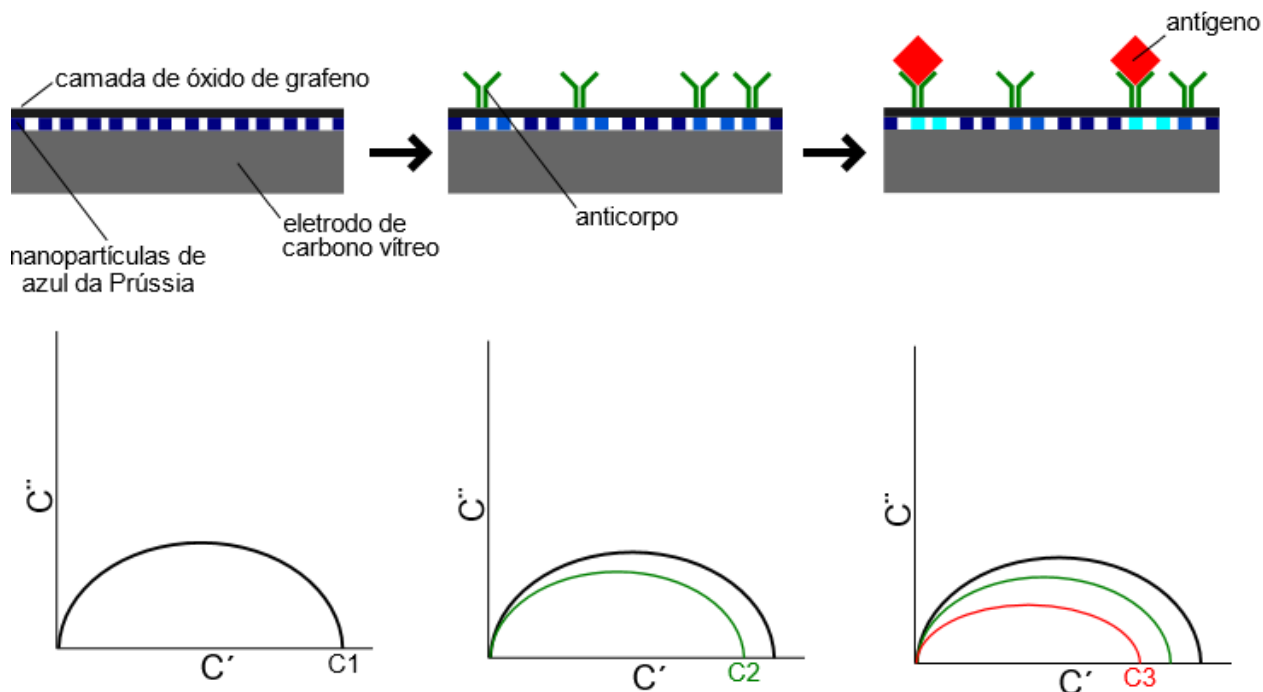


Figura 1 Estrutura do biossensor, sua funcionalização e detecção da molécula alvo e suas respectivas alterações nos valores de capacitância eletroquímica. Nesta sequência de figuras vemos que a aproximação de moléculas aos centros redox (nanopartículas de azul da Prússia) causa interferências na densidade de estados das nanopartículas (representado ilustrativamente na figura pela mudança de cor dos quadrados que representam as nanopartículas de azul da Prússia para tons mais claros). Essa alteração da densidade de estados é traduzida para menores valores de capacitância eletroquímica observada nos gráficos abaixo. O biossensoriamento ocorre, portanto, pelo acoplamento das moléculas alvo aos seus respectivos anticorpos o que causa diminuição do sinal capacitivo mensurado ($C_1 > C_2 > C_3$) [10].

1.1 – Biossensores

A definição de biossensores pode ser basicamente resumida em dispositivos que combinam algum material biológico com uma plataforma de transdução com o objetivo de detectar algum efeito biológico ou químico [11].

Sendo assim, podemos classificar biossensores a partir da sua metodologia de transdução e pela natureza do elemento de reconhecimento biológico. Existem na literatura inúmeros tipos e combinações de elementos de transdução com respectivos elementos de reconhecimento, evidenciando assim a grande amplitude de possibilidades de arquitetura de biossensores, cada uma com suas vantagens e desafios.

A respeito das metodologias de transdução podemos citar as técnicas que utilizam propriedades térmicas, ópticas, de detecção de massa e eletroquímicas. A transdução óptica é uma das classes mais comumente utilizada em ensaios de biossensoriamento [12] e dentre os sistemas utilizados podemos destacar a ressonância plasmônica de superfície, que se baseia no fenômeno de mesmo nome e tem como vantagens a não necessidade de marcadores, elevada sensibilidade e possibilidade de detecção em tempo real [13]. Biossensores térmicos se baseiam na medição da mudança de temperatura pela absorção ou produção de calor traduzida por um dispositivo calorimétrico [14]. Quanto a detecção de massa podemos exemplificar citando biossensores baseados em cristais piezoelétricos, onde se consegue medir pequenas variações de massa através da variação da frequência de ressonância de cristais de quartzo [15].

Finalmente, os ensaios baseados em propriedades eletroquímicas têm posição de destaque no desenvolvimento de biossensores. Isso se deve ao fato que estes sensores conseguem agregar características favoráveis para um biossensor como, baixo custo, portabilidade, alta sensibilidade e possibilidade de realização de ensaios multiplexados [4]. Dentre as técnicas eletroquímicas aplicadas a biossensores destacam-se a voltametria cíclica, cronoamperometria, cronopotenciometria e a impedância eletroquímica.

Em relação ao elemento de reconhecimento biológico os biossensores podem utilizar uma ampla gama de elementos biológicos como, por exemplo, enzimas, oligonucleotídeos ou peptídeos, células e anticorpos. Biossensores enzimáticos se baseiam na propriedade catalítica das enzimas para a detecção do substrato ou de seu produto [16], como exemplo podemos citar biossensores que utilizam a enzima glicose oxidase [17] para detecção de moléculas de glicose. Quanto aos biossensores que utilizam peptídeos ou oligonucleotídeos destacam-se os aptâmeros, dos quais são moléculas que se ligam a proteínas por

sequências altamente específicas e têm alta estabilidade e baixo custo de produção [18]. Também podem ser utilizadas células inteiras, onde estas funcionam como elemento de reconhecimento e produzem sinal mensurável (como fluorescência) na presença de alvos moleculares [19].

Outro importante elemento de reconhecimento biológico são os anticorpos (também chamados de imunoglobulinas), que são moléculas derivadas do sistema imunológico que tem como papel o reconhecimento de outras moléculas (denominadas antígenos). Sua estrutura é composta por duas regiões (Fig. 2), a região Fab (fragmento de união ao antígeno) e região Fc (fragmento cristalizável). A região Fab é responsável pela ligação do anticorpo com os antígenos, já a região Fc é responsável pela interação do anticorpo com os receptores de superfície de células. O seu uso em biossensores é amplo, sendo os sensores construídos utilizando imunoglobulinas chamados de imunossensores, pois estas moléculas possuem grande estabilidade e alta afinidade e especificidade por moléculas alvo (antígenos) [20].

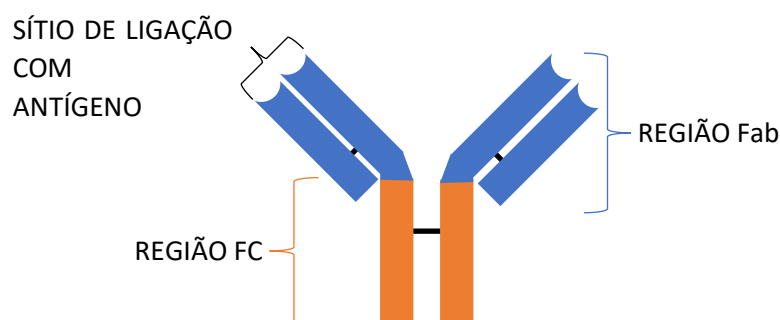


Figura 2 Estrutura geral de um anticorpo explicitando suas principais regiões.

1.2 – Técnicas eletroquímicas

A seguir são discutidas técnicas eletroquímicas de grande relevância para o campo de biossensores, são apresentados aspectos teóricos de suas medições e utilização em sensoriamento.

1.2.1 – Voltametria Cíclica:

Experimentos de voltametria cíclica são comumente utilizados para o estudo de reações redox e outros processos e reações que envolvam a transferência de elétrons. Neste experimento, uma faixa de potencial é aplicada - geralmente por um potenciostato - no eletrodo de trabalho (que tipicamente é composto de material condutor como ouro, prata e carbono vítreo). A aplicação de um potencial externo no eletrodo gera uma corrente que é mensurada pelo equipamento, assim, podemos relacionar graficamente a resposta de corrente em função do potencial aplicado.

Quando este experimento é realizado em sistemas redox, como por exemplo, eletrodos em solução contendo o par redox ferrocínio e ferroceno podemos verificar a geração de dois picos de corrente, um referente a oxidação ferroceno $\rightarrow$ ferrocínio e outro referente a redução ferrocínio $\rightarrow$ ferroceno.

A equação de equilíbrio para este sistema pode ser definida pela equação de Nernst

$$E = E^0 - \frac{RT}{(nF)} \ln Q, \quad (\text{eq. 1})$$

onde E é o potencial externo aplicado na célula eletroquímica, E^0 é o potencial padrão da célula, T é a temperatura absoluta, Q é o cociente de reação, R é a constante universal dos gases, n é o número de elétrons transferidos e F é a constante de Faraday.

Como no exemplo citado está ocorrendo uma reação de oxidação onde há a transferência de um elétron, podemos definir que $n = 1$ e Q pode ser redefinido como

$$Q = \frac{[Oxi]}{[Red]}, \quad (\text{eq. 2})$$

onde [Oxi] é a concentração de espécies oxidadas e [Red] é a concentração de espécies reduzidas no sistema. E assim, podemos rearranjar a equação de Nernst para um sistema redox com transferência de um elétron para

$$E = E_{eq} - \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{[Oxi]}{[Red]} \right). \quad (\text{eq. 3})$$

Desta equação podemos aferir que E_{eq} é o potencial onde a concentração das espécies reduzidas é igual ao número de espécies oxidadas, sendo assim, este potencial tem nome especial na eletroquímica sendo chamado de potencial formal.

O formato característico do voltamograma de um sistema redox em solução é devido a relação da taxa de difusão de espécies (reduzidas ou oxidadas) e o “consumo” delas por sua respectiva reação de oxidação ou redução. Por exemplo, em um sistema inicial onde as espécies oxidadas e reduzidas estão em equilíbrio, a variação para potenciais mais positivos acarreta na oxidação de ferroceno e isso ocorre em maior intensidade em potenciais mais positivos até um limite, onde a difusão de moléculas de ferroceno para as regiões mais próximas do eletrodo é limitada pela alta concentração de espécies reduzidas (ferrocínio). Sendo assim, a transferência de cargas ocorre com menor intensidade pois há um menor número de espécies de ferroceno próximas ao eletrodo para ser oxidado, neste caso, a transferência de carga está mais relacionada a taxa de difusão do ferroceno. O mesmo ocorre, mas de maneira inversa, quando a varredura de potencial ocorre no sentido contrário (ocorrendo a redução das espécies).

Outro fator importante a ser notado em experimentos que envolvam pares redox em solução é a distância entre os picos de corrente de oxidação e redução. Em sistemas com características de estabilidade na reação redox (apresentando reversibilidade reacional), feitos em temperatura ambiente (298 K), transferindo um elétron, de perturbação de pequena amplitude, baixa velocidade de varredura e ao redor do potencial formal a distância entre os picos de corrente de oxidação e redução é de 59 mV. Alterações na estabilidade do sistema podem ser deduzidas a partir de variações dessa amplitude de potencial. São exemplos de possíveis causas de alteração do padrão reversível a oxidação ou redução (irreversível) de alguma molécula e outros fenômenos que afetem a dinâmica dos elétrons no sistema.

Em termos cinéticos a corrente gerada em experimentos de voltametria cíclica pode ser relacionada a corrente produzida pela equação de Butler-Volmer para um elétron

$$j = j_0 \left\{ e^{\frac{\alpha_a F}{RT}(E-E_{eq})} - e^{\frac{\alpha_c F}{RT}(E-E_{eq})} \right\}, \quad (\text{eq. 4})$$

onde j é a densidade de corrente do eletrodo, j_0 é a densidade de corrente de troca em estado de equilíbrio, α_a e α_c são, respectivamente, os coeficientes de transferência de carga

anódica e catódica, E é o potencial aplicado no eletrodo, E_{eq} é o potencial do eletrodo no estado de equilíbrio, R é a constante universal dos gases e T a temperatura em Kelvin.

Em experimentos que envolvam a utilização de técnicas de voltametria cíclica em sensoriamento, a mudança do perfil de resposta de corrente é utilizada como parâmetro de transdução, que, por exemplo pode estar relacionado a mudança do valor dos coeficientes de transferência de carga, o que ocasionará uma alteração da resposta de corrente observada nos gráficos de voltametria cíclica.

1.2.2 – Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica utiliza a medição da impedância para investigar propriedades cinéticas e termodinâmicas de sistemas eletroquímicos. Diferentemente da voltametria cíclica, a impedância somente pode ser aplicada de forma reprodutível em sistemas onde a excitação elétrica segue uma tendência linear, sendo assim, dentre outros requisitos, é necessário que o sinal excitatório de perturbação senoidal não seja de grande amplitude, pois perde-se a linearidade da resposta de fenômenos de transferência de carga, mas, por outro lado, este potencial deve ser alto o suficiente para que a relação sinal/ruído seja a maior possível [21].

Basicamente, em um experimento de espectroscopia de impedância eletroquímica há a aplicação de um potencial de pequena amplitude com frequência variável

$$E(t) = E_a \sin(\omega t), \quad (\text{eq. 5})$$

sendo $E(t)$ o potencial aplicado no sistema, E_a a amplitude (própria para cada sistema), ω é a frequência angular ($2\pi f$) e t é o tempo.

Como resposta ao potencial aplicado, temos a geração de uma corrente senoidal com amplitude (I_a) e com diferença de fase (φ)

$$I(t) = I_a \sin(\omega t + \varphi). \quad (\text{eq. 6})$$

Assim podemos calcular a impedância do sistema utilizando como base a lei de Ohm

$$Z = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{E_a \sin(\omega t)}{I_a \sin(\omega t + \varphi)} = Z_a \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t + \varphi)} \quad (\text{eq. 7})$$

Portanto, vemos que a impedância gerada por um sinal $E(t)$ pode ser calculada em termos da magnitude Z_a e diferença de fase φ . No entanto, a equação anterior também pode ser expressada em termos da relação de Euler como

$$e^{i\theta} = \cos(\theta) + i \sin(\theta) \quad (\text{eq. 8})$$

Tendo-se $E(t)$ e $I(t)$ reescritos

$$E(t) = E_0 e^{i\omega t} \quad (\text{eq. 9})$$

$$I(t) = I_0 e^{i\omega t + \varphi} \quad (\text{eq. 10})$$

Sendo $i = \sqrt{-1}$ e, portanto, temos que a impedância é:

$$Z(\omega) = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{E_0 e^{i\omega t}}{I_0 e^{i\omega t + \varphi}} = Z_0 e^{i\theta} \quad (\text{eq. 11})$$

$$Z(\omega) = Z_0 (\sin(\theta) + i \cos(\theta)) \quad (\text{eq. 12})$$

Vemos então, que a impedância pode ser analisada por uma parte real ($Z_0 \sin(\theta)$) e outra parte imaginária ($Z_0 i \cos(\theta)$).

$$Z'(\omega) = Z_0 \sin(\theta) \quad (\text{eq. 13})$$

$$Z''(\omega) = Z_0 i \cos(\theta) \quad (\text{eq. 14})$$

$$Z(\omega) = Z'(\omega) + Z''(\omega) \quad (\text{eq. 15})$$

Em termos práticos, podemos analisar um sistema eletroquímico visualizando os dados de impedância real e imaginária em um único gráfico, onde a parte real é associada com o eixo das abscissas e a imaginária com o eixo das ordenadas, sendo este gráfico denominado gráfico de Nyquist.

Neste gráfico, a análise do espectro de impedância é facilitada, pois podemos correlacionar fenômenos físicos com características gráficas. Por exemplo, tendo-se o circuito impedimétrico mostrado na Figura 3 abaixo como exemplo, podemos indicar o resistor (R1) associado ao deslocamento inicial no gráfico, o resistor (R2) associado paralelamente com o capacitor (C1) com o semicírculo formado e reta com progressão linear com o elemento de Warburg (W).

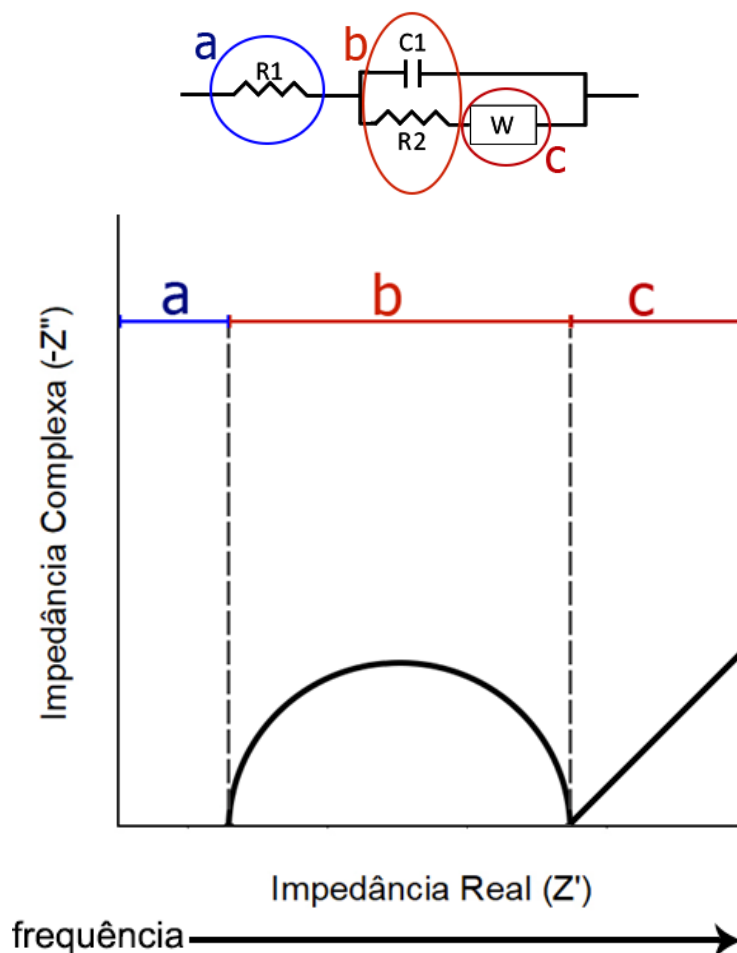


Figura 3 Circuito equivalente de Randles e suas respectivas associações com características do gráfico de Nyquist de impedância.

Na área de biossensores essas correlações são particularmente importantes pois, o diâmetro do semicírculo corresponde a resistência à transferência de cargas. Essa resistência é amplamente utilizada para medir alterações superficiais que possam estar relacionadas a medição de um alvo, portanto servindo como sinal de transdução.

No caso das monocamadas com sondas redox em solução, os circuitos equivalentes de Randles podem ser utilizados para descrever a resposta impedimétrica do sistema. Na Figura 4 é mostrado um circuito equivalente onde temos a resistência não compensada da solução (R_{SOL}), a resistência à transferência de cargas (R_{CT}), a capacitância de dupla camada (C_{DL}) e o elemento de Warburg (W) que está relacionado com fenômenos de difusão [23].

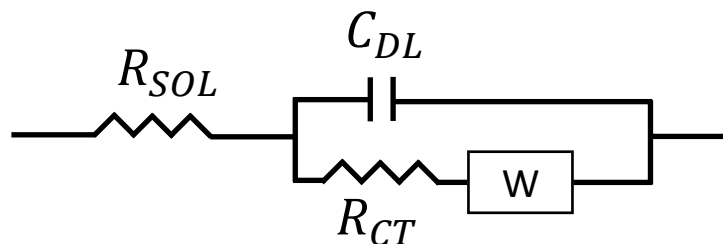


Figura 4 Exemplo de um circuito equivalente de Randles para monocamadas com sondas redox em solução, R_{SOL} é a resistência na solução, R_{CT} é a resistência da transferência de cargas, C_{DL} é a capacitância de dupla camada.

A resistência da solução é dependente de fatores como concentração de íons na superfície, tipo de íon, temperatura e da área geométrica do eletrodo, podendo assim a equação $R_{SOL} = \rho \frac{l}{A}$ resumir as contribuições não geométricas em ρ (resistividade da solução) e a geométrica na relação $\frac{l}{A}$ (onde l é a distância e A é a área).

A capacitância de dupla camada opera na interface entre o eletrodo e seu respectivo eletrólito de suporte, sendo ela formada quando os íons da solução são adsorvidos na superfície do eletrodo, criando assim duas superfícies carregadas (do eletrodo e dos íons adsorvidos) separados por um espaço dielétrico de tamanho da ordem de angstroms. Nesta disposição é formado um capacitor com capacitância C_{DL} onde fatores como a área geométrica do eletrodo, rugosidade, potencial do eletrodo, temperatura, tipo de íon podem afetar seu valor.

A resistência de transferência de carga é relacionada com a transferência de elétrons no eletrodo (tanto corrente positiva como negativa). Essa resistência também depende de variados fatores como temperatura, concentração de íons e tipo de íons, no entanto, salienta-se a importância das moléculas de superfície do eletrodo, pois, a modificação da composição ou estrutura de moléculas na superfície do eletrodo podem causar alterações nesta resistência. Essa alteração pode dificultar ou facilitar o acesso de sondas redox na superfície o que, por sua vez, ocasionará, respectivamente, no aumento ou diminuição da resistência de transferência de carga [24]. Esse mecanismo é utilizado por diversos sistemas de biossensoriamento baseados em monocamadas com sonda redox em solução, sendo assim, alterações de superfície ocasionadas pela interação com a molécula alvo são

detectadas pela alteração da resistência de transferência de carga do sistema causada pelo bloqueio às sondas redox [24].

No entanto, sistemas de monocamadas que apresentam sondas redox presas à superfície têm alta contribuição capacitiva advinda de fenômenos eletroquímicos associados a densidades de estados redox descritos por Bueno e Davis [25] e que são explorados mais eficientemente pela técnica de espectroscopia de capacitância eletroquímica.

1.2.3 – Espectroscopia de Capacitância Eletroquímica

Em um sistema de monocamadas com sondas redox confinadas o circuito equivalente de Randles adaptado por Bueno *et al* [26] mostra-se mais refinado separando as contribuições faradaicas e não faradaicas do sistema, permitindo uma análise mais profunda da origem dos valores capacitivos mensurados em sistemas de monocamadas com sondas redox acopladas a superfície.

Neste circuito equivalente (Figura 5), o componente não faradaico, que não envolve fenômenos de transferência de elétrons, é composto pelas resistências da solução (R_{SOL}) e não compensada (R_u) e pela capacitância da monocamada (C_m) e não compensada (C_u). No componente faradaico temos a resistência de transferência de carga (R_{CT}) e a capacitância redox (C_r).

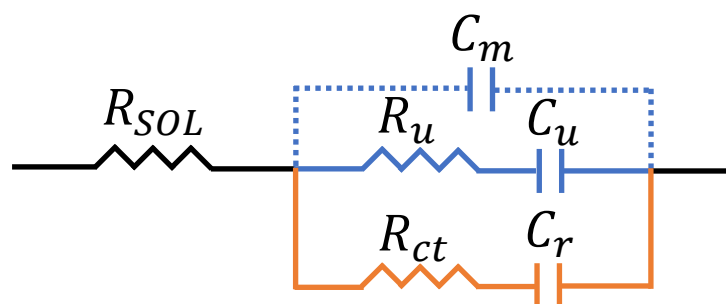


Figura 5 Circuito similar ao de Randles, proposto por Bueno *et al* para descrever superfícies com sonda redox confinadas na superfície. Em azul, o componente não faradaico, correspondente aos elementos de circuito não relacionados a transferência de elétrons – capacitância da monocamada (C_m), resistência não compensada (R_u) e capacitância não compensada (C_u) – e componente faradaico, com componentes relacionados a fenômenos que envolvem transferência de carga – resistência de transferência de carga (R_{CT}) e capacitância redox (C_r). Também se considera a resistência da solução (R_{SOL}).

A resistência da solução (R_{SOL}) tem definição similar à da apresentada nos circuitos anteriores, dependendo de fatores referentes a natureza da solução eletrolítica e eletrodo. Da mesma forma, a resistência de transferência de cargas (R_{CT}) também é dada pelo o acoplamento entre o eletrodo e espécies redox [26].

A capacitância da monocamada (C_m) substitui a capacitância de dupla camada (C_{DL}), que é mais adequada para interfaces eletrodo-solução sem a presença de monocamadas, pois considera a contribuição capacitiva causada pela presença da monocamada entre a interface do eletrodo e solução [27].

A capacitância redox (C_r) é uma capacitância de natureza química, diferente da capacitância convencional de cargas separadas por um meio dielétrico, que é observada quando se aplica variação de potencial (dV) em um filme nanoestruturado condutor (por exemplo, monocamadas redox). A aplicação deste potencial promove o deslocamento do nível de Fermi (dE_f) do sistema segundo a equação [28]:

$$dE_f = -qdV \quad (\text{eq. 16})$$

onde q é a carga elementar. Considerando a definição de capacitância $C = -dQ/dV$, vemos que $dV = -dE_f/q$ e temos que a carga (Q) pode ser considerada em um sistema molecular como $Q = Aq\Gamma f$, onde A é a área do eletrodo e f a fração de ocupação, que por sua vez, é definida pelo densidade do número de estados redox (n) dividido pela densidade molar da superfície (Γ). Sendo assim, temos dQ definido por:

$$dQ = Aq\Gamma df \quad (\text{eq. 17})$$

E assim temos que a capacitância química do sistema, também chamada de capacitância redox, é definida por:

$$C_r = Aq^2\Gamma \frac{df}{dE_f} \quad (\text{eq. 18})$$

Considerando que a função da fração de ocupação para um determinado potencial de deslocamento do nível de fermi (E_f) pode ser definida como:

$$f(E_0 - E_f) = \frac{1}{1 + e^{\frac{E_0 - E_f}{k_B T}}} \quad (\text{eq. 19})$$

onde E_0 é o potencial de meia onda do sistema redox, podemos resolver a equação diferencial anterior e obtermos a seguinte equação para a capacitância redox:

$$C_r = \frac{Aq^2\Gamma}{k_B T} f(1 - f) \quad (\text{eq. 20})$$

A capacitância redox ainda pode ser dividida em dois componentes capacitivos, a capacitância eletrostática (C_e) e a capacitância quântica (C_q) [29]:

$$\frac{1}{C_r} = \frac{1}{C_e} + \frac{1}{C_q} \quad (\text{eq. 21})$$

A capacitância eletrostática (C_e) está relacionada a capacitância criada pela superfície do eletrodo carregado e centros redox com cargas opostas, sendo assim, uma capacitância eletrostática convencional. Devida a sua dimensão molecular e também devido ao fato que durante uma perturbação faradaica essa capacitância é pouco afetada, temos que a contribuição da componente eletrostática é desprezível..

A capacitância quântica está associada com a densidade de estados eletrônicos do eletrodo ($g_1(E)$) e da superfície redox ($g_r(E)$) em um determinada nível de energia do eletrodo, E , assim:

$$\frac{1}{C_q} = \frac{1}{e^2} \left(\frac{1}{g_1(E)} + \frac{1}{g_r(E)} \right) \quad (\text{eq. 22})$$

Como a densidade de estados no eletrodo é infinita, vemos que a capacitância quântica está mais relacionada a densidade de estados da superfície redox. Considerando que a densidade de estados da superfície redox é altamente influenciada pelo campo elétrico de moléculas próximas aos centros redox esta capacitância pode servir como elemento de transdução de sensoriamento [9].

A visualização de fenômenos capacitivos, provenientes de sistemas com sondas redox confinadas, é dificilmente analisado por espectroscopia de impedância eletroquímica. Neste sentido, a espectroscopia de capacitância eletroquímica se baseia na mesma técnica da espectroscopia de impedância eletroquímica, no entanto, para melhor interpretação dos componentes capacitivos, os dados de impedância são convertidos para capacitância complexa utilizando a equação abaixo:

$$C^*(\omega) = \frac{1}{i\omega Z^*(\omega)} \quad (\text{eq. 23})$$

Tal conversão nos permite analisar os componentes reais e imaginários da capacitância do sistema estudado. Esta análise é fundamental para o entendimento dos fenômenos envolvidos em sistemas com sonda redox imobilizada, pois, nestes sistemas existem diversas contribuições de origem capacitiva.

Dentre as contribuições capacitivas citadas, a capacitância redox é a de maior contribuição em sistemas de sonda redox confinada em medições feitas no potencial de meia onda do sistema redox [24]. Essa capacitância é relacionada a densidade de estados eletrônicos das sondas redox da superfície, que é altamente sensível a modificações e amplamente utilizada como transdutor para o sensoriamento biológico por imunossensores [7].

1.3 – Engenharia de superfície em biossensores eletroquímicos

A engenharia de superfície é um aspecto fundamental dos biossensores eletroquímicos, isso porque a superfície tem papel de transdutor do sinal químico ou biológico para um sinal elétrico mensurável. Além disso a superfície tem papel importante como plataforma para o elemento de reconhecimento biológico.

Monocamadas automontadas são umas das arquiteturas mais importantes e utilizadas para este tipo de biossensor. Neste tipo de superfície de transdução geralmente são utilizadas moléculas com grupamentos tióis, dissulfetos e sulfetos que se ligam fortemente às superfícies metálicas (ouro, prata, cobre e outros) formando filmes finos e com espessura controlável [30]. Como aspectos positivos podemos citar a facilidade de miniaturização de sensores que utilizam esse tipo de superfície, pois eles exigem quantidade mínima de moléculas para sua montagem, além disso, estas superfícies apresentam melhor biocompatibilidade pela natureza das monocamadas se assemelharem as densas e ordenadas estruturas encontradas nas membranas lipídicas celulares [31]. Também é verificado em algumas monocamadas propriedades anti-incrustantes [32] onde proteínas inespecíficas são repelidas pela superfície do eletrodo (o que aumenta a sensibilidade do biossensor).

No entanto, nesta arquitetura, a estrutura das monocamadas é diretamente relacionada a morfologia do metal [33], portanto, há necessidade de rigoroso controle e tratamento de superfície para a obtenção de monocamadas estáveis. Também como limitação, deve-se salientar que algumas monocamadas podem sofrer processos de degradação térmica ou elétrica e instabilidade química [31].

As monocamadas ainda podem ser divididas entre as que apresentam a sonda redox presa na superfície e as que têm a sonda redox diluída na solução. Neste último tipo de arquitetura, a alteração da cinética de transferência de elétrons (entre o eletrodo e centro

redox) é utilizada como parâmetro para a medição de mudanças relacionadas a fenômenos de biossensoriamento. Para tanto, é especialmente conveniente a medição da constante da taxa de transferência de elétrons (k_{ET}) que pode ser calculada pelas metodologias anteriormente citadas de voltametria cíclica, espectroscopia de impedância eletroquímica e outras.

No caso de monocamadas com sonda redox confinada, por apresentar comportamento altamente capacitivo, a metodologia a ser utilizada é a espectroscopia de capacitância eletroquímica, a qual faz a transdução do evento de sensoriamento com a alteração da capacitância redox do sistema. Apesar deste sistema apresentar bons resultados de sensoriamento [34] os problemas relacionados às monocamadas persistem e, portanto, novas arquiteturas de sistemas com sonda redox confinada podem representar um avanço importante e, dentro dessa lógica, salienta-se materiais com propriedade redox bem definidas como o azul da Prússia.

1.4 – Azul da Prússia

O azul da Prússia é um composto de coordenação formado por átomos de ferro e moléculas de cianeto primordialmente utilizado como pigmento. Em eletroquímica, esse composto é amplamente utilizado por ter boas propriedades redox [35] e por possuir custo reduzido de produção.

Na sua estrutura química $\text{Fe}_4^{+3}[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]_3$ há um átomo de ferro (III) que é coordenado com moléculas de cianeto e átomos de ferro (II) (Fig. 6). Na forma de cristal ele se apresenta em um sistema cristalino cúbico de face centrada de aresta de 10.2 angstroms com átomos de ferro (II) e ferro (III). Os átomos de nitrogênio se coordenam com os átomos de ferro (III) em forma octaédrica e os átomos de carbono circundam os átomos de ferro (II) [36].

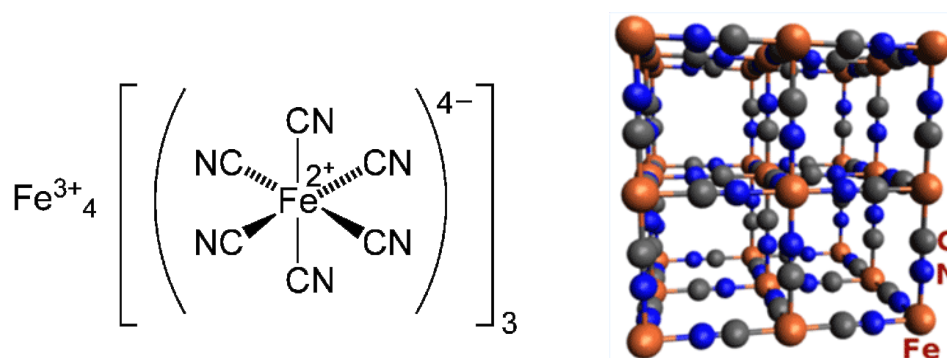


Figura 6 Representação do composto de azul da Prússia e sua respectiva estrutura cristalina. Figuras obtidas da referência [37].

Em experimentos eletroquímicos, sua caracterização por voltametria cíclica resulta em dois pares de picos (Fig. 7), na parte oxidada entre os dois picos encontra-se o azul da Prússia, do qual quando reduzido se transforma para o branco da Prússia. Em potenciais mais elevados, ocorre uma segunda transição, entre azul da Prússia e verde de Berílio, no entanto, este último não tem boa estabilidade e sofre degradação ao longo do tempo.

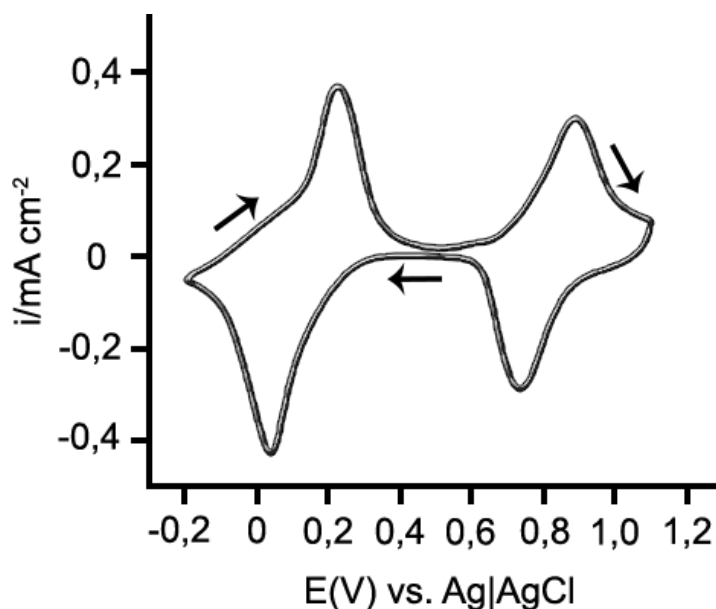
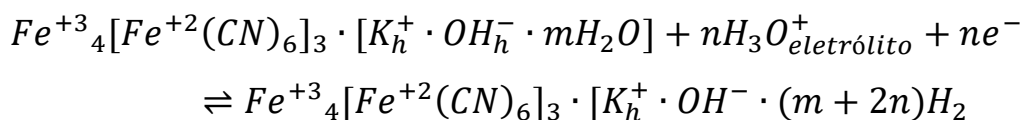
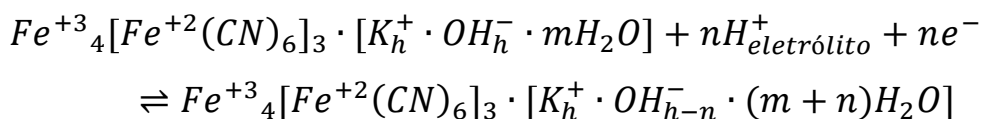
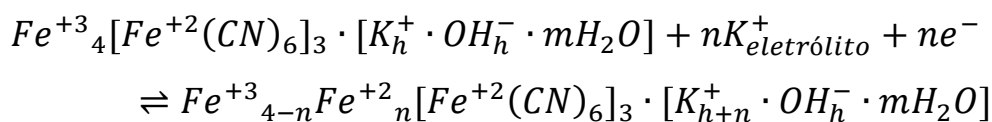


Figura 7 Voltamograma cíclico de uma superfície de azul da Prússia em eletrodo de vidro de ITO. Nota-se dois pares de picos redox, sendo o primeiro referente a oxidação e formação de superfície composta por azul da Prússia e na sua respectiva redução há a formação do branco da Prússia. Em potenciais mais elevados, há um segundo pico de oxidação referente a transformação da superfície de azul da Prússia para verde de Berílio. Figura baseada da referência [38].

A presença do potencial redox bem definido do azul da Prússia é dependente de uma estabilização eletroquímica envolvendo a modificação da composição cristalina da superfície através das seguintes reações [39]:



Cátions de potássio têm contribuição fundamental na formação do potencial redox do azul da Prússia, sendo que sua ausência afeta o pico redox característico desta superfície [40] pelo fato de que os íons de H^+ e H_3O^+ não podem ocupar os sítios relativo aos íons de potássio [41].

Após a estabilização, o cristal de azul da Prússia passa a se estruturar de acordo com a fórmula $Fe^{+3}_4[Fe^{+2}(CN)_6]_3 \cdot [K_h^+ \cdot OH_h^- \cdot mH_2O]$, sendo composto por centros coordenados por átomos de Fe^{+3} e de Fe^{+2} , os átomos de ferro são ligados por grupamentos CN onde Fe^{+3} se coordena com átomos de nitrogênio e Fe^{+2} com os átomos de carbono ($Fe^{+2} - CN - Fe^{+3}$) [39]. Nessa estrutura cristalina existem vacâncias periódicas no lugar dos centros $[Fe^{+2}(CN)_6]^{-4}$ e ao seu redor são formados clusters de $[Fe^{+3}(NC)_5OH^-]_6$ onde íons de K^+ , H^+ e H_3O^+ compensam a carga negativa gerada pelas hidroxilas [42].

A oxidação do azul da Prússia inicia-se preferencialmente pelos átomos pentacoordenados de Fe^{+3} presentes nas vacâncias de $[Fe^{+2}(CN)_6]^{-4}$ e se propaga pela oxidação de todos os átomos de Fe^{+3} , sendo assim, a forma totalmente oxidada (carregada) do azul da Prússia é inteiramente composta por átomos de Fe^{+2} coordenados ($Fe^{+2}_4[Fe^{+2}(CN)_6]_3 \cdot [K_h^+ \cdot OH_h^- \cdot mH_2O]$).

Na área de biossensores eletroquímicos, o azul da Prússia é amplamente utilizado como detector da presença de peróxido de hidrogênio, pois, filmes formados com esse composto têm altas constantes de degradação de H_2O_2 [43]. Essa propriedade é utilizada em associação com enzimas oxidases, das quais geram peróxido de hidrogênio no processo de oxidação do analito, portanto, a detecção de analitos pode ser inferida indiretamente pela a medição da taxa de conversão de peróxido de hidrogênio mensurada pelo sensor com filmes de azul da Prússia [44].

No entanto, filmes contendo azul da Prússia podem ser utilizados como transdutores de sensoriamento utilizando sua propriedade redox, por exemplo, no trabalho desenvolvido por D. Feng *et al* [45] o aumento da resistência de transferência de carga da superfície foi mensurado pela redução dos picos redox do azul da Prússia em experimentos de voltametria cíclica e associada com fenômenos de acoplamento da superfície com anticorpo e seu respectivo antígeno alvo.

Como anteriormente apresentado, filmes contendo sondas redox apresentam propriedades capacitivas relativas ao acoplamento de seus estados eletrônicos com os do eletrodo e essa capacitância (redox) é altamente sensível a alterações superficiais. Tendo-

se isso em mente, as propriedades redox do azul da Prússia podem ser utilizadas para biossensoriamento utilizando a técnica inovadora de espectroscopia de capacitância eletroquímica.

2 – Objetivos

Objetivo Geral

Produção de superfície eletroquímica com atividade redox a partir de materiais nanoestruturados que possa ser utilizada na detecção de biomarcadores com relevância médica em ensaios de espectroscopia de capacitância eletroquímica (ECE).

Objetivos específicos

- Desenvolvimento de superfície com características redox estável e seja compatível para aplicação em ensaios de espectroscopia de capacitância eletroquímica.
- Realizar ensaios de detecção do biomarcador IL-6 usando a capacitância eletroquímica como sinal transdutor.

3 – Materiais e métodos

3.1 – Materiais

Em todos os experimentos de voltametria cíclica, EIE e ECE foi utilizado o Potenciostato/Galvanostato Autolab (PGSTAT302N), eletrodos auxiliares (contra-eletrodos) de platina e eletrodos de referência de Ag|AgCl (KCl 3 mol/L). Eletrodos de carbono vítreo (ECV) com diâmetro de 2 mm (Metrohm) e 3 mm (Basi) foram utilizados como eletrodos de trabalho. Para a produção dos filmes (que modificam os eletrodos de trabalho) foi utilizado solução 2,0 mg/mL de óxido de grafeno (GO, do inglês *Graphene Oxide*) (Sigma), nanotubos de carbono multicamadas (dimensões 6-13 nm x 2.5 – 20 µm) (Sigma), solução de poli(cloreto de dialildimetilamônio) (Sigma), solução de hexacianoferrato (III) de potássio (Sigma). Para a funcionalização da superfície de óxido de grafeno com o anticorpo, utilizou-se N-Hidroxisuccinimida (NHS) e hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) ambas obtidas pela Sigma. Para o bloqueio e controle negativo foi utilizado, respectivamente, solução de albumina sérica bovina (BSA) e fetuína compradas da empresa Sigma. O anticorpo monoclonal anti-interleucina-6 (AIL6) e, seu respectivo antígeno, interleucina-6 (IL-6) foram comprados da empresa Rheabiotech (Campinas, Brasil).

3.2 – Metodologia

Nos experimentos de avaliação da resposta eletroquímica das superfícies produzidas, o tratamento padrão inicial consiste de polimento mecânico utilizando pastas de aluminas de granulometrias variadas (1,0, 0,3 e 0,05 µm), começando pela de maior tamanho e finalizando com a de menor. Depois de cada polimento, o eletrodo é imerso em etanol puro realizando banho ultrassônico por 2 minutos. Posteriormente, cada superfície do eletrodo foi funcionalizada de acordo a metodologias específicas detalhada nas sessões 4.1.1 a 4.1.3.

No experimento para construção do imunossensor eletroquímico (utilizando a superfície descrita na sessão 4.1.3) o tratamento inicial é pontualmente alterado. Neste caso, ainda são utilizados eletrodos de carbono vítreo (3 mm de diâmetro), porém eles são polidos apenas com a pasta de alumina com granulometria 1,0 µm e, posteriormente, limpos por banho ultrassônico em etanol puro por 2 minutos. Tal alteração deve-se a constatação de melhor reprodutibilidade de resultados polindo somente com a pasta de alumina de maior granulometria. Em seguida, os eletrodos foram mergulhados por 15 minutos em uma solução recém-preparada constituída por 1mM de cloreto de ferro (III) e 1 mM de

Hexacianoferrato (III) de Potássio. Após retirados da solução, os eletrodos foram lavados com água Milli-Q. Em seguida, 30 μL de uma solução 0,01 mg/mL de óxido de grafeno foi depositada sobre os eletrodos, deixando-a até secar em temperatura ambiente por 12 horas.

Na etapa de funcionalização da superfície de PBNP+GO com anticorpo, os eletrodos foram incubados por 50 minutos em uma solução constituída por 0,4 M de EDC e 0,1 M de NHS para ativação dos grupos carboxílicos do óxido de grafeno, conforme mostrado na Figura 8. Logo após os eletrodos foram secos com fluxo de nitrogênio sendo, em seguida, depositados em 30 μL de uma solução 0,1 mg/mL (ou 700 nM) do anticorpo monoclonal para IL-6 em KCl 0,1 M. Essa solução ficou sobre a superfície do eletrodo por 1 h em temperatura ambiente, permitindo a reação dos anticorpos com as moléculas de óxido de grafeno.

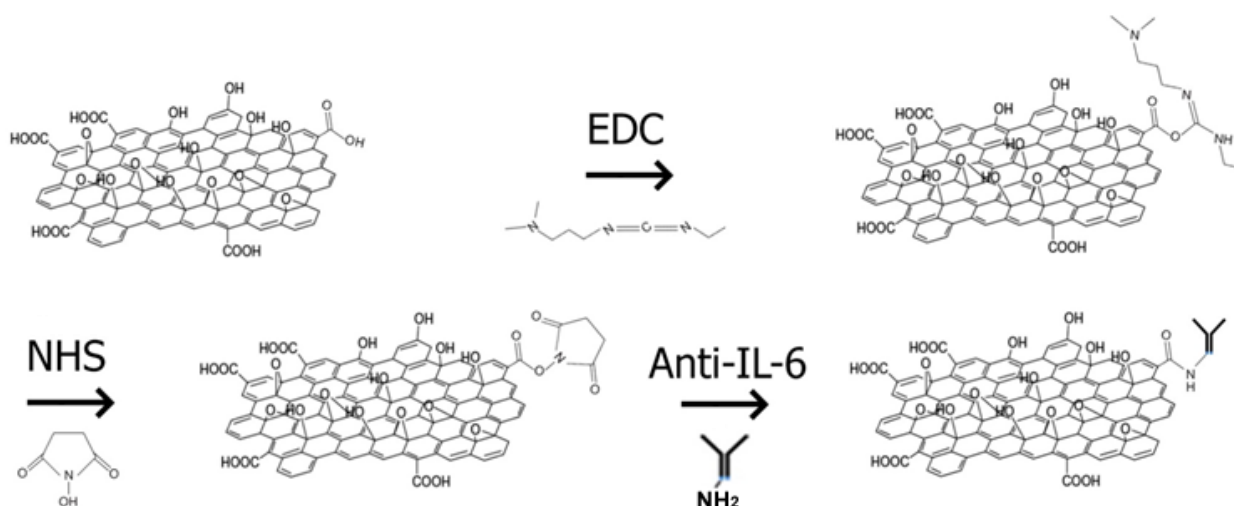


Figura 8 Esquema ilustrativo da imobilização de anticorpos sobre moléculas de óxido de grafeno. As moléculas de EDC e NHS alteram hidroxilas de grupos carboxílicos do óxido de grafeno favorecendo a formação de ligação peptídica com o grupo amino do anticorpo. O tamanho do anticorpo é meramente ilustrativo, sendo em realidade, muito maior do que demonstrado na figura.

Após a incubação com os anticorpos, os eletrodos foram lavados cuidadosamente com água Milli-Q e, em seguida, a superfície foi bloqueada por 30 min com uma solução 0,1% de albumina sérica bovina (BSA) em KCl 0,1M.

As superfícies de bio-reconhecimento eletroativas foram anteriormente caracterizadas por VC para a verificação de seu perfil de resposta faradaica. Superfícies com atividade redox apresentam picos de corrente associados a fenômenos de oxidação e

redução como mostrados na Figura 9, a média dos valores de potencial máximo de oxidação (P_o) e redução (P_r) é definido como potencial formal da superfície redox que também é o nível de Fermi do sistema.

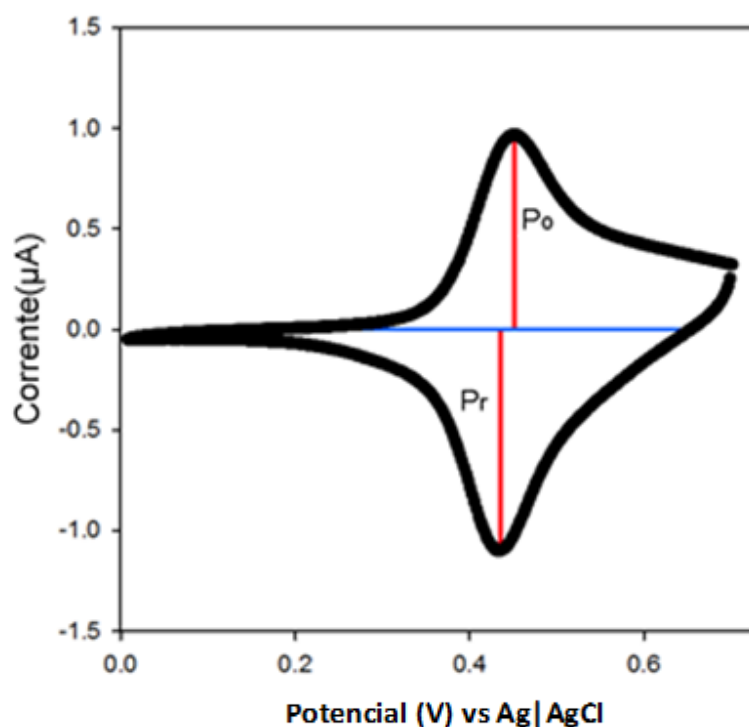


Figura 9 Gráfico de voltametria cíclica da superfície funcionalizada com monocamada de 11-ferroceno em solução de perclorato de tetrabutilamônio 0,02 M (proporção acetonitrila e água 20:80), taxa de varredura de 0,1 mVs⁻¹, faixa de potencial de 0V a 0,7V e eletrodo de referência de Ag|AgCl (KCl 3M). Percebe-se picos do potencial máximo de redução (P_r) e potencial máximo de oxidação (P_o). A média destes potenciais resulta no potencial formal da superfície eletroativa que também é o potencial do nível de Fermi do sistema.

A caracterização da superfície de azul da Prússia por microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva foi realizada utilizando o microscópio de varredura de alta resolução (FEG-MEG; JEOL modelo 7500F) com eletrodos de carbono vítreo (funcionalizados e não funcionalizados com azul da Prússia) apenas secos em temperatura ambiente e luz infravermelha.

No experimento de espectroscopia de capacitância eletroquímica (ECE) são realizadas medições por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) no potencial formal obtido no experimento de voltametria cíclica e em frequência tipicamente variando de 1 MHz até 50 mHz, com amplitude de sinal senoidal de 10 mV. Os valores de impedância complexa são convertidos para capacitância complexa utilizando a fórmula $C^*(\omega) =$

$[i\omega Z^*(\omega)]^{-1}$ onde C^* é a capacitância complexa, ω é a frequência angular ($2\pi f$), Z^* é a impedância complexa e j é o unitário complexo.

Como citado anteriormente, para a realização do experimento de ECE é necessário definir o potencial formal da superfície. Neste potencial ocorre um equilíbrio termodinâmico entre os processos de oxidação e redução das espécies eletroquimicamente ativas sendo o ponto onde metade do número de estados eletrônicos disponíveis da superfície é acessado e onde a transferência de elétrons ocorre com maior intensidade [46].

Sendo assim, a C_r é máxima quando realizamos medidas de ECE no potencial formal pois seu módulo é diretamente proporcional ao número de cargas faradaicas transferidas no sistema redox [26]. Tal relação é corroborada pela expressão matemática da capacitância redox (equação 20).

O valor da capacitância redox pode facilmente obtido em experimentos de ECE calculando o diâmetro do semicírculo em gráficos de Nyquist de capacitância (C' versus C'') [25] como mostrado na Figura 10.

Em termos de sensoriamento molecular, é importante observar que a capacitância obtida no potencial formal é majoritariamente relacionada ao fenômeno de capacitância redox, sendo que a capacitância advinda de fenômenos não-faradaicos, como efeitos de dupla camada elétrica e relaxação iônica, têm contribuição reduzida perante a redox [34]. Sendo assim, devido ao fato que a capacitância redox é altamente sensível alterações na superfície do eletrodo [7], podemos utilizar desta propriedade para o sensoriamento de interações biológicas como a ligação de um antígeno em um anticorpo.

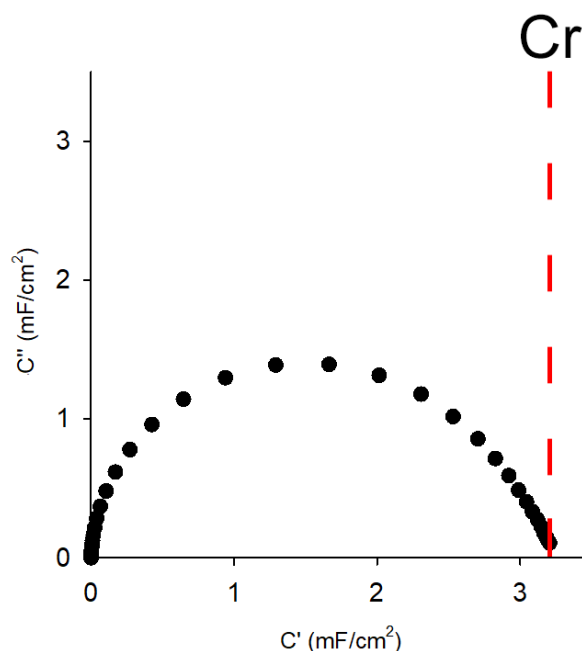


Figura 10 Gráfico mostrando medição de ECE da superfície de azul da Prússia com óxido de grafeno em eletrólito de KCl 0,1M realizadas no potencial formal. Neste caso é possível observar claramente a capacitância redox do sistema (Cr) que é intimamente relacionado ao número de estados eletrônicos disponíveis na superfície.

Em suma, o fluxograma da Figura 11 resume as principais etapas realizadas em um eletrodo para a obtenção de dados de espectroscopia de capacitância eletroquímica. Salienta-se que nem todos os experimentos seguiram essa ordem, sendo que variações são explicitamente comentadas ao longo do trabalho.

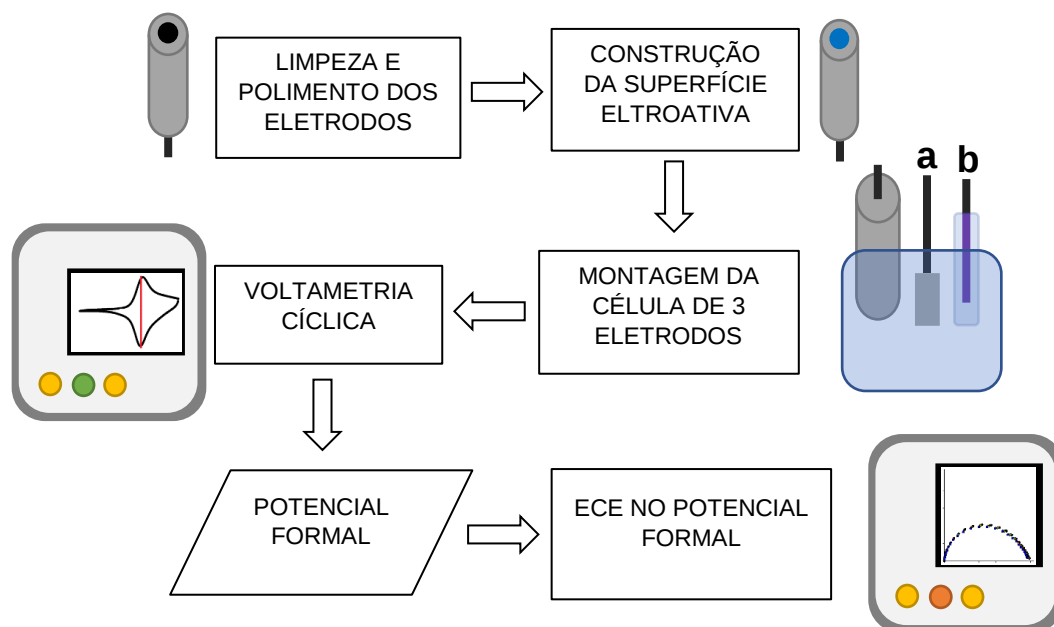


Figura 11 Fluxograma de trabalho mostrando os procedimentos básicos realizados para obtenção de dados de espectroscopia de capacitância eletroquímica (ECE) de eletrodos funcionalizados. Onde a representa o contra eletrodo de platina e b representa o eletrodo de referência de Ag|AgCl.

4 – Resultados e discussão

4.1 – Construção e avaliação de superfícies com atividade eletroquímica

Primeiramente foi realizada uma triagem das superfícies com atividade eletroquímica redox e de alta densidade de corrente para a definição da qual apresenta melhores parâmetros em termos de estabilidade, relações de Kramers-Kronig (linearidade, causalidade e estabilidade) e compatibilidade com os requisitos teóricos da espectroscopia de capacitância eletroquímica. Como parâmetro de comparação, foram utilizados resultados obtidos de experimentos com monocamadas redox de 11-ferroceno (11-Fcc), pois elas já foram utilizadas com sucesso em abordagens eletroquímicas aplicadas em biossensores [34].

4.1.1 - Superfície 1 - Eletrodo de Carbono Vítreo + Nanocompósito de Nanotubo e Grafeno + Nanopartículas de Azul da Prússia (ECV+RNL+PBNP+NL)

Para a construção desta superfície foi produzido um nanocompósito contendo nanotubos de carbono multi-camadas (MWCN, do inglês *multi-walled carbon nanotubes*) e óxido de grafeno. Tal superfície já foi descrita na literatura [45] e utilizada com sucesso na construção de um biossensor amperométrico. Para tanto foi feita oxidação de 10 mg de nanotubos de carbono multi-camadas por agitação ultrassônica por 3 horas em 1 mL de uma solução 3:1 de ácido sulfúrico e ácido nítrico. Feito isso, os nanotubos foram lavados repetidamente com água Milli-Q até a formação de uma dispersão com um pH próximo ao neutro, posteriormente, essa dispersão foi seca em estufa a 100 °C.

Com os nanotubos devidamente secos, eles foram misturados com uma solução 1 mg/mL do polímero cloreto de polidialildimetilamônio (PDDA) contendo 0,5 M de NaCl e agitados no banho ultrassônico por 30 minutos até a formação de uma dispersão homogênea. O PDDA residual foi removido com sucessivas lavagens com água Milli-Q e centrifugações, assim, foi obtido um compósito PDDA-MWCN com carregada positivamente.

Tal compósito foi ressuspenso para 1 mg/mL sendo adicionado 2 mg de óxido de grafeno e 4 mL de água deionizada. Novamente foi realizado um banho ultrassônico por 2 horas até a formação de uma dispersão homogênea. Seguindo a isso, foram realizadas

novas lavagens e centrifugações do compósito que posteriormente foi seco em estufa a vácuo em uma temperatura de 60°C por 12 horas.

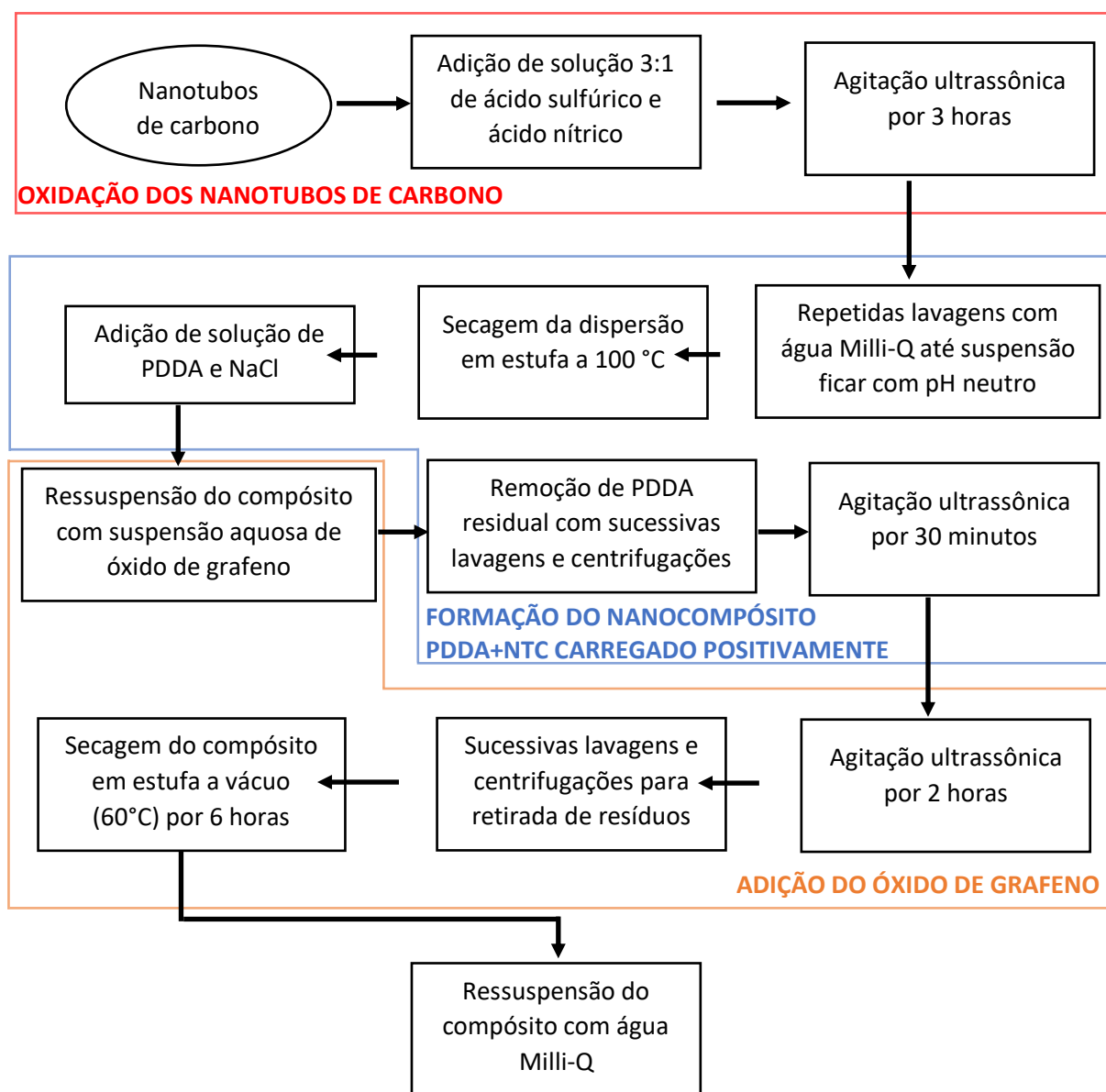


Figura 12 Fluxograma para produção do compósito molecular (NL) constituído de óxido de nanotubos de grafeno, PDDA e óxido de grafeno.

Com o compósito seco, foi adicionado água Milli-Q a fim de se formar uma dispersão de concentração 1 mg/mL. Tal dispersão foi utilizada então para a formação de um filme na superfície do eletrodo. A Figura 12 resume todas as etapas realizadas para a produção do nanocompósito utilizado.

Sendo assim, após ter o eletrodo de carbono vítreo devidamente polido e feitas as caracterizações por VC e ECE foi gotejado 20 μL da solução de nanocompósito sobre a superfície do eletrodo. Esse, então, foi deixado em temperatura ambiente até secar. Em seguida, o eletrodo foi caracterizado com experimentos de VC e de ECE e foi realizada redução eletroquímica da camada de nanocompósito (NL) através de 10 ciclos de voltametria cíclica variando o potencial de 0 V até -2,0 V, com taxa de varredura de 100 mVs^{-1} , eletrólito suporte PBS (Sigla em inglês para *phosphate buffered saline*) pH 7,4, formando uma camada de nanocompósito reduzido (RNL).

Posteriormente, o eletrodo foi mergulhado em uma solução contendo 0,01 M de cloreto de ferro (III) e 0,01M de hexacianoferrato (III) de potássio por 1 hora. A solução em que o eletrodo está mergulhado faz o depósito espontâneo de nanopartículas de azul da Prússia sobre o nanocompósito reduzido (RNL+PBNP), situação já observada em outros experimentos com materiais similares [47,48]. A seguir, o eletrodo foi novamente caracterizado por VC e ECE. Após estas etapas, foi gotejado mais 20 μL da suspensão do compósito nanoestruturado (RNL+PBNP+NL) e deixado em temperatura ambiente até secar. A Figura 13 ilustra todas as etapas de montagem da superfície do eletrodo. Após a construção da superfície, foram realizados experimentos de VC e ECE com o objetivo de avaliar o desempenho e estabilidade ao final.

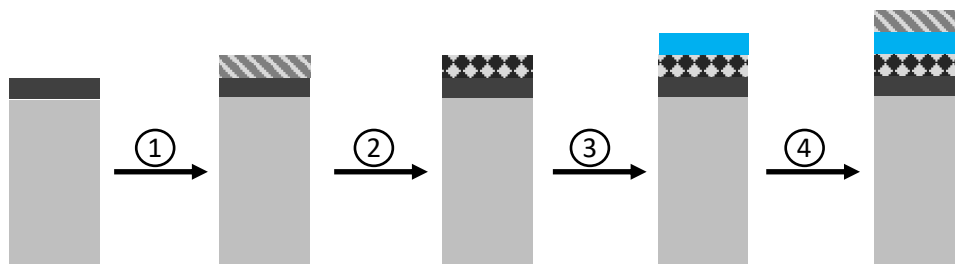


Figura 13 Etapas da produção da superfície RNL+PBNP+NL. (1) – Depósito da camada de nanocompósito (NL). (2) – Redução eletroquímica da camada de nanocompósito. (3) – Adição da camada de azul da Prússia. (4) – Depósito de outra camada de nanocompósito.

O filme obtido apresentou atividade eletroquímica redox com potenciais definidos de redução e oxidação nos experimentos de voltametria cíclica (Fig. 14) sendo estes relacionados a presença dos centros redox do azul da Prússia [45]. Verificou-se densidades de corrente de pico catódico e anódico entre 450 e 500 $\mu\text{A cm}^{-2}$ (cerca de 8 vezes maior do que a densidade encontrada em monocamadas de 11-ferroceno [34]). No entanto, foi verificado (tabela 1) considerável distância entre os potenciais de picos de oxidação e

redução (cerca de 100 mV), do qual pode indicar irreversibilidade do processo redox. Em experimentos de ECE, utilizando o potencial formal, não foi verificado (mesmo em baixíssimas frequências) a região de frequência com estado relaxado em que se pode observar a capacitância redox (C_r) do sistema (Fig. 15). Tais motivos, juntamente com a grande instabilidade da superfície (redução de 63% de C' no ponto de menor frequência mensurada em lavagens sucessivas), indicaram que tal nanoestrutura não fosse adequada para posteriores testes neste projeto.

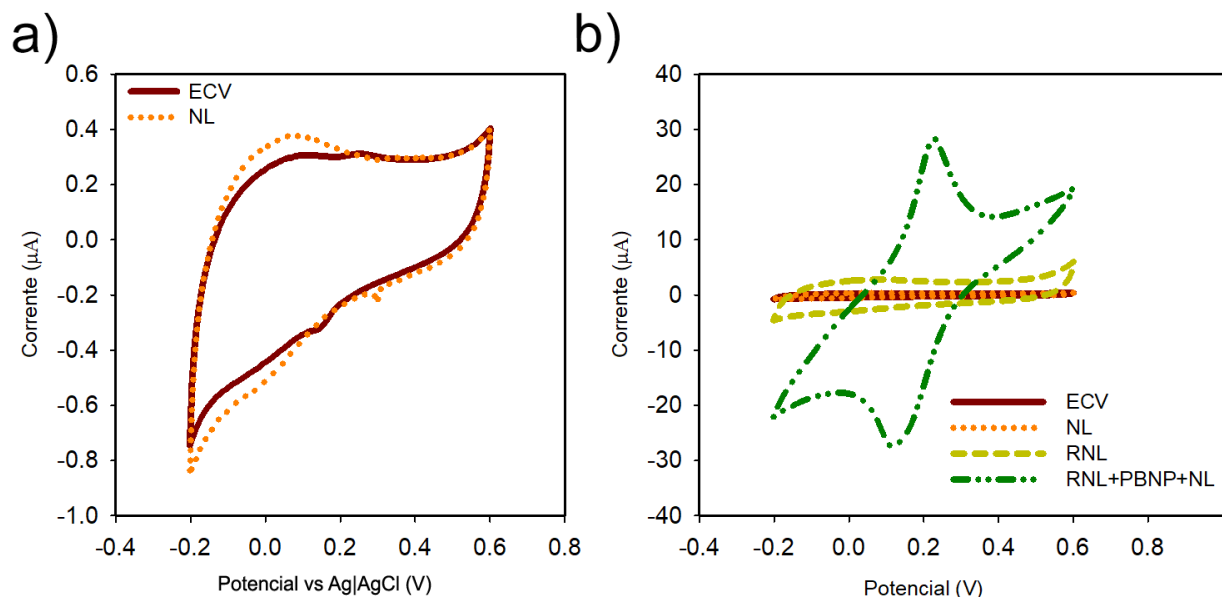


Figura 14 (a) e (b) Voltametria cíclica feita nas superfícies de ECV (linha vermelha), NL (linha laranja), RNL (linha oliva) e RNL+PBNP+NL (linha verde) na faixa de potencial de -0,2V até 0,6V, taxa de varredura de 100 mVs⁻¹ e PBS pH 7,4 como eletrólito suporte. Verifica-se potenciais de oxidação e redução bem definidos na superfície contendo as moléculas de azul da Prússia, podendo ser relacionado ao acesso de sua densidade de estados eletrônicos.

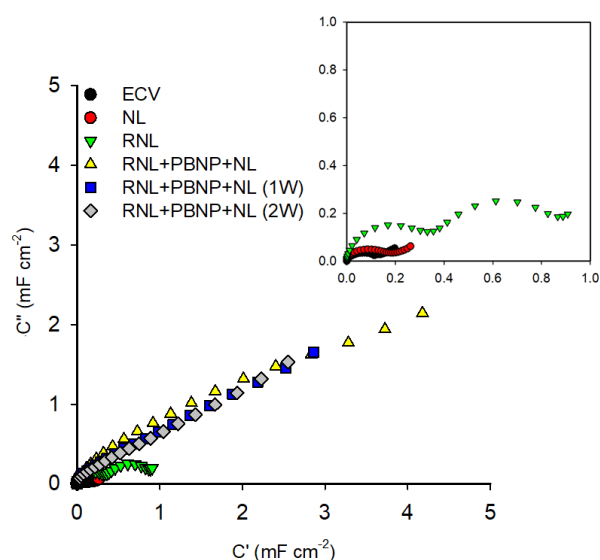


Figura 15 Gráfico de Nyquist de capacitância para medições com ECV (pontos pretos), NL (pontos vermelhos), RNL (triângulos verdes), e RNL+PBNP+NL após sua formação (triângulos verdes), após uma lavagem (1W, quadrados azuis escuros) e após duas lavagens (2W, quadriláteros cinzas). Medidas realizadas em PBS pH 7,4 como eletrólito suporte, potencial fixado em 0,176V e faixa de frequência de 1MHz até 30mHz. No canto superior direito, amplificação do gráfico para menores valores de capacitância. Nota-se que mesmo em baixas frequências não foi observado o ponto da capacitância redox, tal situação não permite a aplicação da teoria de capacitância redox.

Superfície	E_F (V)	J_C ($\mu A\ cm^{-2}$)	J_A ($\mu A\ cm^{-2}$)	ΔE_{C-A} (mV)
11-Fcc	0,445	35	-28	20
RNL+PBNP+NL	0,176	705	-632	101

Tabela 1 Parâmetros eletroquímicos gerais de uma superfície de 11-ferroceno e da superfície de RNL+PBNP+NL. Verifica-se que a distância entre os potenciais de oxidação e redução ΔE_{C-A} é muito menor na superfície de 11-Fcc, isso pode indicar maior caráter de irreversibilidade na reação redox do RNL+PBNP+NL.

4.1.2 - Superfície 2 - Eletrodo de Carbono Vítreo + Óxido de Grafeno + Nanopartículas de Azul da Prússia (ECV+RGO+PBNP+GO):

Para essa superfície foram utilizados eletrodos de carbono vítreo, devidamente polidos, e caracterizados por voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de capacitância eletroquímica, tendo-se PBS pH 7,4 como eletrólito de suporte e utilizando o eletrodo de Ag|AgCl (em KCl 3M) como referência e contra-eletrodo de platina. Posteriormente, adicionou-se 20 μL de uma dispersão com concentração 0,01 mg mL^{-1} de óxido de grafeno sobre a superfície do eletrodo até sua completa secagem. Realizou-se assim, nova caracterização da superfície de óxido de grafeno por VC e ECE e, em seguida, redução eletroquímica por VC com 10 ciclos e potenciais variando de -2,0V até 0,0V com uma taxa de varredura de 100 mV s^{-1} . Após redução e caracterização da superfície de RGO, o eletrodo foi mergulhado em uma solução contendo 0,01M de cloreto de ferro (III) e 0,01M de hexacianoferrato (III) de potássio por 1 hora, formando acima da superfície de óxido de grafeno reduzido uma superfície contendo nanopartículas de azul da Prússia (RGO+PBNP). Logo em seguida, o eletrodo foi incubado com 20 μL da suspensão de óxido de grafeno deixando-o até secar em temperatura ambiente, formando-se uma camada de óxido de grafeno acima das outras duas (RGO+PBNP+GO). Toda montagem da superfície em questão é resumida na Figura 16. Medições de VC e ECE foram realizados posteriormente para avaliar o comportamento e estabilidade do sistema.

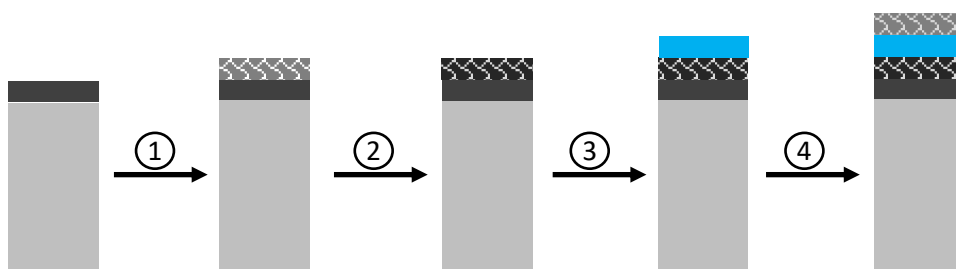


Figura 16 Etapas da produção da superfície RGO+PBNP+GO. (1) – Depósito da camada de óxido de grafeno (GO). (2) – Redução eletroquímica da camada de óxido de grafeno (RGO). (3) – Adição da camada de azul da Prússia. (4) – Depósito de nova camada de óxido de grafeno.

A superfície apresentou sinal eletroativo redox com picos de oxidação e redução bem definidos em experimentos de voltametria cíclica (Fig. 17.a) garantidos pela adição da camada de azul da Prússia, com picos de densidade de corrente catódica e anódica entre 480 e 510 $\mu\text{A cm}^{-2}$ (valor próximo ao obtido na superfície RNL+PBNP+NL, que utiliza a mesma camada redox). No entanto a distância entre os picos de oxidação e redução é muito elevada (tabela 2), indicando irreversibilidade da reação redox, o que pode influenciar na

estabilidade da superfície. Nos experimentos de ECE a superfície produziu um sinal difícil de ser resolvido pela teoria de capacitância redox, pois essa não demonstra, mesmo em baixas frequências, o ponto associado a capacitância redox (Fig. 17.b) – formação do semicírculo capacitivo. Consequentemente, estes indicativos afetam a aplicabilidade do filme em sua utilização pela técnica de ECE.

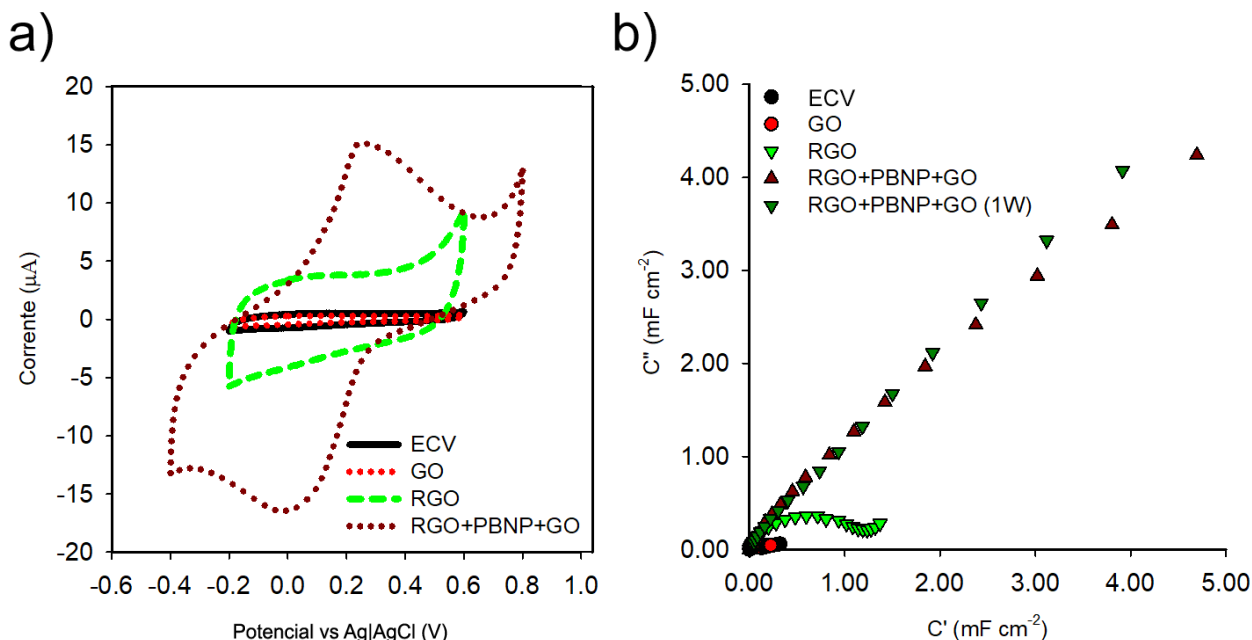


Figura 17 (a) Gráfico dos experimentos de voltametria cíclica realizados nas superfícies de ECV (linha preta), GO (linha vermelha), RGO (linha verde) e RGO+PBNP+GO (linha vermelha escura) em PBS pH 7,4 como eletrólito suporte, faixa de potencial de -0,4V até 0,8V (para RGO+PBNP+GO) e -0,2V até 0,4V (demais superfícies) e taxa de varredura de 100 mV s⁻¹. Foi constatado o aumento da densidade de corrente já esperado na redução do GO e o aparecimento de potenciais definidos de oxidação e redução na superfície de RGO+PBNP+GO dos quais são relacionadas as moléculas de azul da Prússia do sistema. (b) Gráfico de Nyquist de capacitância para as superfícies compostas de ECV (pontos pretos), GO (pontos vermelhos), RGO (triângulos verdes), RGO+PBNP+GO (triângulos vinhos) e após repetidos ciclos de imersão (1W, triângulos verdes escuros). Experimento realizado com PBS pH 7,4 como eletrólito suporte, potencial fixado em 0,14V e faixa de frequência de 1MHz até 30mHz. Nota-se a não definição do ponto de capacitância redox do sistema e instabilidade do sinal em 1W.

Superfície	E _F (V)	J _C (µA cm ⁻²)	J _A (µA cm ⁻²)	ΔE _{C-A} (mV)
11-Fcc	0,445	35	-28	20
RGO+PBNP+GO	0,140	344	-311	203

Tabela 2 Parâmetros eletroquímicos gerais de uma superfície de 11-ferroceno e da superfície de RGO+PBNP+GO. A distância entre os potenciais de oxidação e redução ΔE_{C-A} é cerca de 10 vezes maior na superfície de RGO+PBNP+GO, podendo ser indicativo de instabilidade da superfície pela não reversibilidade do processo redox.

4.1.3 - Superfície 3 - Eletrodo de Carbono Vítreo + Óxido de Grafeno + Nanopartículas de Azul da Prússia (ECV+PBNP+GO):

Para a criação desta superfície foram utilizados eletrodos de carbono vítreo, devidamente polidos e caracterizados e, como eletrólito suporte, uma solução de 0,1M de cloreto de potássio (KCl). A mudança de eletrólito de suporte foi devida a constatação que a solução de PBS afetava a estabilidade do azul da Prússia, possivelmente através da interferência de íons de sódio que são reportados na literatura como bloqueadores de sua atividade redox [49], esse processo, apesar de não instantâneo reduz as propriedades redox do azul da Prússia ao longo do tempo. Posteriormente, foi preparada uma solução contendo 1 mM de cloreto de ferro (III) e 1 mM de hexacianoferrato (III) de potássio que foi utilizada para imersão do eletrodo por 30 minutos. Logo após, foi colocado sobre a superfície do eletrodo 30 μ L da suspensão de óxido de grafeno (0.01 mg/mL) deixando-o em temperatura ambiente até secar. A montagem da superfície é ilustrada na Figura 18.

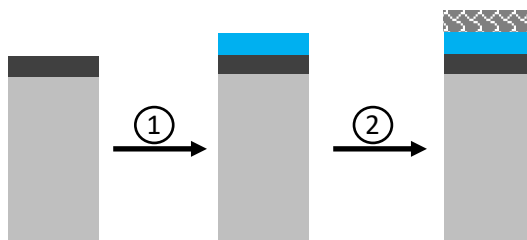


Figura 18 Etapas da produção da superfície PBNP+GO. (1) – Depósito da camada de azul da Prússia (PBNP). (2) – Depósito da camada de óxido de grafeno (GO).

Após isso, o eletrodo foi caracterizado com experimentos de VC e ECE com a finalidade de verificar as propriedades redox da superfície e testar sua estabilidade.

Experimentos de VC mostraram picos de oxidação e redução muito bem definidos (Fig. 19.a) relacionados a atividade redox das moléculas de azul da Prússia. As densidades de corrente catódica e anódica apresentaram valores variando de 180 a 210 μ A cm^{-2} e a distância entre respectivos picos atingiu baixos valores (Tabela 3) dos quais são indicativos para reversibilidade do processo redox, podendo garantir maior estabilidade ao sistema. Também foi verificado sinal capacitivo que pode ser resolvido pela teoria da capacitância redox (Fig. 19.b) com ponto de capacitância redox (C_r) bem definido e elevado (na Figura 19.b, o C_r é de 3.1 mF cm^{-2} , cerca de 155 vezes maior do que em superfícies formadas por monocamadas de 11-ferroceno [34]). Além disso, constatou-se grande estabilidade da

superfície, com variação entre medições subsequentes menor que 1% e lavagens causando variações pouco maiores que 1%.

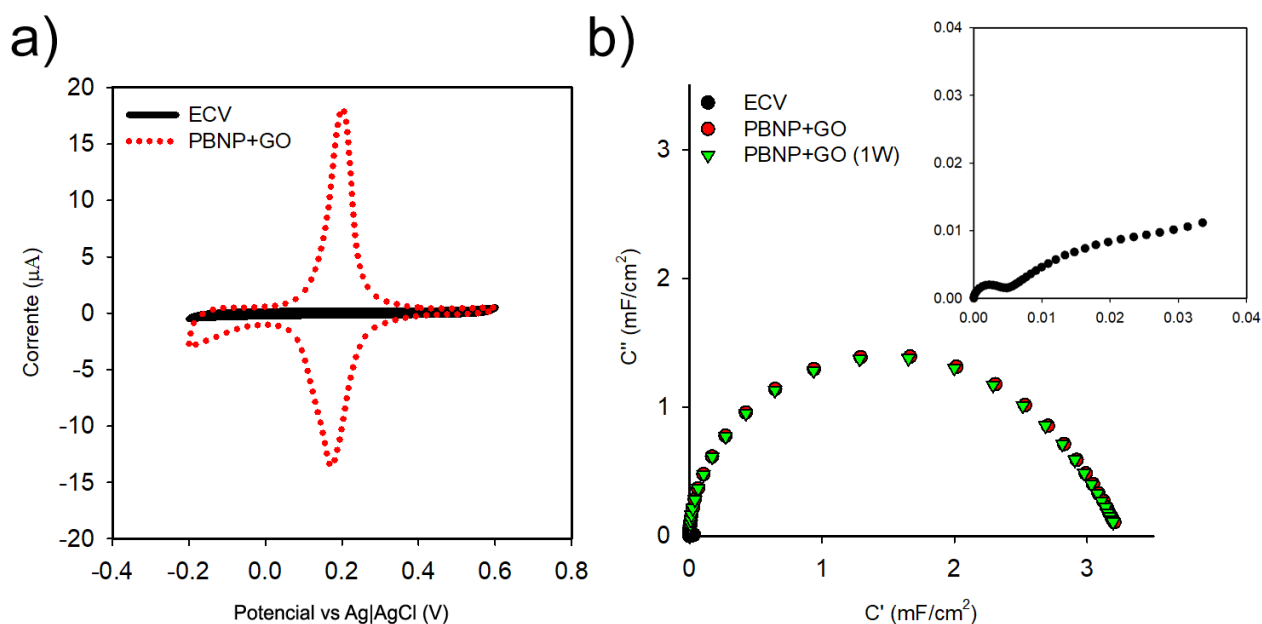


Figura 19 (a) Voltamograma cíclico da superfície de ECV (linha preta) e PBNP+GO (linha vermelha) onde é mostrado picos de redução e oxidação muito bem definidos. (b) Gráfico de Nyquist de capacitância para a superfície de ECV (pontos pretos), PBNP+GO após sua produção (pontos vermelhos) e após incubação (1W, triângulos verdes). Nota-se neste gráfico a grande estabilidade pós-incubação e a definição do ponto de relaxação faradaica, importante para a aplicação da teoria da capacitância redox em sistemas eletroativos. Todos os experimentos foram realizados em meio de KCl 0.1M, na voltametria cíclica, taxa de varredura de 100mV/s e faixa de potencial de -0,2 V até 0,6 V. Na ECE, o potencial foi fixado em 0,186 V e faixa de frequência de 1 MHz até 50 mHz.

Superfície	E_F (V)	J_C ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	J_A ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	ΔE_{C-A} (mV)
11-Fcc	0,445	35	-28	20
PBNP+GO	0,186	563	-411	24

Tabela 3 Parâmetros eletroquímicos gerais de superfícies produzidas a partir de 11-ferroceno e da superfície de PBNP+GO. Nota-se a que a distância entre os potenciais de oxidação e redução (ΔE_{C-A}) é similar em ambos os casos, demonstrando assim, que a superfície de PBNP+GO tem boa reversibilidade no processo redox.

4.2 – Comparação da estabilidade das superfícies estudadas

Considerando que não foi possível obter o valor de C_r em todas as superfícies, a estabilidade do sinal dos sistemas foi aferida considerando a redução percentual dos componentes real e imaginário da capacitância do sistema após ciclos de incubação com o mesmo eletrólito de suporte utilizado nas medições e comparados com o sinal do sistema inicial. Tal medição é um bom indicativo para a estabilidade do sistema, pois, entre estas medições não há a adição de nenhuma molécula que deveria alterar o padrão de resposta capacitiva do sistema.

Com este estudo, verificamos que o sistema de nanopartículas de azul da Prússia com óxido de grafeno sobre o eletrodo de carbono vítreo (CGE+PBNP+GO) mostrou-se o mais estável tendo uma variação inferior a 1% se comparado com a nanoestrutura recém-formada (Figuras 20 e 21).

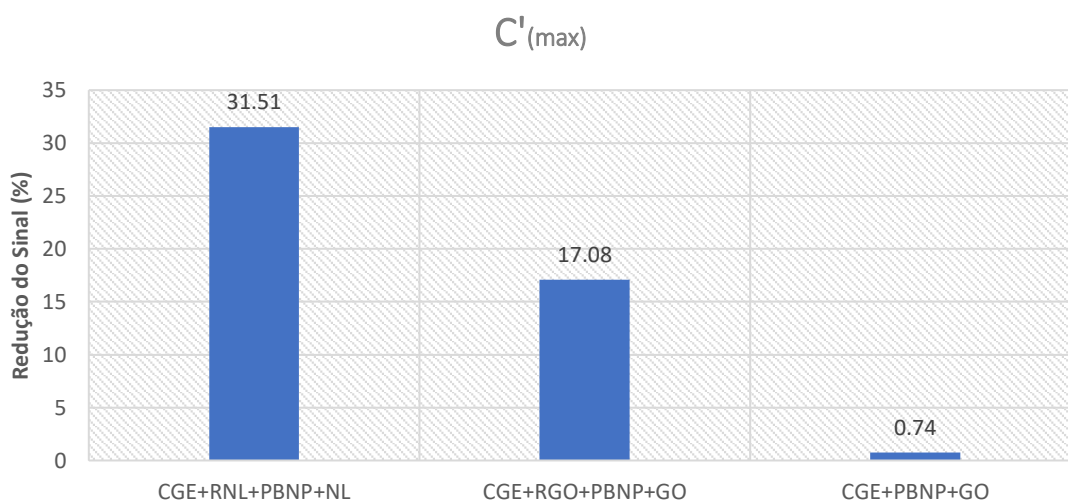


Figura 20 Comparação da redução percentual da componente real do sinal capacitivo, em frequência fixa, após incubação com eletrólito suporte. Verifica-se a estabilidade do sistema CGE+PBNP+GO diante das outras superfícies analisadas.

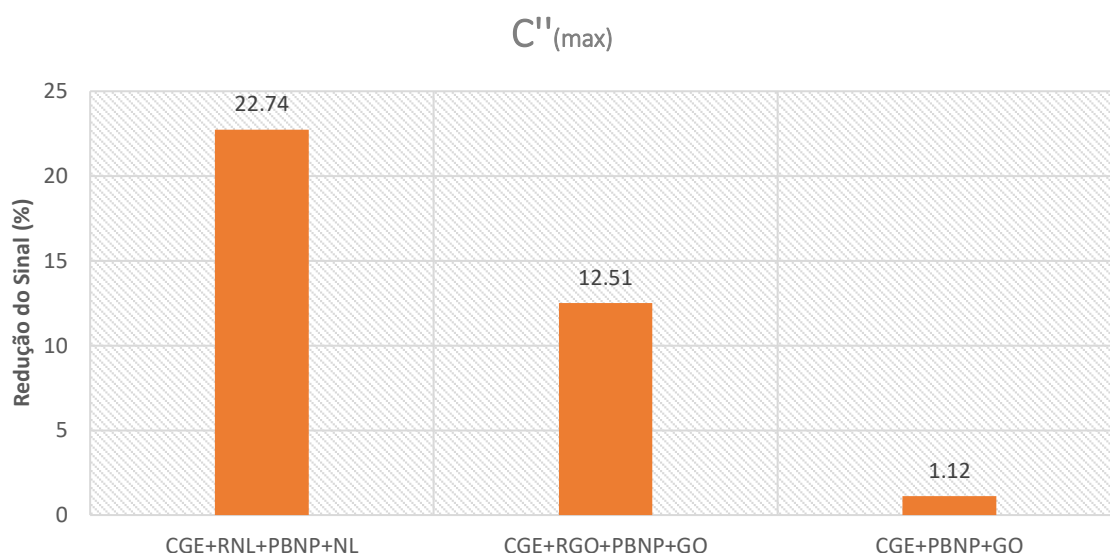


Figura 21 Comparação da redução percentual da componente imaginária do sinal capacitivo, em frequência fixa, após incubação com eletrólito de suporte das nanoestruturas produzidas. A superfície composta por CGE+PBNP+GO mostra-se a mais estável e, portanto, adequada para a utilização em posteriores estudos analíticos.

Deve-se salientar que as nanoestruturas ECV+RNL+PBNP+NL e ECV+RGO+PBNP+GO além de terem resultados de estabilidade insatisfatórios não apresentaram, mesmo em baixas frequências, o ponto relacionado a capacitância redox. Tal fato mostra que estas superfícies apresentam um comportamento eletroquímico incompatível ao modelo [26] para obtenção do sinal de capacitância redox.

Outra metodologia utilizada para avaliar as nanoestruturas formadas foi o teste de Kramers-Kronig, cujo objetivo é analisar partes reais e imaginárias de funções complexas (no nosso caso a função de impedância) validando se o sinal medido apresenta linearidade, estabilidade e causalidade (resposta é somente relacionada ao sinal excitatório).

Neste teste, descrito por Bernard A. Boukamp [50], as curvas obtidas nos experimentos são comparadas com um modelo teórico composto por um circuito especial formado por circuitos RC que representam um sistema ideal. Sistemas que geram valores de ajuste de curva que se aproximem deste modelo ideal podem ser considerados estáveis e lineares. Na tabela 4, é mostrada uma classificação qualitativa dos valores de ajuste de curva por teste de Kramers-Kronig para funções de imitância.

Função	MUITO RUIM	RUIM	RAZOÁVEL	EXCELENTE
$\chi^2(z)$	$a > E10^{-4}$	$E10^{-4} < a < E10^{-5}$	$E10^{-5} < a < E10^{-6}$	$a < E10^{-6}$
$\chi^2(z')$	$a > E10^{-4}$	$E10^{-4} < a < E10^{-5}$	$E10^{-5} < a < E10^{-6}$	$a < E10^{-6}$
$\chi^2(-z'')$	$a > E10^{-4}$	$E10^{-4} < a < E10^{-5}$	$E10^{-5} < a < E10^{-6}$	$a < E10^{-6}$

Tabela 4 Valores de ajuste de curva dos componentes real e imaginário da curva de impedância organizados em termos qualitativos para a avaliação das superfícies eletroativas. Quanto menor valor a curva apresentar, mais próximo ao modelo ideal o sistema se encontra. Valores de referência obtidos do manual do software NOVA 1.11.2, Metrohm Autolab, Holanda.

O teste de Kramers-Kronig foi, então, aplicado a todas as estruturas avaliadas (Tabela 5) e como resultado, observou-se que a única superfície que apresentou valores satisfatórios foi a superfície 3 (PBNP+GO) enquanto todas as outras não apresentaram resultado satisfatório aos requisitos do teste.

Função	RNL+PBNP+NL	GO+PBNP+GO	PBNP+GO
$\chi^2(z)$	1,0E-4	510E-4	5,7E-7
$\chi^2(z')$	3,8E-5	4,4E-5	2,1E-7
$\chi^2(-z'')$	6,7E-5	5,8E-5	3,6E-7

Tabela 5 Resultado dos valores de curva para cada superfície analisada. Verifica-se que a única superfície que apresenta valores compatíveis ao teste de Kramers-Kronig é a superfície PBNP+GO. Todas as outras estruturas tiveram resultados insatisfatórios.

4.3 – Definição da superfície eletroativa para ensaios de biossensoriamento

Nesta primeira parte do trabalho, diversas superfícies nanoestruturadas eletroquimicamente ativas foram estudadas e avaliadas com o intuito de aplicá-las em biossensores eletroquímicos usando a técnica de espectroscopia de capacitância eletroquímica. Somente a superfície composta de PBNP+GO (superfície 3) apresentou resultados satisfatórios em testes de estabilidade de sinal e no teste de Kramers-Kronig, sendo assim, essa estrutura foi selecionada para a segunda parte do trabalho, detalhada a seguir, onde testes foram realizados com objetivo de avaliar a potencialidade da superfície como biossensor eletroquímico.

4.4 - Estudo da superfície de ECV+PBNP+GO e Biossensoriamento

Após definida que a estrutura formada por óxido de grafeno sobre nanopartículas de azul da Prússia possui características favoráveis para o seu uso como plataforma de biossensoriamento eletroquímico, realizou-se estudos com o objetivo de analisar sua morfologia, eletroquímica e seu desempenho como biossensor.

4.4.1 - Caracterização morfológica por MEV e composição por EDS

Com o intuito de obter informações morfológicas do filme composto por nanopartículas de azul da Prússia sobre os eletrodos de carbono vítreo, foi realizada uma caracterização por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Tal experimento foi realizado em eletrodos que não tinham sido mergulhados na solução de azul da Prússia (Fig. 22.A) e em um eletrodo mergulhado por 15 minutos nesta solução (Fig. 22.B), sendo que ambos receberam o mesmo pré-tratamento de limpeza e polimento.

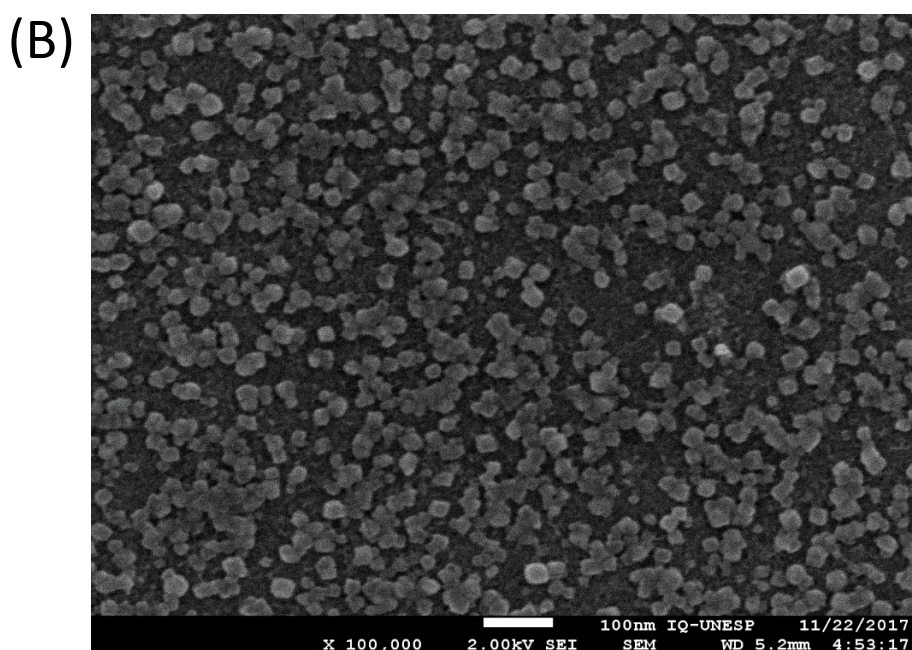
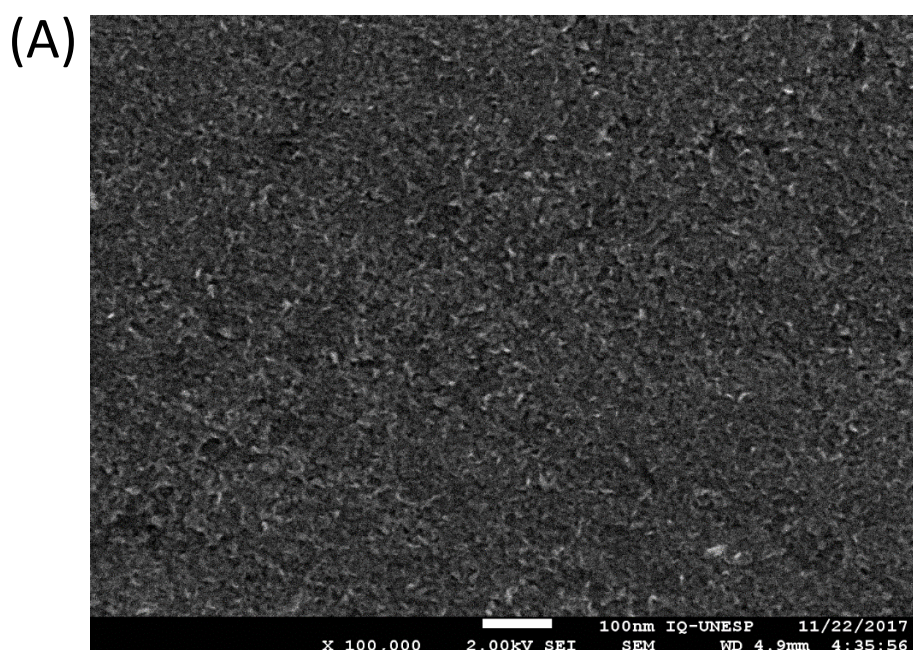


Figura 22 Caracterização por MEV com aumento de 100.000 vezes (A) de uma superfície de eletrodo de carbono vítreo. Verifica-se uma superfície sem presença de partículas, conforme o esperado para uma superfície não funcionalizada. (B) Superfície de eletrodo de carbono vítreo que foi mergulhada por 15 minutos em uma solução 1 mM de azul da Prússia. Neste caso é possível verificar diversas partículas com dimensões nanométricas, indicando assim, a formação de agregados de nanopartículas de azul da Prússia.

A análise topológica das superfícies mostradas acima indicou a presença de nanopartículas de azul da Prússia nos eletrodos de carbono vítreo funcionalizados, sendo o diâmetro médio e distribuição mostrados no gráfico da Figura 23.

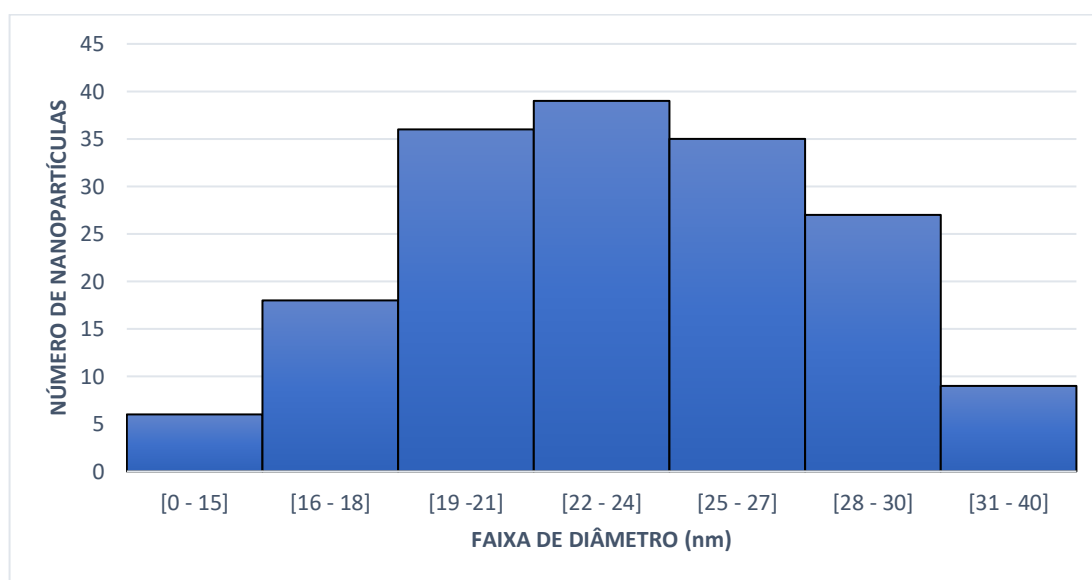


Figura 23 Dispersão do tamanho das nanopartículas de azul da Prússia obtidos por experimento de microscopia eletrônica de varredura e análise por imagem. A média de tamanho das nanopartículas foi 23 nanômetros, ordem de grandeza verificada em outros experimentos [51,52,53]. Para medição e contagem das nanopartículas foi utilizado o software ImageJ com espaço amostral de 170 nanopartículas.

Com o intuito de confirmar que as nanopartículas eram de azul da Prússia foram realizadas medições por EDS na superfície do eletrodo funcionalizado (Figura 24). Com a identificação de picos referentes a átomos de ferro (amplamente presente no azul da Prússia) pode-se confirmar o depósito de nanopartículas de azul da Prússia na superfície do eletrodo de carbono vítreo.

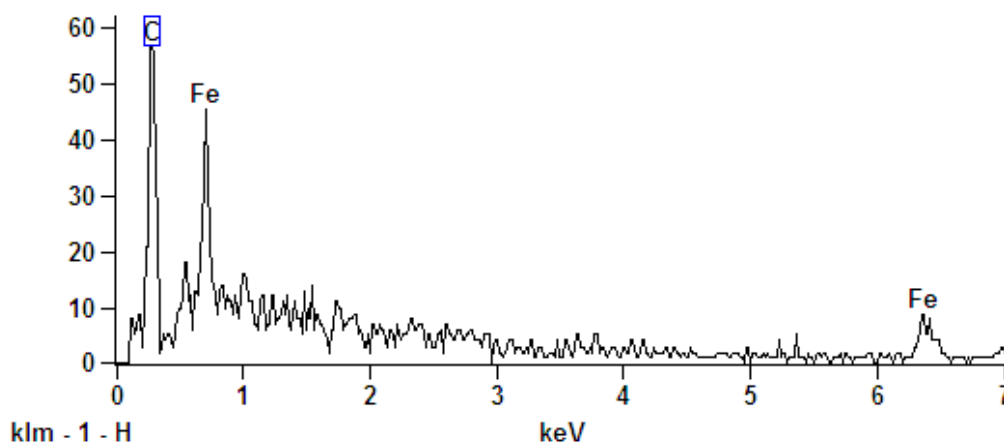


Figura 24 Espectro de EDS da superfície funcionalizada com nanopartículas de azul da Prússia, percebe-se claramente picos referentes a átomos de ferro que estão presentes nas nanopartículas.

4.4.2 - Tempo de imersão com Azul da Prússia

Também foi estudada a influência do tempo de imersão com a solução de azul da Prússia na resposta eletroquímica dos eletrodos. Sendo assim, eletrodos mergulhados nos tempos de 1 a 30 minutos tiveram sua resposta eletroquímica analisada por experimentos de voltametria cíclica.

Como resultado, vemos que há uma tendência do aumento da densidade de corrente, que é relacionada com o maior depósito de nanopartículas de azul da Prússia na superfície que, conseqüentemente, aumenta o número de núcleos redox da superfície do eletrodo.

Um parâmetro termodinâmico que pode ser relacionado com a estabilidade do filme eletroativo é a reversibilidade da reação redox que está associada a distância dos picos de corrente catódico e anódico do sistema eletroativo.

Com o resultado (Fig. 25 e Tabela 6) vemos que, apesar das superfícies obtidas em maior tempo de imersão apresentarem maior densidade de corrente, elas apresentam maior diferença entre seus picos de corrente redox e isso pode influenciar negativamente na estabilidade do filme eletroativo, pois podem representar a presença de reações irreversíveis de oxidação ou redução.

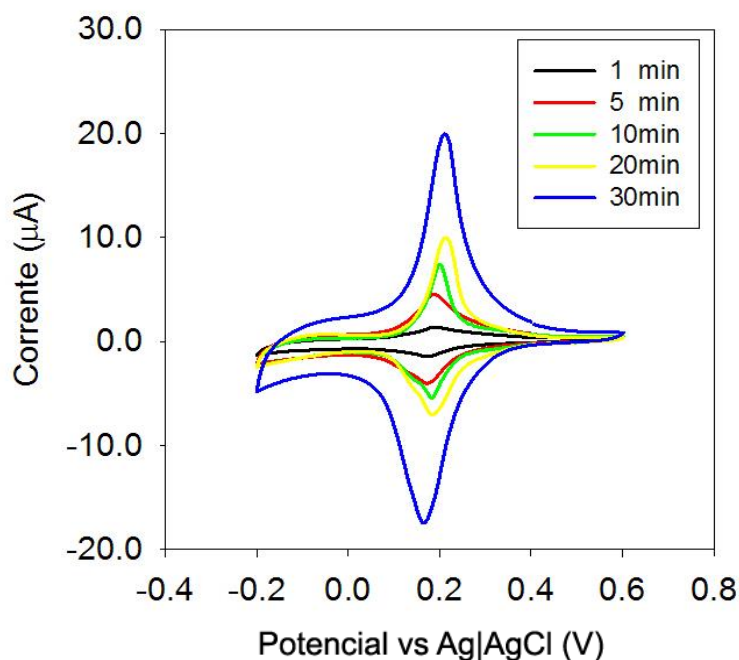


Figura 25 Voltamogramas cíclicos de diferentes tempos de imersão com soluções de azul da Prússia. Nota-se que em tempos maiores há maiores densidades de correntes, mas, também há uma maior distância entre os picos de oxidação e redução.

Com o objetivo de calcular a espessura do filme de azul da Prússia formado foi utilizado um cálculo teórico [54] do qual relaciona a espessura do filme formado com parâmetros obtidos da voltametria cíclica, sendo

$$L = \frac{Q}{FA} \left(\frac{d^3 N_A}{4} \right)$$

Onde L é a espessura do filme de azul da Prússia, Q a quantidade de carga elétrica observado no voltamograma cíclico nos picos redox, A é a área geométrica do eletrodo, F a constante de Faraday, d o tamanho da célula unitária do azul da Prússia (10,17 angstroms) e N_A é o Número de Avogadro.

Apesar deste cálculo corroborar a tendência do crescimento da espessura do filme em maiores tempos de incubação, o valor obtido parece não corresponder a realidade do filme, pois, para o menor tempo de incubação (1 minuto) a espessura calculada (3,3 angstroms) é menor do que o tamanho da aresta da célula unitária do cristal de azul da

Prússia (10,17 angstroms). No entanto, isso pode ser explicado devido ao fato que nem toda a superfície do eletrodo é coberta pelas nanopartículas, sendo assim, a área real de recobrimento é menor do que a área geométrica utilizada no cálculo.

Tempo	jpc ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	jpa ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	ΔE (V)	Pc/Pa	L (nm)
1 min	-14 ± 2	15 ± 2	0,0149	0,93	0,33
5 min	-42 ± 5	52 ± 8	0,0179	0,81	1,03
10 min	-72 ± 11	103 ± 15	0,0164	0,69	1,31
20 min	-85 ± 25	126 ± 35	0,0343	0,67	1,70
30 min	-196 ± 41	250 ± 40	0,0417	0,78	3,98

Tabela 6 Relação dos tempos de imersão com parâmetros eletroquímicos da superfície: jpc – pico de corrente catódica; jpa – pico de corrente anódica; ΔE – diferença entre picos de corrente anódico e catódico; Pc/Pa – razão entre pico de corrente catódico e anódico.

4.5 - Funcionalização da superfície com anticorpo

Após produzida a superfície de ECV+PBNP+GO com procedimentos descritos na sessão 4.1.3, os eletrodos tiveram seus grupamentos carboxílicos provenientes da camada de óxido de grafeno ativados pela solução contendo 0,4 M de EDC e 0,1M de NHS. Com a superfície devidamente ativada, os eletrodos foram incubados com o anticorpo de interesse e sítios ativos remanescentes foram bloqueados com solução de BSA para evitar ligações inespecíficas.

Completa então estava a estrutura eletroquimicamente ativa, base para o biossensor. Tal estrutura foi caracterizada por voltametria cíclica e espectroscopia de capacitância, tendo-se os padrões mostrados na Figura 26.

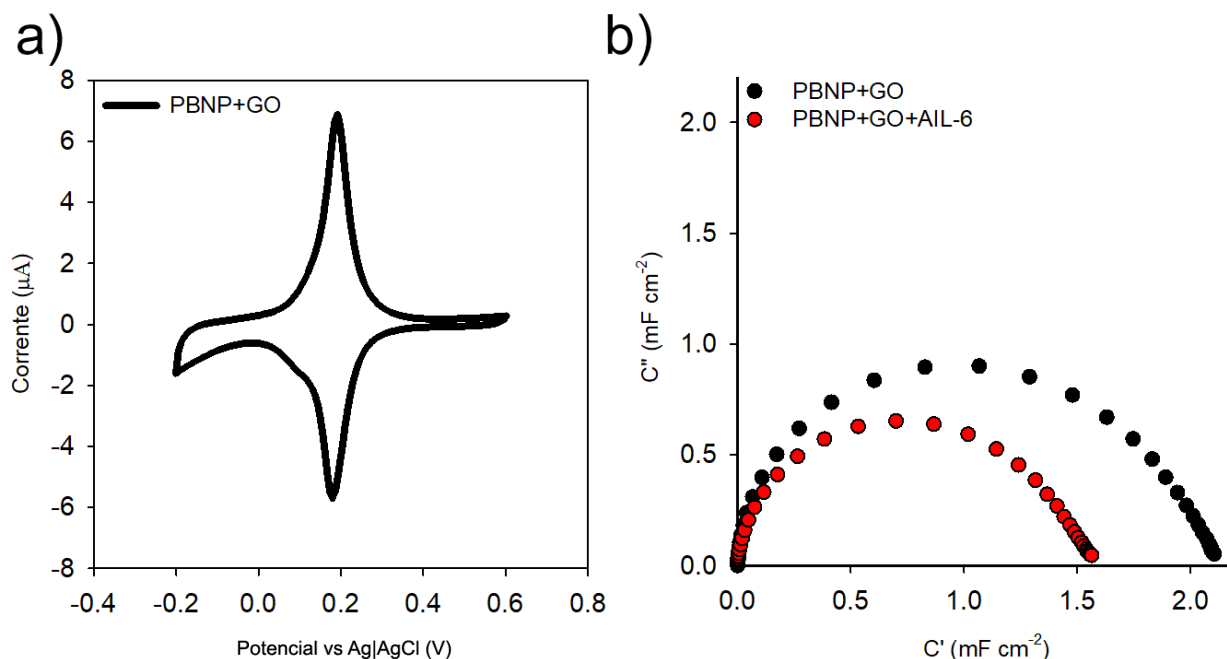


Figura 26 (a) Experimento de voltametria cíclica e (b) espectroscopia de capacitância eletroquímica nas superfícies de PBNP+GO e PBNP+GO mais PBNP+GO+AIL-6 respectivamente. Todos os experimentos utilizaram KCl 0,1M como eletrólito suporte. Na VC a taxa de varredura utilizada foi 100mVs-1 e faixa de potencial varrido de -0,2 V até 0,6 V. Na ECE, o potencial foi fixado em 0,186 V e faixa de frequência varrida de 1 MHz até 50 mHz.

Verifica-se na voltametria um padrão redox bem definido e na capacitância a resposta é compatível a teoria da capacitância redox. Nota-se também que a funcionalização da superfície com anticorpo gera uma redução da capacitância esperada pela interferência eletrônica causada pelas moléculas de anticorpo aos centros redox das moléculas de azul da Prússia.

4.6 – Desempenho analítico da superfície receptiva PBNP+GO+Anti-IL-6:

Para verificar o desempenho da superfície como biossensor foram realizados experimentos dos quais avaliaram variadas concentrações do alvo biológico IL-6 e, como controle negativo, utilizou-se concentrações da proteína fetuína.

Tendo-se as superfícies de PBNP+GO devidamente funcionalizadas com Anti-IL-6 e após a estabilização de seu sinal, os eletrodos foram testados contra seis concentrações do antígeno IL-6 variando sua concentração de 0,2 ng/mL até 20 $\mu\text{g/mL}$. Os eletrodos foram incubados com a solução contendo o antígeno por 30 minutos e, posteriormente, foi então

verificada a capacitância do sistema por ECE. Na Figura 27 é exemplificado o padrão de resposta obtido por um único eletrodo (o mesmo padrão foi seguido por outros eletrodos testados). Percebe-se significativa alteração do nível de resposta capacitiva contra concentrações de IL-6. Na curva analítica, utilizando o desvio padrão e curva de calibração da superfície, o limite de detecção calculado foi de 1,4 ng/mL e limite de quantificação de 57,0 ng/mL.

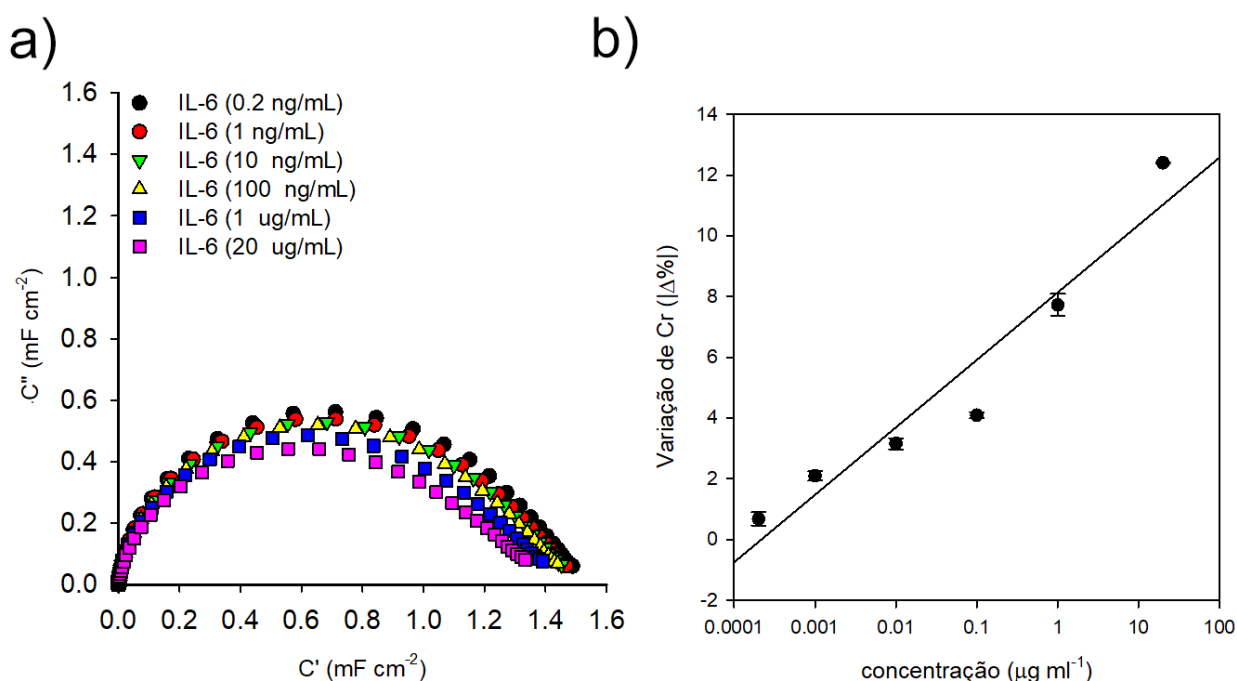


Figura 27 (a) Resposta de capacitância em função das concentrações do antígeno alvo IL-6 e (b) respectiva curva analítica. Experimento realizado em KCl 0,1 M como eletrólito suporte, potencial fixado em 0,188V e faixa de frequência varrida de 1 MHz até 50 mHz.

Após a medição contra as seis concentrações do antígeno alvo, foi realizado o controle negativo do sistema com duas concentrações de fetuína em KCl 0,1M, sendo a concentração máxima 10 vezes superior do que a maior concentração de IL-6 testada (200 $\mu\text{g/mL}$). Neste experimento podemos verificar que não houve alteração significativa do valor da capacitância redox do sistema (Fig. 28.a) onde a diferença de resposta foi cerca de 11 vezes menor do que o observado da superfície contra seu alvo específico.

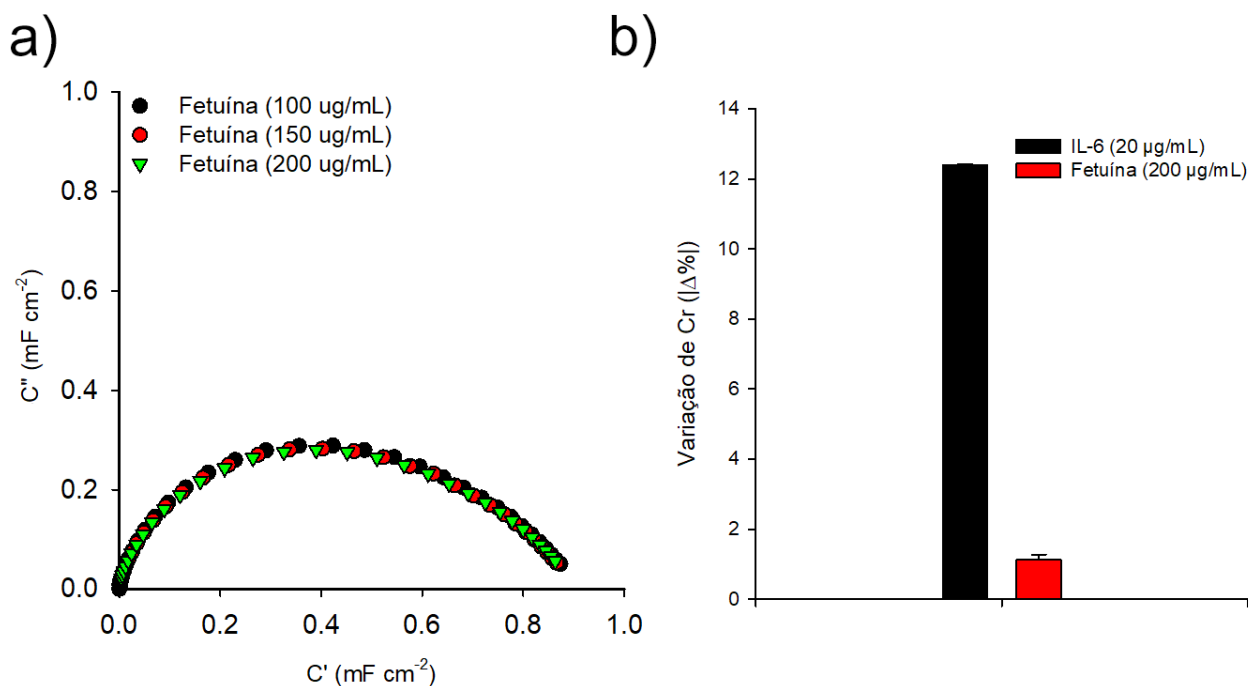


Figura 28 (a) Resposta de capacitância da superfície de PBNP+GO+Anti-IL-6 contra concentrações do controle negativo (fetuína) – teste realizado com eletrodos testados anteriormente contra concentrações de IL-6 - e (b) respectiva comparação da resposta contra IL-6. Experimento realizado em KCl 0,1M como eletrólito suporte, potencial fixado em 0,182V e faixa de frequência de 1 MHz até 50 mHz.

Com o intuito de dar maior confiabilidade aos resultados obtidos, mais dois testes de controle negativo foram realizados neste sistema. O controle negativo utilizando eletrodos recém preparados e não testados anteriormente contra concentrações de IL-6 é mostrado na figura 29, onde, mesmo com concentrações iguais ou superiores às testadas contra IL-6, teve resposta cerca de 4 vezes menor. Esse resultado foi complementado com outro teste de controle negativo mostrado na figura 30, onde foi utilizado um anticorpo não específico contra IL-6 (Anti-HER2) e concentrações de IL-6. Como era de se esperar, pela superfície estar funcionalizada com um anticorpo que não tem afinidade pelo o alvo testado, a resposta foi cerca de 2,3 vezes menor do que a obtida da superfície de Anti-IL-6 contra IL-6. Portanto, todos os resultados de controle negativo testados corroboram a ideia de que a superfície de PBNP+GO+Anti-IL-6 respondeu seletivamente contra concentrações de IL-6.

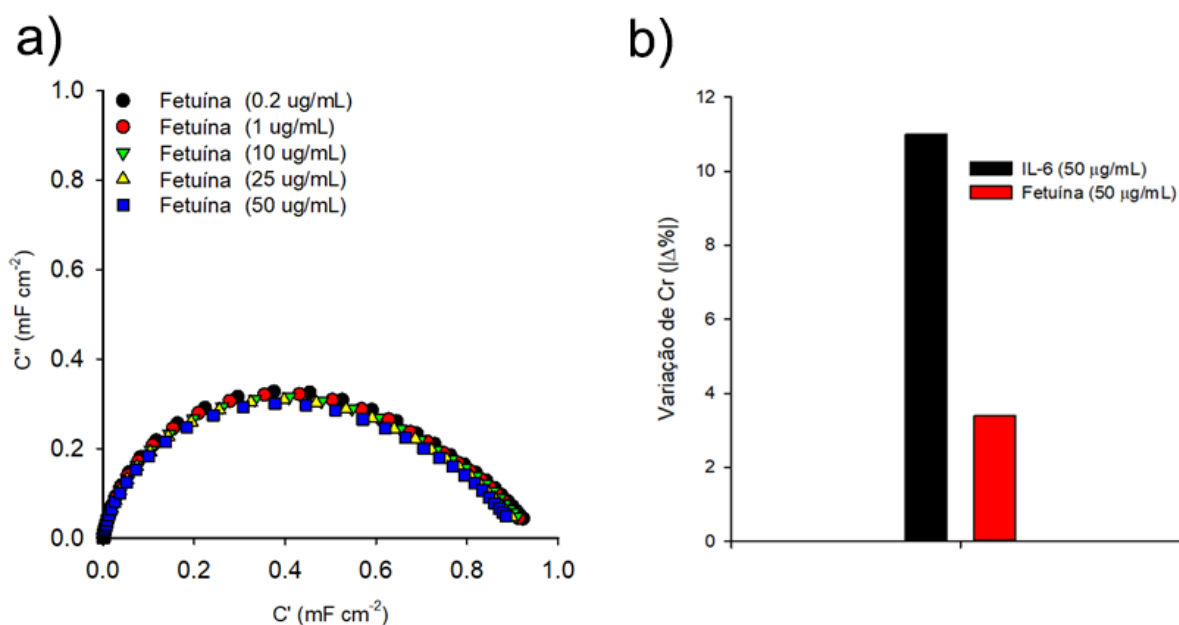


Figura 29 (a) Resposta de capacitância da superfície de PBNP+GO+Anti-IL-6 contra concentrações do controle negativo (fetuína) – neste caso testado diretamente contra concentrações de fetuína - e (b) respectiva comparação da resposta contra IL-6. Experimento realizado em KCl 0,1M como eletrólito suporte, potencial fixado em 0,182V e faixa de frequência de 1 MHz até 50 mHz.

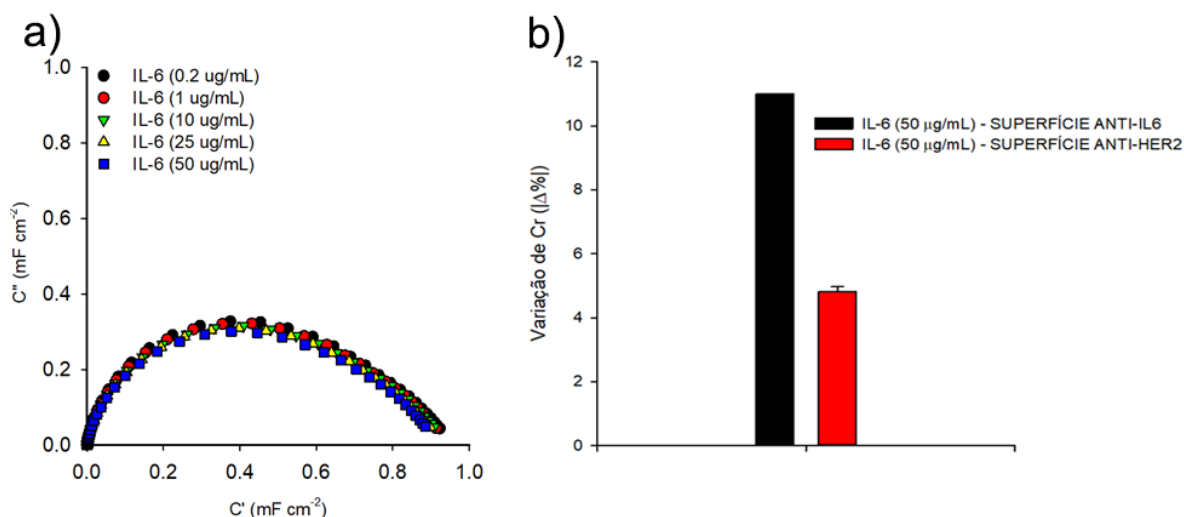


Figura 30 (a) Resposta de capacitância da superfície de PBNP+GO+Anti-HER2 contra concentrações do controle negativo (fetuína) e (b) respectiva comparação da resposta contra Anti-IL6- vs IL-6. Experimento realizado em KCl 0,1M como eletrólito suporte, potencial fixado em 0,182V e faixa de frequência de 1 MHz até 50 mHz.

Finalmente, foi realizada uma análise estatística do sinal de resposta (superfície de anti-IL-6 contra IL-6) e a variação de sinal presente em medições com controle negativo (fetuína) ou superfícies não responsivas (com anti-HER2 ao invés de anti-IL6). O objetivo deste teste é avaliar se as medições de resposta do sensor seriam apenas variações

esperadas da alteração da resposta capacitiva do sensor, não relacionadas à fenômenos de detecção.

Para tanto, foi aplicado o teste t-Student para um conjunto de amostra com 33 graus de liberdade (perfazendo um total de 35 amostras).

MEDIDAS INÓCUAS (CONTRA FETUÍNA OU UTILIZANDO A-HER2 CONTRA IL-6)

N	$\Delta C''$	N	$\Delta C''$	N	$\Delta C''$	N	$\Delta C''$
1	1%	8	2%	15	0%	22	1%
2	2%	9	3%	16	2%	23	0%
3	2%	10	1%	17	3%	24	0%
4	3%	11	1%	18	1%	25	1%
5	2%	12	1%	19	1%	26	1%
6	2%	13	2%	20	1%	27	0%
7	1%	14	2%	21	1%		

MEDIDAS DE DETECÇÃO (A-IL6 CONTRA IL-6)

N	$\Delta C''$	N	$\Delta C''$	N	$\Delta C''$
1	7%	4	7%	7	7%
2	10%	5	8%	8	8%
3	6%	6	12%		

Tabela 7 Medidas de variação de sinal capacitivo ($\Delta C''$) de alvos ou superfícies inócuas (variação de sinal não relacionada a fenômenos de detecção) e de detecção (da superfície de anti-IL-6 contra seu respectivo antígeno). Para medidas inócuas: Média = 1,41%, desvio padrão = 0,76%, número de amostras 27. Para medidas de detecção: Média = 8%, desvio padrão = 2,04%, número de amostras 8.

Sendo calculado o valor teórico de $t = 9$, o que comprava com mais de 99% de confiança, que as medidas de resposta contra o alvo biológico não são variações aleatórias da resposta capacitiva do sensor.

Com base nessas análises, verificou-se que a superfície de PBNP+GO funcionou como transdutor eletroquímico da interação antígeno-anticorpo para IL-6, representando assim, um imunossensor eletroquímico.

No entanto, o limite de detecção e de quantificação estão muito acima dos níveis séricos medidos em indivíduos saudáveis (1,46 pg/mL) [55] ou da faixa clinicamente relevante para diagnóstico de câncer [56]. Salienta-se que isso não invalida a proposta

inicial de construção de um novo biossensor eletroquímico por medições de capacitância, servindo assim como prova de conceito para a utilização de superfícies redox (não baseadas em monocamadas) para biossensoriamento.

Vale a pena ressaltar que, por se tratar de medidas provenientes de experimentos envolvendo fenômenos de capacitância eletroquímica, a relação do peso molecular entre alvo e elemento de reconhecimento é de grande relevância. Isso pode ser constatado por trabalhos anteriores realizados utilizando a mesma técnica onde quanto maior a relação de peso molecular encontrada entre o elemento receptor utilizado e respectiva molécula alvo gera maior responsividade de biossensoriamento [57][58]. Portanto, pode-se justificar a baixa responsividade do sistema como consequência desta relação dimensional entre a molécula alvo de IL-6 (26 kDa) e seu respectivo anticorpo (150 kDa).

5. Conclusões

Como resultado, este projeto produziu inédito biossensor capacitivo baseado em superfície com propriedade redox (azul da Prússia) tendo como características, boa estabilidade, facilidade de produção e, em conjunto com materiais carbonáceos, apresenta possibilidade de ser funcionalizado com outros elementos de reconhecimento biológico.

Apesar de apresentar limite de detecção 100 vezes maior do que o requerido em ensaios médicos [56] destaca-se que o diferencial deste biossensor é não depender de monocamadas para a produção de um sinal capacitivo redox. Tal fato é de grande relevância, pois, o controle de superfície de sensores baseados em monocamadas é bastante rígido e laborioso. Além disso, outra vantagem a ser destacada é a possibilidade da utilização de solventes mais próximos àqueles encontrados em amostras biológicas (meios salinos) o que não é possível em biossensores capacitivos já bem estabelecidos como monocamadas de 11-ferroceno.

Sendo assim, o projeto apresenta um novo tipo de superfície para biossensores capacitivos baseado em nanopartículas e moléculas de óxido de grafeno, da qual pode ser base para futuras arquiteturas ainda mais robustas e eficientes.

Referências

- 1 TURNER, A. P. F. Biosensors: sense and sensibility. *Chemical Society Reviews*, v. 42, n. 8, p. 3184, 2013.
- 2 LEE, J. W.; FIGEYS, D.; VASILESCU, J. Biomarker Assay Translation from Discovery to Clinical Studies in Cancer Drug Development: Quantification of Emerging Protein Biomarkers. In: *Advances in Cancer Research*. [s.l.] Elsevier, 2006. p. 269–298.
- 3 MEYER, M. H. F. et al. CRP determination based on a novel magnetic biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 22, n. 6, p. 973–979, jan. 2007.
- 4 STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 14, n. 2, p. 159–173, abr. 2003.
- 5 HUNG TZANG, C.; YUAN, R.; YANG, M. Voltammetric biosensors for the determination of formate and glucose-6-phosphate based on the measurement of dehydrogenase-generated NADH and NADPH. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 16, n. 3, p. 211–219, maio 2001.
- 6 LEI, W. et al. Conducting polymer composites with graphene for use in chemical sensors and biosensors. *Microchimica Acta*, v. 181, n. 7–8, p. 707–722, 17 jan. 2014.
- 7 FERNANDES, F. C. B. et al. Comparing label free electrochemical impedimetric and capacitive biosensing architectures. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 57, p. 96–102, jul. 2014.
- 8 DANIELS, J. S.; POURMAND, N. Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges. *Electroanalysis*, v. 19, n. 12, p. 1239–1257, jun. 2007.
- 9 SANTOS, A. Fundamentals and Applications of Impedimetric and Redox Capacitive Biosensors. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, v. S7, n. 12, 2014.
- 10 LEHR, J. et al. Label-free Capacitive Diagnostics: Exploiting Local Redox Probe State Occupancy. *Analytical Chemistry*, v. 86, n. 5, p. 2559–2564, 12 fev. 2014.
- 11 BAHADIR, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/biowarfare analyses. *Analytical Biochemistry*, v. 478, p. 107–120, jun. 2015.

- 12 DAMBORSKY, P.; VITEL, J.; KATRLIK, J. Optical biosensors. *Essays In Biochemistry*, v. 60, n. 1, p. 91–100, 30 jun. 2016.
- 13 NGUYEN, H. et al. Surface Plasmon Resonance: A Versatile Technique for Biosensor Applications. *Sensors*, v. 15, n. 5, p. 10481–10510, 5 maio 2015.
- 14 RAMANATHAN, K.; DANIELSSON, B. Principles and applications of thermal biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 16, n. 6, p. 417–423, ago. 2001.
- 15 SKLÁDAL, P. Piezoelectric biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 79, p. 127–133, maio 2016.
- 16 NEWMAN, J. D.; SETFORD, S. J. Enzymatic Biosensors. *Molecular Biotechnology*, v. 32, n. 3, p. 249–268, 2006.
- 17 YOO, E.-H.; LEE, S.-Y. Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. *Sensors*, v. 10, n. 5, p. 4558–4576, 4 maio 2010.
- 18 ELLINGTON, A. D.; SZOSTAK, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, v. 346, n. 6287, p. 818–822, ago. 1990.
- 19 Exploring the Potential of Whole Cell Biosensor: A Review in Environmental Applications. Aisyah W.N. et al. Disponível em: <http://www.isaet.org/images/extraimages/K314057.pdf>. Acesso em: 23 Ago. 2018.
- 20 SHARMA, S.; BYRNE, H.; O'KENNEDY, R. J. Antibodies and antibody-derived analytical biosensors. *Essays In Biochemistry*, v. 60, n. 1, p. 9–18, 30 jun. 2016.
- 21 ORAZEM, M. E.; TRIBOLLET, B. *Electrochemical Impedance Spectroscopy*. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2008.
- 22 GRIESHABER, D. et al. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors*, v. 8, n. 3, p. 1400–1458, 7 mar. 2008.
- 23 ECKERMANN, A. L. et al. Electrochemistry of redox-active self-assembled monolayers. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 254, n. 15–16, p. 1769–1802, ago. 2010.
- 24 LISDAT, F.; SCHÄFER, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 391, n. 5, p. 1555–1567, 16 abr. 2008.
- 25 BUENO, P. R.; MIZZON, G.; DAVIS, J. J. Capacitance Spectroscopy: A Versatile Approach To Resolving the Redox Density of States and Kinetics in Redox-Active Self-Assembled Monolayers. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 116, n. 30, p. 8822–8829, 23 jul. 2012.

- 26 BUENO, P. R.; FABREGAT-SANTIAGO, F.; DAVIS, J. J. Elucidating Capacitance and Resistance Terms in Confined Electroactive Molecular Layers. *Analytical Chemistry*, v. 85, n. 1, p. 411–417, 18 dez. 2012.
- 27 GÓES, M. S. et al. A Dielectric Model of Self-Assembled Monolayer Interfaces by Capacitive Spectroscopy. *Langmuir*, v. 28, n. 25, p. 9689–9699, 11 jun. 2012.
- 28 BISQUERT, J. et al. A review of recent results on electrochemical determination of the density of electronic states of nanostructured metal-oxide semiconductors and organic hole conductors. *Inorganica Chimica Acta*, v. 361, n. 3, p. 684–698, fev. 2008.
- 29 BUENO, P. R.; DAVIS, J. J. Measuring Quantum Capacitance in Energetically Addressable Molecular Layers. *Analytical Chemistry*, v. 86, n. 3, p. 1337–1341, 16 jan. 2014.
- 30 NUZZO, R. G.; ALLARA, D. L. Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, v. 105, n. 13, p. 4481–4483, jun. 1983.
- 31 CHAKI, N. K.; VIJAYAMOHANAN, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 17, n. 1–2, p. 1–12, jan. 2002.
- 32 WILLNER, I. et al. Electrical Wiring of Glucose Oxidase by Reconstitution of FAD-Modified Monolayers Assembled onto Au-Electrodes. *Journal of the American Chemical Society*, v. 118, n. 42, p. 10321–10322, jan. 1996.
- 33 PORTER, M. D. et al. Spontaneously organized molecular assemblies. 4. Structural characterization of n-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared spectroscopy, and electrochemistry. *Journal of the American Chemical Society*, v. 109, n. 12, p. 3559–3568, jun. 1987.
- 34 FERNANDES, F. C. B. et al. Label free redox capacitive biosensing. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 50, p. 437–440, dez. 2013.
- 35 LV, P. et al. A novel immunosensor for carcinoembryonic antigen based on poly(diallyldimethylammonium chloride) protected prussian blue nanoparticles and double-layer nanometer-sized gold particles. *Microchimica Acta*, v. 171, n. 3–4, p. 297–304, 22 ago. 2010.
- 36 HERREN, F. et al. Neutron diffraction study of Prussian Blue, $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Location of water molecules and long-range magnetic order. *Inorganic Chemistry*, v. 19, n. 4, p. 956–959, abr. 1980.

- 37 Molecule of the Week Archive Prussian blue. ACS. Disponível em: <<https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/p/prussian-blue.html>> Acesso em: 23 Ago. 2018.
- 38 MORTIMERPERMANENT ADDRESS: DEPARTME, R. J.; REYNOLDS, J. R. In situ colorimetric and composite coloration efficiency measurements for electrochromic Prussian blue. *Journal of Materials Chemistry*, v. 15, n. 22, p. 2226, 2005.
- 39 BUENO, P. R. et al. Synchrotron Structural Characterization of Electrochemically Synthesized Hexacyanoferrates Containing K⁺: A Revisited Analysis of Electrochemical Redox. *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 112, n. 34, p. 13264–13271, ago. 2008.
- 40 LUPU, S. et al. Electrochemical preparation and characterisation of bilayer films composed by Prussian Blue and conducting polymer. *Electrochemistry Communications*, v. 4, n. 10, p. 753–758, out. 2002.
- 41 BUENO, P. R. et al. Changeover during in Situ Compositional Modulation of Hexacyanoferrate (Prussian Blue) Material. *Journal of the American Chemical Society*, v. 128, n. 51, p. 17146–17152, dez. 2006.
- 42 BUENO, P. R. et al. Electrochromic Switching Mechanism of Iron Hexacyanoferrates Molecular Compounds: The Role of Fe²⁺(CN)₆ Vacancies. *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 113, n. 22, p. 9916–9920, 7 maio 2009.
- 43 KARYAKIN, A. A.; KARYAKINA, E. E.; GORTON, L. The electrocatalytic activity of Prussian blue in hydrogen peroxide reduction studied using a wall-jet electrode with continuous flow. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 456, n. 1–2, p. 97–104, set. 1998.
- 44 KARYAKIN, A.; KARYAKINA, E.; GORTON, L. Prussian-Blue-based amperometric biosensors in flow-injection analysis. *Talanta*, v. 43, n. 9, p. 1597–1606, set. 1996.
- 45 FENG, D. et al. Label-free electrochemical immunosensor for the carcinoembryonic antigen using a glassy carbon electrode modified with electrodeposited Prussian Blue, a graphene and carbon nanotube assembly and an antibody immobilized on gold nanoparticles. *Microchimica Acta*, v. 180, n. 9–10, p. 767–774, 6 abr. 2013.
- 46 GUTIERREZ, F. A. et al. Mesoscopic behaviour of multi-layered graphene: the meaning of supercapacitance revisited. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 19, n. 9, p. 6792–6806, 2017.

- 47 YAO, Y.; BAI, X.; SHIU, K.-K. Spontaneous Deposition of Prussian Blue on Multi-Walled Carbon Nanotubes and the Application in an Amperometric Biosensor. *Nanomaterials*, v. 2, n. 4, p. 428–444, 27 nov. 2012.
- 48 BAI, X.; SHIU, K.-K. Spontaneous Deposition of Prussian Blue on Reduced Graphene Oxide - Gold Nanoparticles Composites for the Fabrication of Electrochemical Biosensors. *Electroanalysis*, v. 27, n. 1, p. 74–83, 9 out. 2014.
- 49 KARYAKIN, A. A. Prussian Blue and Its Analogues: Electrochemistry and Analytical Applications. *Electroanalysis*, v. 13, n. 10, p. 813–819, jun. 2001.
- 50 BOUKAMP, B. A. A Linear Kronig-Kramers Transform Test for Immittance Data Validation. *Journal of The Electrochemical Society*, v. 142, n. 6, p. 1885, 1995.
- 51 UEMURA, T.; OHBA, M.; KITAGAWA, S. Size and Surface Effects of Prussian Blue Nanoparticles Protected by Organic Polymers. *Inorganic Chemistry*, v. 43, n. 23, p. 7339–7345, nov. 2004.
- 52 MING, H. et al. Size- and shape-controlled synthesis of Prussian Blue nanoparticles by a polyvinylpyrrolidone-assisted crystallization process. *CrystEngComm*, v. 14, n. 10, p. 3387, 2012.
- 53 ZAMPARDI, G. et al. Potassium (De-)insertion Processes in Prussian Blue Particles: Ensemble versus Single Nanoparticle Behaviour. *Chemistry - A European Journal*, v. 23, n. 57, p. 14338–14344, 12 set. 2017.
- 54 SIPERKO, L. M. Electrochemical and Spectroscopic Studies of Metal Hexacyanometalate Films. *Journal of The Electrochemical Society*, v. 130, n. 2, p. 396, 1983.
- 55 RIDKER, P. M. et al. Plasma Concentration of Interleukin-6 and the Risk of Future Myocardial Infarction Among Apparently Healthy Men. *Circulation*, v. 101, n. 15, p. 1767–1772, 18 abr. 2000.
- 56 KHOSRAVI, F.; LOEIAN, S.; PANCHAPAKESAN, B. Ultrasensitive Label-Free Sensing of IL-6 Based on PASE Functionalized Carbon Nanotube Micro-Arrays with RNA-Aptamers as Molecular Recognition Elements. *Biosensors*, v. 7, n. 4, p. 17, 17 abr. 2017.
- 57 BEDATTY FERNANDES, F. C. et al. Optimized Diagnostic Assays Based on Redox Tagged Bioreceptive Interfaces. *Analytical Chemistry*, v. 87, n. 24, p. 12137–12144, 3 dez. 2015.
- 58 PICCOLI, J. et al. Redox Capacitive Assaying of C-Reactive Protein at a Peptide Supported Aptamer Interface. *Analytical Chemistry*, v. 90, n. 5, p. 3005–3008, 7 fev. 2018.