



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

André Olean Oliveira

**Desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos baseados em
nanopartículas de ouro recobertas por polímeros condutores redox para o
monitoramento de marcadores biológicos**

São José do Rio Preto

2022

André Olean Oliveira

Desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos baseados em nanopartículas de ouro recobertas por polímeros condutores redox para a determinação de marcadores biológicos

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Nome do Programa, junto ao Programa de Pós-Graduação em Nome do Programa, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Marcos F. S. Teixeira

Coorientador: Prof. Dr. Gilberto O. Brito

São José do Rio Preto

2022

O48d

Oliveira, André Olean

Desenvolvimento de Imunossensores Eletroquímicos Baseados em Nanopartículas de Ouro Recobertas por Polímeros Condutores Redox para a Determinação de Marcadores Biológicos / André Olean Oliveira. -- São José do Rio Preto, 2022

169 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Marcos F. S. Teixeira

Coorientadora: Gilberto O. Brito

1. Eletroquímica. 2. Química Analítica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

André Olean Oliveira

**Desenvolvimento de Imunossensores Eletroquímicos Baseados em
Nanopartículas de Ouro Recobertas por Polímeros Condutores Redox para o
Monitoramento de Marcadores Biológicos**

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Nome do Programa,
junto ao Programa de Pós-Graduação em Nome do
Programa, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências
Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Marcos F. S. Teixeira
UNESP – Campus Presidente Prudente
Orientador

Profa. Dra. Elen Julciléia Romão Sartori Braz
UEL – Londrina/PR

Profa. Dra. Sonia Tomie Tanimoto
SENAI – Três Lagoas/MS

Prof. Dr. André Luiz dos Santos
UFU – Ituiutaba/MG

Profa. Dra. Silvania Lanfredi
UNESP – Campus Presidente Prudente

São José do Rio Preto
08 de março de 2022

Dedico esse trabalho para meus pais,
Maria de Fátima e Manoel.
Minha Esposa Gabriela.
E ao meu irmão Tiago.

Agradecimentos

Gostaria de iniciar dizendo que esse foi um dos melhores momentos durante a construção da presente tese. Poder destacar e agradecer pessoas especiais que estiveram envolvidas durante esse processo.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pelo dom da vida e por me manter na fé, para sempre resistir perante os desafios, buscando sempre fazer o meu melhor.

À minha Mãe e ao meu Pai, por serem meus maiores exemplos de coragem, otimismo, fé, trabalho, união e amor. Por me ensinarem a tratar as responsabilidades com compromisso e dedicação. Por sempre estarem ao meu lado me incentivando, acalmando ou encorajando, me dando todo o apoio e suporte necessário para que eu conseguisse lutar pelos meus sonhos.

Ao meu irmão Tiago, sou igualmente grato. Por todo o apoio, amizade, companheirismo e pelos momentos de descontração. Também pela incrível oportunidade de poder atuar em parceria em trabalhos científicos.

Ao Prof. Dr. Marcos F. S. Teixeira, meu grande irmão! Por todos esses anos de amizade e orientação. Por ser um exemplo de amor a ciência. Por toda confiança depositada em minha capacidade e pela oportunidade de desenvolver o presente trabalho. Também, por todos seus ensinamentos, conselhos e discussões científicas, seja elas no laboratório ou em um *happy hour* com boa cerveja, contribuindo imensamente para meu desenvolvimento como pessoa, pesquisador e futuro cientista.

À Profa. Dra. Patrícia M. Seraphim, pela imensurável contribuição para este trabalho e por todos os trabalhos em parceria. Agradeço enormemente por todos esses anos de amizade. (Enfim a dívida do *cupcake* foi paga!).

Ao Prof. Dr. Celso X. Cardoso, por toda parceria e trabalhos em colaboração.

Ao Prof. Gilberto O. Brito, pelas valiosas horas em encontros online debatendo e discutindo as diferentes áreas da química. Obrigado pela amizade, orientação e contribuições científicas.

À Profa. Dra. Silvania Lanfredi, pela oportunidade de poder colaborar em um grande trabalho.

À Profa. Dra. Elen Sartori, por todas as contribuições para presente tese e pelos grandes trabalhos que tive a grata oportunidade de colaborar.

Aos amigos de laboratório GPES, Heitor, Kevin, Gabriel Masiero, Gabriel Zaia, Jaqueline, Miquéias, Natalia, Tainá e Vinicius, pelas horas trabalhadas e partilha de bons momentos acompanhadas de cafés.

Ao Me. Yuri A. Oliveira, um irmão que a ciência me deu. Por toda amizade, parceria, conselhos, descontração e por ser um exemplo de persistência e coragem.

Ao Me. Fabiano Praxedes, antigo colega de classe que durante o doutorado tornou-se companheiro de pesquisa e de reuniões (intermináveis) do Conselho de Química da Pós. Agradeço também pela disponibilidade para realização das medidas de DRX e ATR-FTIR.

Ao Centro de Desenvolvimento de Materiais Funcionais (CDMF/CEPID/FAPESP).

Aos docentes e funcionários do Departamento de Química e Bioquímica da FCT – UNESP, Ana Flora, Ana Pires, Beatriz, Eduardo, Gustavo, Sérgio, Silvânia, Valdemiro e Angélica, pelo carinho e ótima convivência durante esses anos.

Aos técnicos de laboratório, Sidney, Gabriel, Marcelo e Murillo, sempre dispostos a contribuir.

Aos amigos de longa data do Ana Jacinta, em especial aos amigos Jean Yamada, Jéfferson (Pajé), Felipe Mendes, Renan Schafer, Renan (MTB), Lucas (Chicó), Vitor (Chitão), André (Dé), Giovani (Teta), Gleisson (Feio), Rafael (Rato), André (Toty), Thiago (Cagão), Alberson, Paulo (Paulinho), Rafael (Pelo), Gustavo (Mênór), João e Luiz (Luizinho), pela sincera amizade de todos esses anos.

À minha segunda família, Paulo, Rosimeire e Eduarda, pelo imenso amor e carinho com o qual eu sempre fui e sou recebido. Sou grato por todo apoio e por fazerem com que eu me sinta como um filho.

À minha esposa Gabriela. Que alegria poder retornar a uma página de agradecimento e atualizá-la de namorada a cônjuge. Agradeço por todos esses anos de companheirismo, estando ao meu lado em todos os momentos dessa minha caminhada. Por sempre acreditar em mim e em meus sonhos. Obrigado por todo apoio e incentivo. Eu não teria conseguido sem você ao meu lado.

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

Informações Curriculares

Me. André Olean-Oliveira

Data de Nascimento: 17/11/1992

olean.oliveira.a@gmail.com

Departamento de Química e Bioquímica

Faculdade de Ciências e Tecnologia-Universidade Estadual Paulista (FCT/UNESP)

Presidente Prudente, São Paulo, Brasil

Graduação

2016	Química	UNESP – Presidente Prudente-SP/Brasil
------	---------	---------------------------------------

Pós-graduação

2019	Mestrado em Química	UNESP - São José do Rio Preto-SP/Brasil
------	---------------------	---

2022	Doutorado em Química	UNESP - São José do Rio Preto-SP/Brasil
------	----------------------	---

Produção

Capítulo de Livro

1. A. Olean-Oliveira, Marcos F. S. Teixeira, Camila F. Pereira, Camila K. S. Matsu, Eroína F. Santiago, Nátaly M. Vergílio, Patrik D. S. Gois, Danielle C. Santos, Chemistry Show: The Use of Demonstrative Experiments for the Dissemination of Science in the Environment Week FCT/UNESP, in: C. Acadêmica (Ed.), NÚCLEOS ENSINO DA UNESP Artig. 2015, São Paulo, 2015: p. 590.

Publicações

h-index 6 (Web of Science 02/2022)

- [1] A. Olean-Oliveira, P. Monteiro Seraphim, M.F.S. Teixeira, Methylated DNA impedimetric immunosensor based on azo-polymer-AuNPs dots and 5-methylcytosine antibody using dissolved oxygen as a redox probe, *Electrochem. Commun.* 136 (2022) 107242. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.elecom.2022.107242>.
- [2] A. Olean-Oliveira, G.A. Oliveira Brito, C.X. Cardoso, M.F.S. Teixeira, Nanocomposite Materials Based on Electrochemically Synthesized Graphene Polymers: Molecular Architecture Strategies for Sensor Applications, *Chemosens.* 9 (2021). <https://doi.org/10.3390/chemosensors9060149>.
- [3] H.F. Trevizan, A. Olean-Oliveira, C.X. Cardoso, M.F.S. Teixeira, Development of a Molecularly Imprinted Polymer for Uric Acid Sensing Based on a Conductive Azopolymer: Unusual Approaches Using Electrochemical Impedance/Capacitance Spectroscopy Without a Soluble Redox Probe, *Sensors Actuators B Chem.* (2021) 130141. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130141>.
- [4] J. Scremin, A. Olean-Oliveira, C.A.R. Salamanca-Neto, G.S. Ceravolo, R.F.H. Dekker, A.M. Barbosa-Dekker, C.E. Banks, M.F.S. Teixeira, E.R. Sartori, Application of botryosphaeran as a carbon black adherent on a glassy carbon electrode for the electrochemical determination of cyclobenzaprine, *Electrochim. Acta.* 379 (2021) 138176.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.electacta.2021.138176>.

- [5] Y.A. Oliveira, A. Olean-Oliveira, M.F.S. Teixeira, Short communication: Molecular architecture based on palladium-salen complex/graphene for low potential water oxidation, *J. Electroanal. Chem.* 880 (2021) 114928. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114928>.
- [6] A. Olean-Oliveira, G.A. Oliveira Brito, M.F.S. Teixeira, Mechanism of Nanocomposite Formation in the Layer-by-Layer Single-Step Electropolymerization of π -Conjugated Azopolymers and Reduced Graphene Oxide: An Electrochemical Impedance Spectroscopy Study, *ACS Omega*. (2020). <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03391>.
- [7] C.S. Martin, A. Olean-Oliveira, M.F.S. Teixeira, A new polymeric thin film by using electropolymerization: thin film of poly(phenazine-salen) obtained from 2,2'-[1,2-ethanediylbis(nitrilomethylidyne)]-bis[4-amino-phenol], *J. Electroanal. Chem.* 873 (2020) 114404. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114404>.
- [8] J.C. Pacheco, A. Olean-Oliveira, M.F.S. Teixeira, Understanding the Performance of a Nanocomposite Based on a Conjugated Azo-Polymer and Reduced Graphene Oxide with Photoelectrically Switchable Properties by Analyzing the Potential Profile during Photocurrent Generation, *Macromol. Chem. Phys.* 221 (2020) 2000225. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/macp.202000225>.
- [9] N.A. Alves, A. Olean-Oliveira, C.X. Cardoso, M.F.S. Teixeira, Photochemiresistor Sensor Development Based on a Bismuth Vanadate Type Semiconductor for Determination of Chemical Oxygen Demand, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 12 (2020) 18723–18729. <https://doi.org/10.1021/acscami.0c04259>.
- [10] C.A.R. Salamanca-Neto, A. Olean-Oliveira, J. Scremin, G.S. Ceravolo, R.F.H. Dekker, A.M. Barbosa-Dekker, M.F.S. Teixeira, E.R. Sartori, Carboxymethyl-botryosphaeran stabilized carbon nanotubes aqueous dispersion: A new platform design for electrochemical sensing of desloratadine, *Talanta*. 210 (2020) 120642. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120642>.
- [11] A. Olean-Oliveira, J.C. Pacheco, P.M. Seraphim, M.F.S. Teixeira, Synergistic effect of reduced graphene oxide/azo-polymer layers on electrochemical performance and application as nonenzymatic chemiresistor sensors for detecting superoxide anion radicals, *J. Electroanal. Chem.* 852 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.113520>.
- [12] A. Olean-Oliveira, T. Olean-Oliveira, A.C.R. Moreno, P.M. Seraphim, M.F.S. Teixeira, A Chemiresistor Sensor Based on Azo-Polymer and Graphene for Real-Time Monitoring of Mitochondrial Oxygen Consumption, *ACS Sensors*. 4 (2019). <https://doi.org/10.1021/acssensors.8b01013>.
- [13] C.F. Pereira, A. Olean-Oliveira, D.N. David-Parra, M.F.S. Teixeira, A chemiresistor sensor based on a cobalt(salen) metallopolymer for dissolved molecular oxygen, *Talanta*. 190 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.07.080>.
- [14] A. Olean-Oliveira, C.F. Pereira, D.N. David-Parra, M.F.S. Teixeira, Electrocatalytic Study of the Thin Metallopolymer Film of [2,2'-{1,2-Ethanediylbis[Nitrilo(1E)-1-Ethyl-1-Ylidene]}Diphenolate]-Nickel(II) for Ethanol Electrooxidation, *ChemElectroChem*. 5 (2018). <https://doi.org/10.1002/celec.201800532>.
- [15] A. Olean-oliveira, M.F.S. Teixeira, Development of a nanocomposite chemiresistor sensor based on π -conjugated azo polymer and graphene blend for detection of dissolved oxygen, *Sensors Actuators B Chem.* 271 (2018) 353–357. <https://doi.org/S0925400518310372>.

Prêmio

Melhor trabalho da área de exatas no XXVI Jornadas De Jóvenes Investigadores AUGM, Asociación De Universidades Grupo Montevideo.

Patente

André Olean-Oliveira, Patrícia M. Seraphim, Marcos F. S. Teixeira - “Sensor Eletroquímico para Glut-4 Baseado em Polímero Condutor-Nanopartícula de Ouro” – Agência Unesp de Inovação (UNESP) 2021. INPI Code: BR 10 2021 021811 8

Experiência Profissional

Professor de Química

Ensino médio:

2016 - 2017 – Colégio São Paulo

2016 - 2017 – Colégio Apogeu

Professor Bolsista Ensino Superior:

2021 – Universidade Estadual Paulista (FCT-UNESP) – Química Analítica para o Curso de Engenharia Ambiental

2022 – Universidade Estadual Paulista (FCT-UNESP) – Química Analítica para o Curso de Engenharia Ambiental

2022 – Universidade Estadual Paulista (FCT-UNESP) – Análise Instrumental para o Curso de Licenciatura em Química

Editor Convidado:

2021 – Special Issue “Novel Nanomaterials: Photoelectric Properties and Their Applications in Sensors” in Molecules (MDPI)

Divulgador científico:

2011 - 2017 – Trupe Quimiatividade – Apresentações e palestras interativas para escolas públicas e particulares da região de Presidente Prudente-SP.

RESUMO

A presente tese reúne os estudos e esforços dedicados ao desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos baseados em nanopartículas de ouro recobertas por polímeros condutores redox para o monitoramento de biomarcadores de interesses clínicos. Modificações genéticas e epigenéticas são fenômenos com ocorrência natural, sendo a principal responsável pela diversidade entre organismos. Contudo, fatores ambientais podem influenciar as taxas de mutações havendo como consequência doenças graves como o câncer. Assim, o desenvolvimento de tecnologias confiáveis e acessíveis que possibilitem o monitoramento de biomarcadores indicadores de anomalias genéticas pode auxiliar no diagnóstico precoce, aumentando significativamente as chances de recuperação. Por esse motivo, foram construídos dois imunossensores eletroquímicos baseados em espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) para detecção e quantificação dos biomarcadores de espécies de DNA metilado e facilitador de transporte de glicose 4 (GLUT-4). Os materiais nanocompósitos desenvolvidos foram obtidos por técnica de eletropolimerização em etapa única, tendo como base os monômeros de Bismark Brown Y (BBY) e Tionina (TH). Os filmes formados foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG), revelando nanoestruturas de ouro recobertas pelos polímeros condutores redox. Para imobilização dos anticorpos sobre a superfície dos nanocompósitos foi utilizada a estratégia de adsorção física para o poli(TH)-AuNPs e por ligação covalente para o poli(azo-BBY)-AuNPs. No melhor de nossos esforços, foi verificado que o mecanismo de detecção proposto na presente tese é inédito na literatura. Ele foi baseado na utilização do oxigênio dissolvido como mediador redox, não sendo preciso etapas extras para a marcação ou adição de mediadores redox na solução de análise. Por fim, verificou-se o desempenho analítico dos imunossensores, onde o imunossensor de poli(azo-BBY)-AuNPs apresentou limites de detecção de $0,64 \text{ pg mL}^{-1}$ para espécies de DNA metilado enquanto o imunossensor de poli(TH)-AuNPs apresentou limite de detecção de $38,0 \text{ pg mL}^{-1}$. Ambos os valores são satisfatórios para aplicação na análise de amostras de interesses clínico e acadêmico.

Palavras-chave: Sensor de DNA Metilado. Sensor de GLUT-4. Imunossensor eletroquímico. Nanopartícula de ouro-polímero. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.

ABSTRACT

The present thesis the studies and efforts dedicated to the development of electrochemical immunosensors based on gold nanoparticles coated with redox conducting polymers for the detection of biomarkers of medical interest. Genetic and epigenetic modifications are naturally occurring phenomena, being the main responsible for the diversity among organisms. However, environmental factors can influence mutation rates resulting in serious diseases such as cancer. Thus, the development of reliable and accessible technologies that allow the monitoring of biomarkers showing genetic anomalies can help in early diagnosis, significantly increasing the chances of recovery. For this reason, two electrochemical immunosensors were constructed based on electrochemical impedance spectroscopy (EIS) for the detection and quantification of biomarkers of methylated DNA species and glucose transport facilitator 4 (GLUT-4). The nanocomposite materials developed were obtained by single-step electropolymerization technique, based on Bismarck Brown Y (BBY) and Thionine (TH) monomers. The formed films were characterized by field emission gun scanning electron microscopy (FEG-SEM), revealing gold particles covered by redox conducting polymers. For the immobilization of antibodies on the surface of the nanocomposites, the strategy of physical adsorption was used for poly(TH)-AuNPs and by covalent bonding for poly(azo-BBY)-AuNPs. In the best of our efforts, was verified that the detection mechanism proposed in the present thesis is unprecedented in the literature. It was based on the use of dissolved oxygen as a redox mediator, requiring no extra steps to label or add redox mediators to the analysis solution. Finally, the analytical performance of the immunosensors was verified, where the poly(azo-BBY)-AuNPs immunosensor presented detection limits of 0.64 pg mL^{-1} for methylated DNA species while the poly(TH)- AuNPs had a detection limit of 38.0 pg mL^{-1} . Both values are satisfactory for application in the analysis of samples for clinical and academic interests.

Keywords: DNA methylation sensor. Glut-4 sensor. Electrochemical immunosensor. Gold nanoparticle-polymers. Electrochemical impedance spectroscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -Imagem ilustrativa da localização e estrutura do DNA em uma célula eucarionte. A mutação genética ocorre por alteração na sequência do código genético.	24
Figura 2 -Representação esquemática para mutação genética e mutação epigenética. O exemplo apresentado foi baseado na reação epigenética de metilação da citosina mediado pela enzima metiltransferase (DNAMT).	26
Figura 3-A) Representação esquemática para reação de metilação da citosina mediada pela DNA metiltransferase e B) representação dos níveis de metilação global e sua associação com tumorigênese.	28
Figura 4 -Diagrama esquemático para a expressão dos facilitadores de transporte de glicose em células saudáveis (A) e células cancerosas (B).	31
Figura 5 -Representação esquemática para a forma clássica de ensaios imunométricos.	32
Figura 6 -Representação esquemática para as formas de imunoensaio direto (A e B) e imunoensaio competitivo (C).	34
Figura 7-A) Estrutura 3D de uma molécula de anticorpo. B) Representação esquemática de um anticorpo destacando suas regiões.	36
Figura 8 -Ilustração esquemática para as formas de imobilização e as possíveis orientações dos anticorpos sobre substrato.	38
Figura 9 -Representação esquemática para o mecanismo de resposta de um imunossensor eletroquímico label-free baseado em espectroscopia de impedância eletroquímica.	40
Figura 10 -Representação esquemática do sinal de perturbação de uma interface eletroquímica (A) e das representações gráficas de Nyquist e BODE para o sinal de resposta (B).	41
Figura 11-A) Estrutura química do poliacetileno para exemplificação da cadeia polimérica com ligações π -conjugadas. B) Representação esquemática dos orbitais moleculares antes e após oxidação (a) ou redução (b) da cadeia polimérica. Os estados polarônicos foram exemplificados a partir da estrutura do politiofeno.	46
Figura 12 – Estrutura molecular do azo corante Bismark Brown Y.	48
Figura 13-A) Mecanismo redox do grupo azo por reação química (A) e eletroquímica (B). C) Imagem esquemática do comportamento de interruptor molecular apresentado pelo filme de poli(azo-BBY).	49

Figura 14 -Estrutura molecular do corante tionina.....	50
Figura 15-A) Representação esquemática das características e dimensões da célula eletroquímica para as imunorreações. B) Imagens dos eletrodos antes (i) e após (ii) a modificação com o filme nanocompósito.	58
Figura 16-A) Representação esquemática do eletrodo impresso utilizado para fabricação do imunossensor de GLUT-4. B) Imagem do eletrodo modificado com filme de poli(TH)-AuNPs.	59
Figura 17 -Imagens dos eletrodos de FTO após eletropolimerização e eletrodeposição. A) Filme de poli(azo-BBY), B) filme de poli(azo-BBY)-AuNPs e C) eletrodo modificado com AuNP.....	60
Figura 18 -Imagens dos eletrodos de FTO após eletropolimerização e eletrodeposição. A) Filme de poli(TH), B) filme de poli(TH)-AuNPs e C) eletrodo modificado com AuNPs.	61
Figura 19 -Ilustração das etapas de construção do imunossensor. Os números abaixo estão representando as etapas de modificação.	63
Figura 20 -Representação esquemática do preparo do imunossensor para GLUT-4. Os números abaixo estão representando as etapas de modificação.....	64
Figura 21 -Voltamogramas cíclicos para a eletropolimerização dos filmes de poli(azo-BBY)-AuNPs (A), poli(azo-BBY) (B) e eletrodeposição de nanopartículas de ouro (C) aplicado 20 ciclos de potenciais com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} em HCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. $T=25^\circ$ e atmosfera de N_2	68
Figura 22 -Mecanismo de formação do filme de poli(azo-BBY).....	72
Figura 23 -Ilustração para a formação do filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-AuNPs sobre a superfície do eletrodo de FTO.	73
Figura 24 -Difratograma de raios X dos eletrodos de FTO, poli(azo-BBBY)@AuNP/FTO e poli(azo-BBY)/FTO.....	74
Figura 25 -Imagens obtidas por técnica de microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG) sobre os eletrodos de poli(azo-BBY)-AuNPs/FTO (A) e AuNP/FTO (B). 75	
Figura 26 -Histograma com os valores de diâmetro médio das nanopartículas no filme de poli(azo-BBY)@AuNP.....	76
Figura 27 -Voltamogramas cíclicos para a resposta eletroquímica dos filmes de poli(azo-BBY)@AuNP (A), poli(azo-BBY) (B) e AuNP (C) em solução de PBS $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,40) com velocidade de varredura de 25 mV s^{-1} . $T=25^\circ$ e atmosfera de N_2	78

Figura 28- Voltamograma cíclico para resposta eletroquímica do filme de poli(azo-BBY)-AuNPs (A) e poli(azo-BBY) (B) em solução de PBS 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,40) saturado somente com o gás N₂ (linha preta) e somente com o gás O₂ (linha vermelha) com velocidade de varredura de 25 mV s⁻¹. C) Voltamograma comparativo para resposta em oxigênio dissolvido. D) Magnificação para região de reação de redução de oxigênio destacando os valores de potencial de onset.

..... 80

Figura 29-A) Espectros de Nyquist para os filmes de poli(azo-BBY)-AuNPs e poli(azo-BBY) em solução de PBS 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,40) saturado com gás O₂. Potencial aplicado de -0,30 V (vs. ECS). B) Magnificação do espectro para a região de alta frequência. O Fit linear é referente ao ajuste matemático do modelo de circuito equivalente da **Figura 32**. 81

Figura 30-Espectro de BODE para os filmes de poli(azo-BBY)-AuNPs e poli(azo-BBY) em solução de PBS 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,40) saturado com gás O₂. Potencial aplicado de -0,30 V (vs. ECS). 82

Figura 31- Espectro de BODE para os filmes de poli(azo-BBY)-AuNPs e poli(azo-BBY) em solução de PBS 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,40) saturado com gás O₂. Potencial aplicado de -0,30 V (vs. ECS). 83

Figura 32-Modelo de circuito equivalente proposto para o filme de poli(azo-BBY)-AuNPs e também utilizado para filme de poli(azo-BBY). 84

Figura 33-Espectros obidos para a ativação do filme de poli(azo-BBY)-AuNPs antes (• preta) e após 5 minutos de incubação com glutaraldeído (• azul). A) Espectro de Nyquist, B) espectro de capacitância complexa e C) gráfico de capacitância versus impedância real. 89

Figura 34-Espectros obidos para a modificação da superfície do filme de poli(azo-BBY)@AuNP-GA antes (• azul) e após (• verde) 30 minutos de incubação com anticorpo Ab-5-mC. A) Espectro de Nyquist, B) espectro de capacitância complexa e C) gráfico de capacitância versus impedância real. 91

Figura 35-Espectros obidos para a modificação do filme de poli(azo-BBY)-AuNPs-GA-Ab antes (• verde) e após 30 minutos de incubação com a proteína BSA (• vermelha). A) Espectro de Nyquist, B) espectro de capacitância complexa (ampliada) e C) gráfico de capacitância versus impedância imaginária. 94

Figura 36-Espectro de Nyquist para o imunossensor de poli(azo-BBY)-AuNPs-GA-Ab-BSA em solução aquosa de PBS 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,40) saturada com os gases N₂, O₂ e ar atmosférico. Potencial aplicado de -0,30 V (vs. ECS). 95

Figura 37 -Variação relativa dos valores de R_{redox} em função do tempo de incubação do filme de poli(azo-BBY)-AuNPs com glutaraldeído. A barra de erro é relativa ao desvio padrão para a resposta de três diferentes eletrodos.	96
Figura 38 - Variação relativa dos valores de R_{redox} em função do tempo de incubação do filme de poli(azo-BBY)-AuNPs-GA com o anticorpo Ab-5-mC. A barra de erro é relativa ao desvio padrão para a resposta de três diferentes eletrodos.....	97
Figura 39 - Variação relativa dos valores de R_{redox} em função do tempo de incubação do filme de poli(azo-BBY)-AuNPs-GA-Ab com a proteína BSA. A barra de erro é relativa ao desvio padrão para a resposta de três diferentes eletrodos.	98
Figura 40 -Variação relativa dos valores de R_{redox} em função do tempo de incubação do filme de poli(azo-BBY)-AuNPs-GA-Ab-BSA frente ao padrão de 5-metilcitosina. A barra de erro é relativa ao desvio padrão para a resposta de três diferentes eletrodos.	99
Figura 41 -A) Espectros de Nyquist (A) e suas respectivas curvas analíticas (B e C) para a resposta do imunossensor frente a diferentes concentrações de 5-mC em solução de PBS 0,05 mol L ⁻¹ (pH 7,40) em O ₂ saturado em equilíbrio atmosférico. A barra de erro representa o desvio padrão para o mesmo eletrodo em três diferentes experimentos.	101
Figura 42 -Relação Linear de [5-mC]xCr versus [5-mC]. Forma de isoterma de Langmuir usada para o complexo 5-mC/Ab-5mC.	103
Figura 43 -A) Espectros de Nyquist para calibração do imunossensor de DNA metilado realizada em solução de PBS 0,05 mol L ⁻¹ com potencial aplicado de -0,30 V. Os espectros na cor preta representam as adições de padrão de 5-mC e na cor vermelha o espectro obtido para a amostra real. B) Curva de calibração e quantificação da amostra.....	104
Figura 44 -Voltamograma cíclico para a eletropolimerização do filme de poli(TH) pela aplicação de 30 ciclos de potenciais com velocidade de varredura de 20 mV s ⁻¹ em solução de HCl 0,10 mol L ⁻¹ com 10 mmol L ⁻¹ do monômero tionina. T=25° e atmosfera de N ₂	105
Figura 45 -Resposta eletroquímica do filme de poli(TH) em solução de KCl 0,50 mol L ⁻¹ em atmosfera de N ₂ . A) Espectros de Nyquist para os potenciais aplicados de -0,40 V to +0,65 V vs. ECS (de i a viii). B) Voltametria cíclica registrada em velocidade de varredura de 25 mV s ⁻¹ . As formas reduzida e oxidada do polímero estão sendo representadas no gráfico de voltametria cíclica.....	108
Figura 46 -Modelo de circuito equivalente para ajustes matemáticos sobre espectros obtidos para o filme de poli(TH).	109

Figura 47 -Valores de R_{ct} em função do potencial aplicado. Os valores de resistência foram obtidos a partir do ajuste matemático feito sobre modelo de circuito equivalente da Figura 46 .	110
Figura 48 -Valores de W em função do potencial aplicado. Os valores do elemento de Warburg foram obtidos a partir do ajuste matemático feito sobre modelo de circuito equivalente da Figura 46 .	111
Figura 49 -Valores de CPE_{filme} em função do potencial aplicado. Os valores de capacitância foram obtidos a partir do ajuste matemático feito sobre modelo de circuito equivalente da Figura 46 .	112
Figura 50 -Voltamogramas cíclicos para a eletropolimerização dos filmes de poli(TH) em solução de 10 mmol L^{-1} de tionina em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl. Foram aplicados 10 ciclos de potenciais e velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} com intervalo de potencial de: (A) $-0,30$ a $+0,80 \text{ V}$; (B) $-0,30$ a $+1,0 \text{ V}$; (C) $-0,30$ a $+1,4 \text{ V}$; e (D) $-0,30$ a $+1,60 \text{ V}$ (vs. ECS). Atmosfera de N_2 e $T = 25^\circ\text{C}$.	114
Figura 51 - Valores de R_{redox} obtidos através de ajuste matemático utilizando modelo de circuito equivalente para os espectros dos filmes de poli(TH) construídos com diferentes intervalos de potenciais.	115
Figura 52 - Valores de resistência de transferência de carga (R_{redox}) em função do número de ciclos aplicado durante a etapa de eletropolimerização obtidos através de ajuste matemático utilizando modelo de circuito equivalente.	116
Figura 53 - Valores de resistência de transferência de carga (R_{redpx}) em função da velocidade de varredura aplicada durante a etapa de eletropolimerização obtidos através de ajuste matemático utilizando modelo de circuito equivalente dos filmes de poli(TH).	118
Figura 54 -Voltamogramas cíclicos para eletropolimerização dos filmes de poli(TH) com 30 ciclos de potenciais aplicados a uma velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} em $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ do monômero de tionina em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl (A), HNO_3 (B), H_2PO_4 (C) e H_3PO_4 (D) sob atmosfera de N_2 a 25°C .	119
Figura 55 -Espectro de Nyquist para filmes construídos com diferentes eletrólitos de suporte. Potencial aplicado de $+0,20 \text{ V}$ vs. ECS em KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ ($pH = 2,0$). N_2 atm e 25°C .	121
Figura 56 -Valores de parâmetros interfaciais versus raio hidratado do ânion utilizados durante a etapa de eletropolimerização. A) Resistência da interface polímero/FTO (R_p), B) capacitância de dupla camada (CPE_{dc}), C) resistência de transferência de carga da interface	

polímero/solução (R_{redox}), D) capacitância de filme (CPE_{filme}) e E) difusão de íons (W). F) Área de superfície ativa calculada.	122
Figura 57 -Gráfico de Mott-Schottky dos filmes de poli(TH) em frequência fixa aplicada de 10 kHz.	124
Figura 58 -Voltamogramas cíclicos para a eletropolimerização dos filmes de poli(azo-BBY)@AuNP (A), poli(azo-BBY) (B) e eletrodeposição de nanopartículas de ouro (C) aplicado 30 ciclos de potenciais com velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} . $T=25^\circ$ e atmosfera de N_2	126
Figura 59 -Voltamogramas cíclico para os eletrodos modificados de poli(TH), poli(TH)-AuNPs e AuNPs em solução de KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ aplicando-se velocidade de varredura de 25 mV s^{-1} . Atmosfera de N_2	127
Figura 60 -Espectros de Nyquist para os filmes de poli(TH) e poli(TH)-AuNPs em solução de KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ com potencial aplicado de $+0,20 \text{ V}$ (vs. ECS). 25°C e atmosfera de N_2	128
Figura 61 -Espectros de Nyquist para os filmes de poli(TH) e poli(TH)-AuNPs em solução de KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ saturada com o gás O_2 aplicando-se potencial de $-0,30 \text{ V}$ (vs. ECS). 25°C e atmosfera de N_2	130
Figura 62 -Imagens obtidas através de MEV-FEG para os eletrodos de FTO modificados com o filme de poli(TH) (A), AuNPs (B) e poli(TH)-AuNPs (C).	133
Figura 63 -Histograma para os valores de tamanho médio das nanopartículas presentes na Figura 62C.	134
Figura 64 -Voltamograma cíclico referente a eletropolimerização do filme de poli(TH)-AuNPs sobre eletrodo impresso (SPE) com eletrodo de trabalho de platina. 25°C e atmosfera de N_2	135
Figura 65 -Espectro de Nyquist (A) e BODE (B) obtidos pela resposta do eletrodo de platina antes e após a modificação com o filme nanocompósito de poli(TH)-AuNPs. Solução de PBS $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) em atmosfera de N_2 e potencial aplicado de $-0,30 \text{ V}$ vs. ECS.	136
Figura 66 -Espectros obidos para a modificação do filme de poli(TH)-AuNPs antes e após incubação com o anticorpo de GLUT-4. A) Espectro de Nyquist, B) espectro de capacitância complexa e C) gráfico de capacitância versus impedância imaginária.	138
Figura 67 -A) Espectros de Nyquist (A) e a respectiva curva analítica (B) para a resposta do imunossensor frente a diferentes concentrações de GLUT-4 em solução de PBS $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,40) em diferentes concentrações contendo O_2 saturado em equilíbrio atmosférico. A	

barra de erro representa o desvio padrão para o mesmo eletrodo em três diferentes experimentos.....140

Figura 68-A) Espectros de capacitância complexa (A) e sua respectiva curva analítica (B) para a resposta do imunossensor frente a diferentes concentrações de GLUT-4 em solução de PBS 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,40) contendo O₂ saturado em equilíbrio atmosférico. A barra de erro representa o desvio padrão para o mesmo eletrodo em três diferentes experimentos. 141

Figura 69-Relação Linear de [GLUT-4]xCr versus [GLUT-4]. Forma de isoterma de Langmuir usada para o complexo GLUT-4/Ab-GLUT-4. 142

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Especificações dos reagentes utilizados no desenvolvimento do projeto.....	55
Tabela 2 -Valores de potenciais de pico para o primeiro e último ciclo de potencial aplicado obtidos durante a eletropolimerização e eletrodeposição dos filmes sobre o eletrodo de FTO.	69
Tabela 3 -Parametros impedimétricos determinados a partir de ajustes matemáticos sobre modelo de circuito equivalente apresentado na Figura 32. Os erros foram inferiores a 4%. .	85
Tabela 4 -Parametros impedimétricos determinados por meio do ajuste matemático sobre modelo de circuito equivalente para os espectros anterior e após ativação da superfície do eletrodo de poli(azo-BBY)-AuNPs com a molécula de glutaraldeído. Os erros apresentados foram inferiores a 4%.	89
Tabela 5 -Parametros impedimétricos determinados por meio do ajuste matemático sobre modelo de circuito equivalente para os espectros anterior e após imobilização do anticorpo Ab-5-mC sobre superfície do eletrodo de poli(azo-BBY)-AuNPs-GA. Os erros apresentados foram inferiores a 4%.	90
Tabela 6 -Parametros impedimétricos determinados por meio do ajuste matemático sobre modelo de circuito equivalente para os espectros anterior e após desativação dos sítios ativos remanescentes presentes na superfície do eletrodo de poli(azo-BBY)-AuNP-GA-Ab com a molécula de BSA. Os erros apresentados foram inferiores a 4%.	93
Tabela 7 -Valores comparativos do tempo médio necessário para cada execução de cada etapa para determinação de concentração de DNA metilado entre o sensor e o kit comercial.....	100
Tabela 8 -Valores de limite de detecção para sensores eletroquímicos de DNA metilado. ..	102
Tabela 9 -Parametros impedimétricos determinados a partir de ajustes matemáticos sobre modelo de circuito equivalente. Os erros foram inferiores a 4%.	129
Tabela 10 -Parametros impedimétricos determinados a partir de ajustes matemáticos sobre modelo de circuito equivalente. Os erros foram inferiores a 4%.	131
Tabela 11 -Parametros impedimétricos determinados a partir de ajustes matemáticos sobre modelo de circuito equivalente para os espectros antes e após modificação com o anticorpo Ab-GLUT-4. Os erros foram inferiores a 4%.	137

SUMÁRIO

Capítulo 1.....	23
1. INTRODUÇÃO.....	24
1.1. MUTAÇÕES GENÉTICAS E EPIGENÉTICA.....	24
1.2. MARCADORES BIOLÓGICOS: BIOMARCADORES	26
1.2.1. Espécies de dna metilado como biomarcador para diagnóstico de câncer.....	27
1.2.2. Transportador de glicose 4 como biomarcador para tecidos tumorais	30
1.3. IMUNOENSAIOS	32
1.3.1. Aspectos analíticos	34
1.4. IMUNOENSAIO ELETROQUÍMICO.....	38
1.4.1. Utilização de espectroscopia de impedância eletroquímica para imunosensoriamento	40
1.5. MATERIAIS NANOCOMPÓSITO BASEADOS EM POLÍMEROS CONDUTORES	42
1.6. NANOPARTÍCULAS DE OURO	43
1.7.1. Polímero condutor redox baseado no monômero bismarck brown y: um azo-polímero condutor	47
CAPÍTULO 2	52
OBJETIVOS	52
2. OBJETIVOS.....	53
2.1. OBJETIVO GERAL	53
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
CAPÍTULO 3	54
MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
3. MATERIAIS E MÉTODO	55

3.1.	REAGENTES.....	55
3.2.	SOLUÇÕES.....	55
3.2.1.	Soluções para eletropolimerização do filme de poli(azo-bby)-aunps.....	55
3.2.3.	Solução tampão fosfato (pbs)	57
3.3.	CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	57
3.4.	CARACTERIZAÇÃO POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X.....	57
3.5.	MEDIDAS ELETROQUÍMICAS.....	57
3.5.1.	Equipamentos	57
3.5.2.	Células eletroquímicas.....	57
3.5.2.1.	Eletropolimerização e medidas de investigação do desempenho eletroquímico.....	57
3.5.2.2.	Análises imunoeletroquímicas para espécie de dna metilado.....	58
3.5.2.3.	Análise imunoeletroquímica para espécie de glut-4.....	59
3.5.5.	Síntese do imunossensor de espécie de dna metilado baseado no filme de poli(azo-bby)-aunps	63
3.5.6.	Síntese do imunossensor para glut-4 baseado no filme de poli(th)-aunps	64
3.5.7.	Curva analítica para padrão de dna metilado	64
3.5.8.	Curva analítica para imunossensor de glut-4	65
3.5.9.	Análise de dna metilado em amostra real	65
	CAPÍTULO 4	66
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1.	DESENVOLVIMENTO DO IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA ESPÉCIE DE DNA METILADO BASEADO NO FILME NANOCOMPÓSITO DE BISMARCK BROWN Y COM NANOPARTÍCULAS DE OURO	67
4.1.1.	Construção do nanocompósito de azo-polímero condutor redox com nanopartículas de ouro encapsuladas.....	67

4.1.1.1.	Eletropolimerização.....	67
4.1.1.2.	Mecanismo de formação do filme de poli(azo-bby)-aunps e arquitetura formada 71	
4.1.2.	Caracterização por difração de raios x.....	73
4.1.3.	Caracterização morfológica.....	74
4.1.4.	Caracterização eletroquímica do filme de poli(azo-bby)-aunps	76
4.1.4.2.	Resposta frente ao oxigênio dissolvido	79
4.1.4.3.	Investigação por espectroscopia de impedância eletroquímica	80
4.1.4.4.	Análise por ajustes matemáticos sobre modelos de circuito equivalente	83
4.1.5.	Preparação do imunossensor	86
4.1.5.1.	Ativação da superfície	87
4.1.5.2.	Imobilização do anticorpo 5-metil citosina	90
4.1.5.3.	Bloqueio dos sítios remanescentes ativos com bsa	92
4.1.5.6.	Afinidade de ligação antígeno-anticorpo	102
4.1.6.	Análise em amostra real	103
4.2.	DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSENSOR PARA GLUT-4 BASEADO EM FILME POLIMÉRICO REDOX DE POLI(TH) COM NANOPARTÍCULAS DE OURO	105
4.2.1.	Desenvolvimento do filme de poli(th)	105
4.2.1.1.	Eletropolimerização.....	105
4.2.2.	Comportamento eletroquímico.....	107
4.2.2.1.	Voltametria cíclica	107
4.2.3.	Otimização dos parametros para eletropolimerização da poli(th).....	113
4.2.3.1.	Variação do intervalo de potencial aplicado	113
4.2.3.2.	Influência do número de ciclos aplicado	115
4.2.3.3.	Estudo da velocidade de varredura aplicada	117

4.2.3.4.	Influência do eletrólito de suporte durante a etapa de eletropolimerização ...	118
4.2.3.5.	Avaliação do comportamento semicondutor dos filmes eletropolimerizados: análise por mott-schottky	123
4.2.4.	Construção do filme nanocompósito.....	125
4.2.4.1.	Resposta frente ao oxigênio dissolvido	129
4.2.5.	Caracterização morfológica.....	132
4.2.6.	Eletropolimerização sobre eletrodo impresso	134
4.2.7.	Construção e avaliação eletroquímica do immunosensor	137
4.2.8.	Curva analítica.....	139
5.	CONCLUSÃO.....	143
5.1.	CONCLUSÕES IMUNOSSENSOR PARA DNA METILADO	143
5.2.	CONCLUSÕES IMUNOSSENSOR PARA GLUT-4.....	144
6.	ALGUMAS PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS.....	145
	REFERÊNCIAS.....	146

Capítulo 1

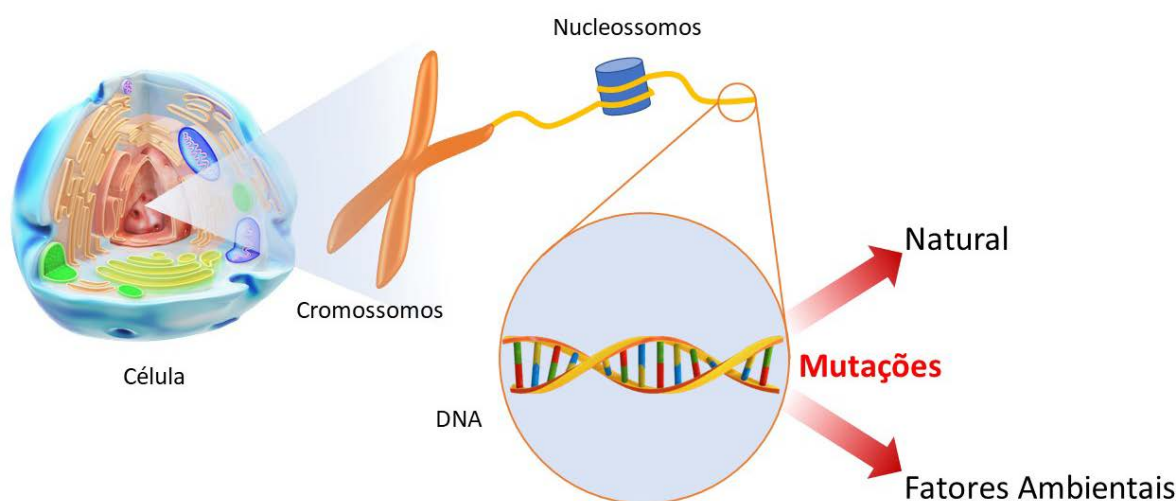
Introdução

1. Introdução

1.1. Mutações Genéticas e Epigenética

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é um composto orgânico com a função de fornecer o código genético dos seres vivos (SINDEN; WELLS, 1992; PEARSON; EDAMURA; CLEARY, 2005; LOEWE; HILL, 2010). Em células eucariontes, o DNA fica confinado no núcleo celular na forma de cromossomos. Os cromossomos são conjuntos de nucleossomos onde as fitas de DNA se encontram organizadas (Figura 1).

Figura 1-Imagem ilustrativa da localização e estrutura do DNA em uma célula eucarionte. A mutação genética ocorre por alteração na sequência do código genético.



Fonte: Autoria própria.

As mutações no DNA, ou mutações genéticas, são definidas como alterações na sequência do código genético presentes no DNA (SINDEN; WELLS, 1992; PEARSON; EDAMURA; CLEARY, 2005; LOEWE; HILL, 2010). Essas mutações podem ocorrer em diferentes níveis, podendo ser classificadas de acordo com o modo de alteração do código, tal como mutação pontual, por exclusão, por inserção e por translocação, e apresentar diferentes formas de consequências (LOEWE; HILL, 2010).

Um famoso exemplo da consequência de uma mutação genética é o caso da Anemia Falciforme, sendo resultado de uma alteração no gene responsável pela formação da hemoglobina (TAYLOR 6TH et al., 2008; JARRETT et al., 2016). A expressão genética responsável pela formação da beta hemoglobina possui 147 aminoácidos. A simples substituição de um único aminoácido (mutação pontual) tem como consequência a formação

da proteína da hemoglobina na forma falciforme. Como consequência, há uma diminuição na eficiência da oxigenação de tecidos devido a alteração da estrutura tridimensional da hemoglobina. Contudo, é importante destacar que nem toda mutação genética pode resultar em consequências diretas e/ou de grandes magnitudes. De fato, algumas mantêm-se silenciadas no indivíduo.

Qualquer célula pode ter seu material genético alterado. A alteração pode ocorrer por influência de fatores externos como, exposição química ou radiações eletromagnéticas ionizantes (por exemplo, radiação ultravioleta e de raio X), ou mesmo por fatores naturais decorrentes de erros durante a replicação (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004; HUNTER, 2005; FEIL, 2006; SKINNER; GUERRERO-BOSAGNA; HAQUE, 2015). Caso essa mutação ocorra em uma célula germinativa (óvulos ou espermatozoides) ela poderá ser transmitida para seus descendentes, estando presente em cada célula do desenvolvimento embrionário. Por sua vez, se a mutação ocorrer em qualquer outra linhagem de célula, essa mutação não será transmitida para seus descendentes, sendo classificada como mutação somática.

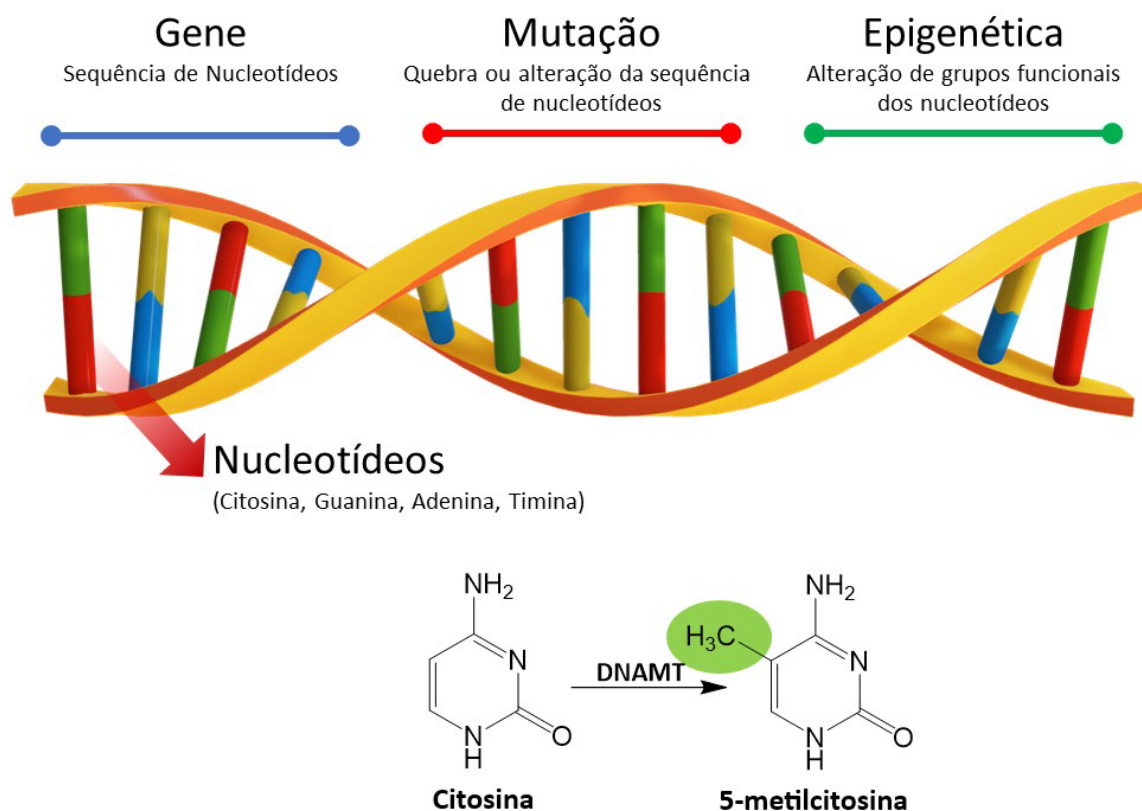
Enquanto a genética dedica-se ao estudo das mutações supracitadas, a epigenética direciona esforços para compreender como as células regulam a atividade genética sem necessidade de alterar a sequência do DNA (Figura 2) (A.; DAIYA, 2001; LARSSON; CASTILHO; GIANNIBILE, 2015; PARK et al., 2019; UNNIKRISHNAN et al., 2019).

Essa regulação se dá pelo “ligamento” ou “desligamento” dos genes pela adição de grupos funcionais a nucleotídeos específicos, que irão influenciar na produção de proteínas em células. Essa regulação ajuda a garantir que as células irão produzir apenas aquelas proteínas que são necessárias para sua função. Garantindo assim, por exemplo, que proteínas responsáveis pelo crescimento dos ossos não sejam promovidas em células musculares. Assim como mutações genéticas, reações epigenéticas podem ser afetadas por fatores ambientais (SUTHERLAND; COSTA, 2003; FEIL; FRAGA, 2012). Dieta pessoal e exposição a poluentes são apenas dois exemplos de uma série de fatores que podem influenciar na regulação epigenética de um indivíduo.

E assim como ocorre com as mutações genéticas, as mutações epigenéticas também podem ser transmitidas para gerações (LILLYCROP; BURDGE, 2015; SCHAGDARSURENGIN; STEGER, 2016). Dessa forma, o monitoramento e entendimento de modificações epigenéticas são de grande importância para avanços nas áreas médicas, seja através de diagnósticos ou por meio de estudos para o entendimento e desenvolvimento de tratamentos, contribuindo

com incremento em saúde e bem estar populacional (JONES; BAYLIN, 2002; WEI; LILLEHOJ; HO, 2010; CAMPUZANO et al., 2019).

Figura 2-Representação esquemática para mutação genética e mutação epigenética. O exemplo apresentado foi baseado na reação epigenética de metilação da citosina mediado pela enzima metiltransferase (DNAMT).



Fonte: Autoria própria.

1.2. Marcadores Biológicos: Biomarcadores

Biomarcadores são por definição substâncias indicadoras de estados fisiológicos, estando em estado normal, patológico ou sob resposta farmacológica (GILLESPIE; LADAME; O'HARE, 2019; SHAO; XIAO, 2020). Por meio do monitoramento dos biomarcadores, diagnósticos acurados e conhecimentos dos mecanismos de doenças podem ser conhecidos, possibilitando aplicação de tratamentos específicos e personalizados, elevando as chances de cura (STRIMBU; TAVEL, 2010; GILLESPIE; LADAME; O'HARE, 2019; ZAIDI; SHAHZAD; BATTOOL, 2020; KARIMI-MALEH et al., 2021).

Os primeiros marcadores biológicos utilizados para monitoramento de enfermidades datam de séculos atrás e tinham como base fatores físicos, como ritmo cardíaco e

temperatura relativa do corpo (FERGUSON; VAIDYA, 2010; STRIMBU; TAVEL, 2010). No último século, avanços tecnológicos permitiram análises quantitativas de algumas moléculas em fluidos (como urina e sangue), representando um grande avanço na área médica. E, nas últimas décadas, experimentamos avanços ainda mais expressivos, onde a capacidade das análises passaram de algumas dezenas de moléculas para milhares delas. Como resultado, algumas doenças podem ser completamente mapeadas através de diversas moléculas específicas, permitindo diagnósticos cada vez mais exatos.

Especialmente, no caso de doenças como câncer, biomarcadores são úteis para detecção em estágios iniciais da doença, sendo esse um fator crucial para aumento das chances de sucesso de cura (FERGUSON; VAIDYA, 2010; ROY et al., 2010). Além da diminuição do tempo de diagnóstico, biomarcadores auxiliam em sua categorização, nível de severidade e avaliação da resistência ao tratamento por quimioterapia. Todos esses pontos são importantes para tomadas de decisões a nível de intervenções que sejam mais adequadas, diminuir a exposição do paciente a procedimentos desnecessários e podendo aumentar as suas chances de sobrevivência.

1.2.1. Espécies de DNA Metilado como Biomarcador para Diagnóstico de Câncer

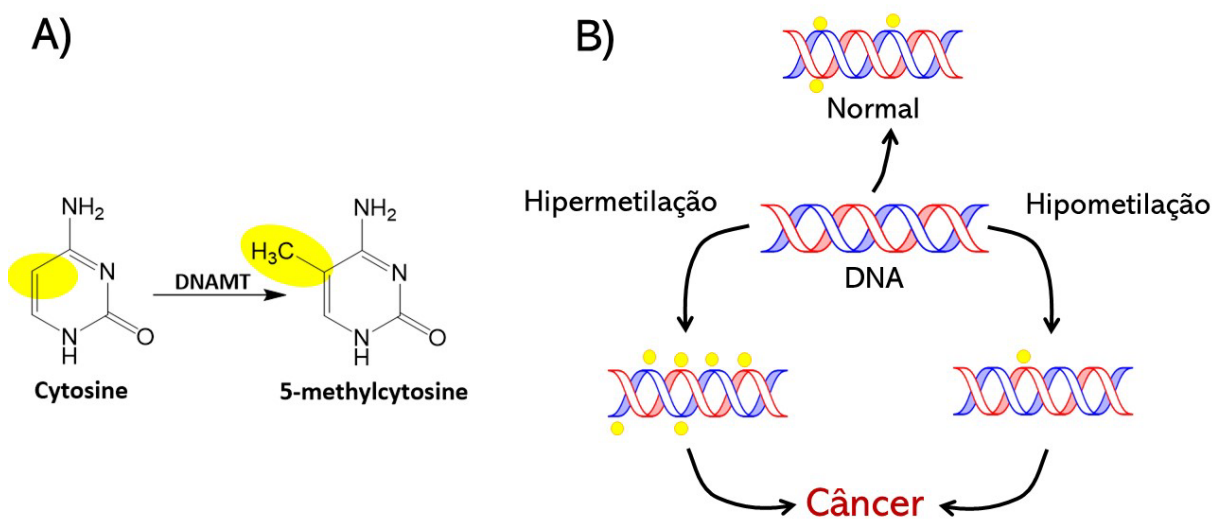
A metilação do DNA, uma das mais importantes reações epigenéticas, ocorre pela adição de um grupo metila ($-\text{CH}_3$) ao carbono 5 da base citosina do DNA (5-mC) (Figura 3), catalisada pela enzima DNA metiltransferase (DNAMT) (WU; ZHANG; GUO, 2013; ZHU et al., 2015).

Tais processos de metilação do DNA tem ocorrência natural no organismo humano e desempenha papel crucial na regulação genética, afetando diretamente a impressão genômica (KREJCOVA et al., 2017). Valores anormais nos níveis globais de metilação do DNA, classificados como hipermetilação e hipometilação, podem aumentar, diminuir ou mesmo inativar a atividade genética, podendo desencadear doenças graves como Alzheimer, esquizofrenia e doenças vasculares, bem como diversas classes de tumores cancerígenos, como o câncer que acomete o pulmão, mama, ovário, cólon e sarcomas (HOSSAIN et al., 2017; KREJCOVA et al., 2017; MONTERO-CALLE et al., 2019).

Assim, alterações nos níveis globais de 5-mC foram sugeridos como biomarcadores para diagnósticos e prognósticos de tecidos cancerosos (MONTERO-CALLE et al., 2019). Essa importante correlação entre os níveis de metilação do DNA e diagnóstico de doenças

demonstrou a necessidade de desenvolvimento de sensores e biosensores, tanto para fins de pesquisa quanto para fins clínicos, que permitam a detecção, quantificação e monitoramento de genes metilados (POVEDANO et al., 2018b, 2018a).

Figura 3-A) Representação esquemática para reação de metilação da citosina mediada pela DNA metiltransferase e B) representação dos níveis de metilação global e sua associação com tumorigênese.



Fonte: Adaptado de (KREJCOVA et al., 2017).

Na década de 90, os primeiros métodos para o sensoriamento de espécies de DNA metilado foram reportados (TALEAT et al., 2015; HOSSAIN et al., 2017). Dentre eles, aqueles utilizando tratamento da amostra com bissulfito, como por exemplo o método Frommer, apresentaram certo destaque. O método Frommer consiste em aplicar um tratamento de bissulfito na amostra com a intenção de converter as citosinas não metiladas em uracila (HOSSAIN et al., 2017). Em seguida, a amostra é amplificada através de PCR (do inglês *polymerase chain reaction*) e *primers* são aplicados para se ligarem a sítios específicos de citosina-guanina (CpG) de interesse e com isso determinar os níveis de metilação (TALEAT et al., 2015). Esses métodos apresentam vantagens pela relativa simplicidade de equipamentos. Mas, as desvantagens ficam a cargo das múltiplas etapas necessárias para obtenção de quantidades significativas de amostra e análises a fim de se obter um resultado quantitativo (MONTERO-CALLE et al., 2019).

Os métodos atualmente desenvolvidos direcionam esforços principalmente no desenvolvimento e aprimoramento de métodos espectroscópicos e eletroquímicos (HOSSAIN

et al., 2017; ISLAM et al., 2017). Nesse contexto, os métodos eletroquímicos se destacam em termos de simplicidade em equipamentos, baixo custo, curto tempo de resposta, menor número de etapas de análise, além da possibilidade de miniaturização dos sistemas de análise. Dentre as estratégias eletroquímicas utilizadas para detecção de DNA metilado, os métodos baseados em mecanismos de restrições de endonucleases (REs), tratamento com bissulfito (TB) e reações de imunoafinidade (RIA) apresentam maior destaque (HOSSAIN et al., 2017).

As enzimas de restrição endonuclease (REs) promovem quebras em sítios específicos, sendo classificadas como RE sensível a metilação, o qual promove a digestão apenas de DNA metilado e RE resistente a metilação, que promove apenas a clivagem de sequências genéticas não metiladas (CAO; DONG, 2017; XIA; HAO, 2019). Para os sensores baseados no método de restrição endonuclease (REs) a superfície do eletrodo é modificada com sequências genéticas específicas para o DNA metilado a ser reconhecido. Posteriormente, utilizando as enzimas RE, obtém-se a quebra do DNA imobilizado proporcional ao nível de metilação. Nesse método, indicadores redox (por exemplo, solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, hidroquinona e complexos de rutênio) são utilizados, e a alteração nos sinais eletroquímicos promovidos por eles são utilizados como sinal analítico para quantificar o nível de metilação do DNA (ZHU; TRAVASSEJDIC, 2018).

O método baseado em bissulfito faz uso do mesmo princípio descrito para os métodos clássicos, durante o primeiro parágrafo, modificando-se a técnica de detecção e transdução. O princípio de operação do sensor baseado em bissulfito também se dá pela imobilização de DNA sobre a superfície de eletrodos com superfícies modificadas ou não modificadas e com o auxílio de indicadores redox acompanha-se os sinais eletroquímicos obtidos correlacionando-os com os níveis de metilação de DNA (HOSSAIN et al., 2017).

Ambas as metodologias acima apresentam desvantagens como perda e/ou mudanças irreversíveis nas amostras. Desse modo, o método baseado em imunoafinidade demonstra vantagens por seu mecanismo se basear no reconhecimento específico de espécies de DNA metilados através de anticorpos ou a proteína MDB (do inglês *methyl-CpG-binding domain*) sem a necessidade de modificações das amostras (MONTERO-CALLE et al., 2019).

De fato, em recente trabalho Pingarrón e colaboradores (POVEDANO et al., 2020) clamam pela necessidade de desenvolvimento de estratégias simples e de rápida resposta para o sensoriamento de espécies de DNA metiladas baseando-se em imunoafinidades. Os autores desenvolveram uma plataforma sensorial baseada em microesferas magnéticas

modificadas com proteína estreptavidina e com anticorpo específico marcado com a enzima horseradish peroxidase (HRP). A detecção foi realizada por técnica amperométrica na presença de H_2O_2 e hidroquinona, servindo de substrato para a HRP para geração do sinal de detecção eletroquímico. Satisfatoriamente, os autores quantificaram espécies de DNA metilado, alcançando limite de detecção na casa de picomol por litro.

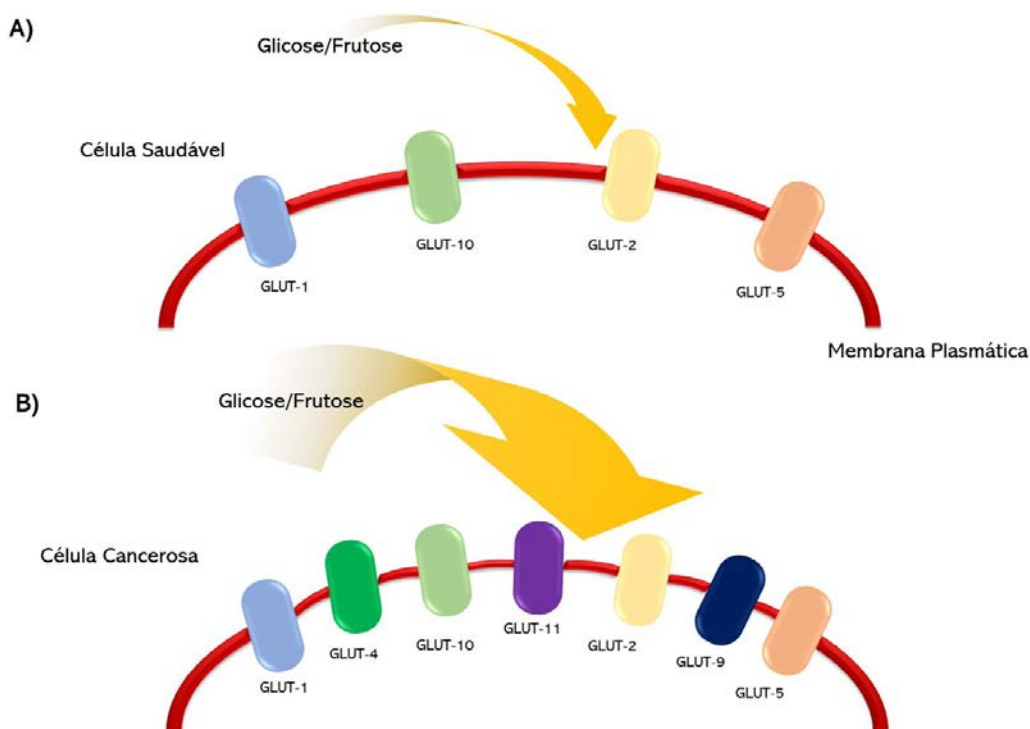
Apesar dos impressionantes resultados, diferentes etapas (eletro)químicas foram necessárias para aquisição do sinal analítico baseado na reação catalisada pela enzima HRP. Assim, o presente trabalho tem como objetivo simplificar a plataforma imunossensora explorando a resposta específica dos polímeros condutores redox para a molécula de oxigênio dissolvido.

1.2.2. Transportador de Glicose 4 como Biomarcador para Tecidos Tumoriais

Os transportadores de glicose (do inglês *glucose transporter* - GLUT) compõem o grupo de proteínas de membrana que realizam o transporte da glicose facilitada através da membrana plasmática para ser metabolizada pela glicólise (THORENS; MUECKLER, 2009; ADEKOLA; ROSEN; SHANMUGAM, 2012; BARRON et al., 2016). Existem 14 diferentes proteínas GLUTs (denominadas de GLUT-1 a GLUT-14) localizadas em diferentes regiões do corpo e com diferentes características. Elas podem ser subdivididas em classes (classe I, II e III) a depender de suas características e funções. Por exemplo, o GLUT-1 age principalmente como um sensor para glicose em células humanas do tipo beta, enquanto GLUT-5 é principalmente encontrado em células do intestino facilitando também o transporte de frutose. Já o GLUT-4 é sensível a insulina, e quando recrutado aumenta de 10 a 20 vezes o transporte de glicose através da membrana plasmática (BARRON et al., 2016; NAVALE; PARANJAPE, 2016).

Células cancerosas tem sua capacidade de proliferação incontrolável, o que resulta em um aumento expressivo da necessidade de ácidos graxos, aminoácidos e açúcares para manutenção de seu metabolismo. De fato, estudos recentes demonstraram uma dependência de metabolismo de glicose para produção de energia das células cancerosas, que pode chegar a 30 vezes o valor necessário para a manutenção de uma célula saudável (AUGUSTIN, 2010; CALVO et al., 2010; BARRON et al., 2016). Para suprir essa necessidade, células cancerosas aumentam a expressão de transportadores de glicose em sua membrana (Figura 4) (AUGUSTIN, 2010; BARRON et al., 2016). Também, algumas células tumorais apresentam padrões de expressão de transportadores anormais comparadas com tecidos saudáveis.

Figura 4-Diagrama esquemático para a expressão dos facilitadores de transporte de glicose em células saudáveis (A) e células cancerosas (B).



Fonte: Adaptado de (BARRON et al., 2016).

Com base nesses dados, diversos estudos têm apontado o uso de transportadores de glicose como biomarcadores para diagnóstico de câncer, bem como para acompanhamento de tratamentos de tumores (BARRON et al., 2016). Em especial, o GLUT-4 pode ser considerado um bom indicador para melanomas de colón, peito, tireoide e pâncreas (BINDER et al., 1997; NOGUCHI et al., 1999; MCBRAYER et al., 2012). Os tecidos citados tipicamente não apresentam sensibilidade a insulina. Assim, a presença desse transportador em um desses tecidos revela um padrão anômalo da expressão de transportadores de glicose, indicando uma necessidade anormal de glicose, podendo ser indicativo da presença de células cancerosas naquele tecido (BARRON et al., 2016).

Apesar da importância do tema, são poucos os métodos atualmente aplicados para medir e quantificar proteínas transportadoras de glicose. Os métodos existentes são principalmente baseados em imunofluorescência baseados em ensaios imunoenzimáticos (ELISA), sendo metodologias trabalhosas e muitas vezes de caráter semi-quantitativas (BARRON et al., 2016; NAVALE; PARANJAPE, 2016). No melhor dos nossos esforços, não foram encontradas metodologias alternativas, tão pouco imunossensores eletroquímicos para essa

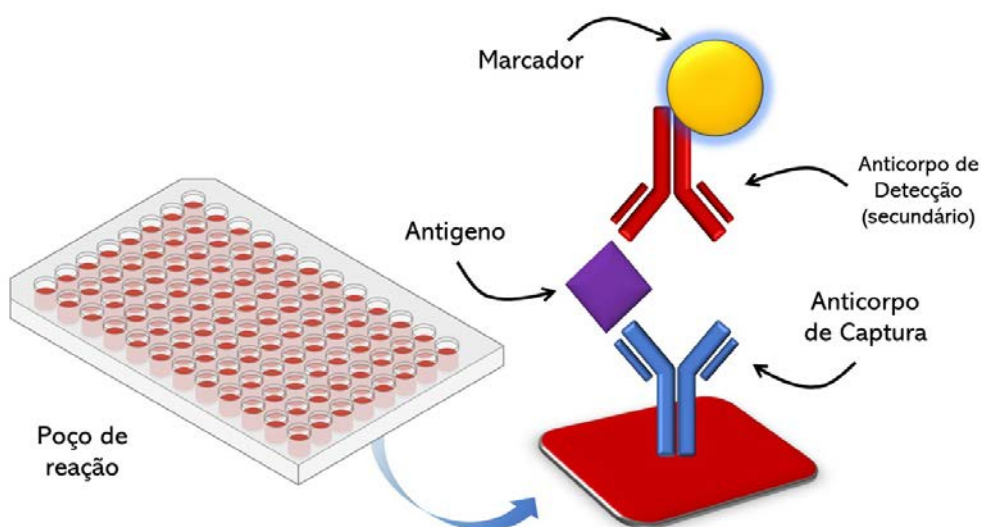
finalidade. Diante disso, seria de considerável interesse o desenvolvimento de métodos alternativos, com menor dispêndio de tempo e de reagentes para medir e quantificar a concentração de GLUT-4. Portanto, a presente tese propõe o desenvolvimento do primeiro imunossensor eletroquímico para detecção e quantificação da proteína de GLUT-4.

1.3. Imunoensaios

Imunoensaios, ou ensaios imunológicos, são metodologias que exploram a reação antígeno-anticorpo (Ag-Ab) para detecção de alvo(s) em diferentes matrizes biológicas (WILD; DAVIES, 2013; CHO et al., 2018; VASHIST; LUONG, 2018; HASSANPOUR; HASANZADEH, 2021). Sua alta empregabilidade se dá principalmente por três importantes propriedades apresentadas por anticorpos: i) habilidade de ligação com uma ampla variedade de espécies químicas, seja elas naturais ou sintéticas, biomoléculas, células ou vírus. ii) Excepcional especificidade para os substratos no qual o anticorpo se liga; e iii) a grande força de ligação apresentada pelo conjunto antígeno-anticorpo.

Imunoensaios podem ser empregados tanto para a detecção e determinação de antígenos quanto para anticorpos (DAVIES, 2013a). Em sua versão mais simples, também conhecido como design imunométrico (Figura 5), um anticorpo é imobilizado sobre um substrato, comumente uma superfície plástica (tal como em poços em uma placa de análise), de modo que permita a sua reação com o antígeno desejado.

Figura 5-Representação esquemática para a forma clássica de ensaios imunométricos.



Fonte: Adaptado de (DAVIES, 2013b).

A esse anticorpo imobilizado dá-se o nome de anticorpo de captura, por ser específico para o analito de interesse. Como etapa seguinte, adiciona-se ao poço a amostra do antígeno. Após completada a reação do anticorpo de captura com o antígeno, um segundo anticorpo é adicionado (anticorpo secundário). O anticorpo secundário apresenta em sua estrutura um marcador (do inglês *labeled*) responsável pela geração de sinal que sinalize a presença do antígeno (em casos qualitativos), bem como possibilita uma correlação entre intensidade de sinal e concentração de antígeno (em casos quantitativos). Esse marcador pode ser um grupo cromóforo, uma enzima, um isótopo radioativo, dentre outros.

Um dos imunoenaios mais populares e amplamente utilizados nos laboratórios de pesquisa e de diagnóstico é o ensaio imunoenzimático ELISA (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*). Assim como os anticorpos, enzimas são espécies especializadas em reações específicas (VASHIST; LUONG, 2018). Uma vez que o anticorpo marcado com enzima reage com o antígeno, reagentes que possuam uma reação química específica catalisada pela enzima marcadora são adicionados, gerando produtos de reação coloridos, fluorescentes, luminescentes ou eletroquimicamente ativos (KONDZIOR; GRABOWSKA, 2020; ZAIDI; SHAHZAD; BATOOL, 2020).

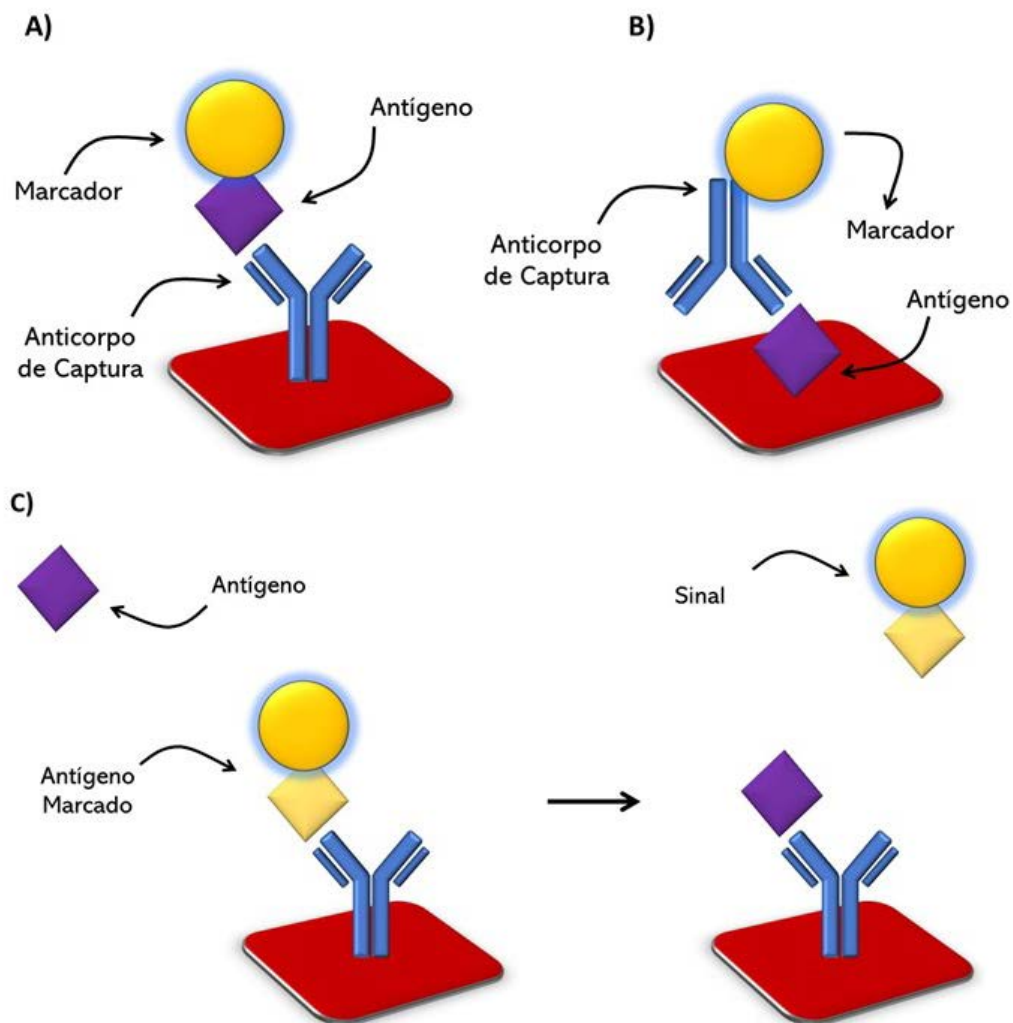
Como os anticorpos formam uma estrutura em torno do antígeno, essa estratégia é comumente denominada de sanduíche. De maneira similar, mas com objetivo de detectar anticorpos, antígenos podem ser imobilizados sobre a superfície de substratos para que assim sejam capturados anticorpos específicos. Por exemplo, uma camada proteica de um vírus pode ser imobilizada a fim de se capturar anticorpos específicos da amostra. Por sua vez, um segundo anticorpo marcado (como por exemplo o anti-humano IgG) é utilizado para determinação dos anticorpos capturados, também podendo ter caráter qualitativo ou quantitativo (VASHIST; LUONG, 2018).

O imunoensaio na forma sanduíche é classificado como um método indireto de detecção, uma vez que o sinal analítico tem origem em uma segunda espécie marcada (WILD; DAVIES, 2013). Há ainda uma outra categoria, os imunoenaios com detecção direta. O modo direto, como o nome sugere, dar-se-á pela detecção direta do antígeno ou anticorpo marcado, capturado pelo anticorpo ou antígeno imobilizado (Figura 6).

Por fim, os imunoenaios podem ainda ser classificados como competitivos (limite de reagente) e não competitivos (excesso de reagente). O imunoensaio na forma de sanduíche é considerado não competitivo. A Figura 6 apresenta uma ilustração para o imunoensaio

competitivo. Ao adicionar a amostra ao ensaio, há uma competição pelos sítios limitados e os antígenos da amostra tendem a ocupar o lugar dos antígenos marcados, ocorrendo uma diminuição do sinal analítico após etapa de incubação. Dessa forma, a determinação da concentração de antígeno na amostra será inversamente proporcional ao sinal obtido.

Figura 6-Representação esquemática para as formas de imunoensaio direto (A e B) e imunoensaio competitivo (C).



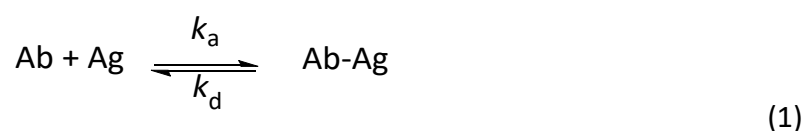
Fonte: Autoria Própria.

1.3.1. Aspectos analíticos

A reação e consequente formação da ligação antígeno (Ag)-anticorpo (Ac) ocorre por meio da atuação de interações eletrostáticas fracas e interações não-covalentes, como ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas (TRILLING; ZUILHOF, 2013; WELCH et al., 2017; VASHIST; LUONG, 2018; KONDZIOR; GRABOWSKA, 2020). A uma

certa distância (alguns nanômetros), forças de longo alcance como a iônica e hidrofóbica atraem a molécula para o sítio de ligação específica. A energia dessas forças atrativas é suficiente para superar a energia de hidratação, expelindo água e permitindo que o par Ab-Ag se aproxime ainda mais, situação na qual as forças atrativas de Van der Waals são dominantes e, portanto, concluem a formação do imunocomplexo. Nesse momento, a força da ligação dependerá do quão efetivo foi o encaixe no sítio de ligação específico, uma vez que essas forças fracas diminuem sua força de ligação em função da distância (REVERBERI; REVERBERI, 2007).

A reação Ab-Ag pode ser expressa de acordo com a lei da ação das massas (Eq. 1 e 2):



$$K_{eq} = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[\text{Ab-Ag}]}{[\text{Ab}][\text{Ag}]} \quad (2)$$

Onde k_a é a constante de associação (também chamada de k_{on}), k_d é a constante de dissociação (também chamada de k_{off}) e K_{eq} a constante de equilíbrio.

No início da reação, após a adição do antígeno ao meio de análise, a reação se processa no sentido de formação do complexo (Ab-Ag). Com o avanço da reação, uma taxa da reação inversa aumenta progressivamente até que as velocidades direta e inversa se igualem e a reação alcance o equilíbrio químico (REVERBERI; REVERBERI, 2007). Esse é um ponto importante para observação em ensaios imunológicos, pois as velocidades de reação de formação de Ag-Ab podem apresentar grandes variações (de segundos a horas) a depender das espécies em questão. Obviamente, a concentração das espécies tem influência sobre a velocidade, contudo, imunoensaios são limitados a análises com concentrações de analito na ordem de nanogramas. Dessa forma, muitos protocolos utilizam tempos de reação (incubação) de longos períodos (*overnight*), objetivando para que a reação alcance o equilíbrio. Contudo, valores satisfatórios de confiabilidade podem ser obtidos em tempos médios de algumas horas uma vez que a reação se processa de forma exponencial.

Pelo ponto de vista termodinâmico, quanto maior for as forças de ligação, maior será o valor da constante de equilíbrio (Eq. 3):

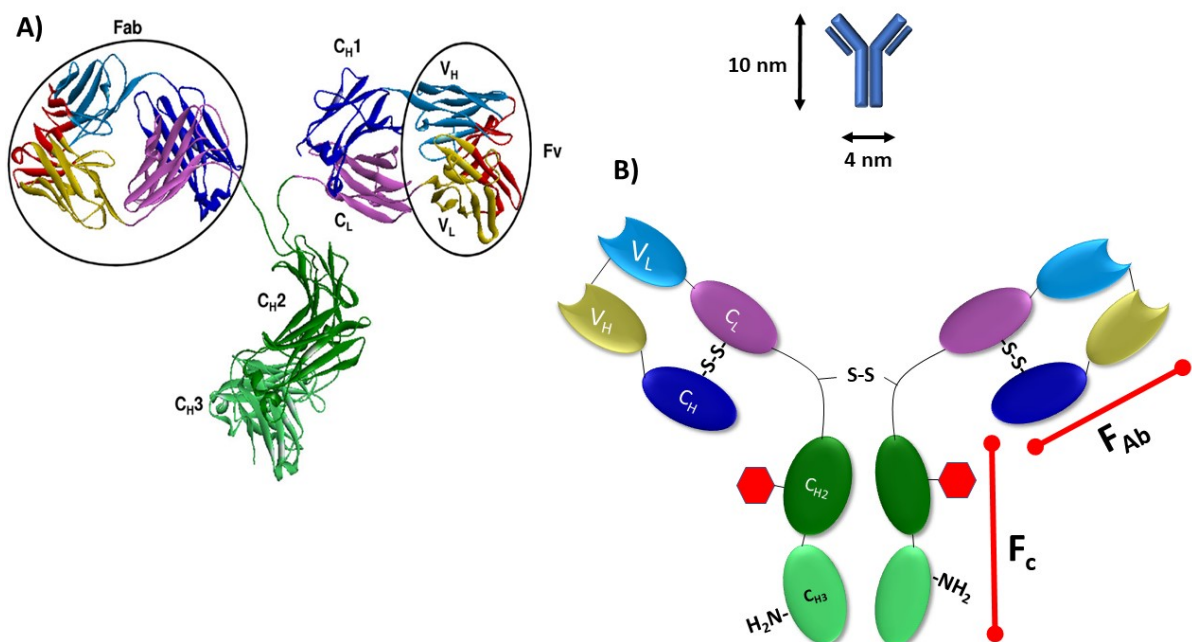
$$\ln(K_{eq}) = -\frac{\Delta G}{RT} \quad (3)$$

Onde ΔG é a variação da energia livre de Gibbs, R a constante universal dos gases e T a temperatura absoluta.

1.3.2. Características de um Anticorpo

Anticorpos são biomoléculas (biopolímeros) com estrutura tridimensional de aproximadamente 10 nm contendo três regiões globulares arranjadas em forma de “Y” e massa molecular de aproximada 150 kDa (Figura 7) (MAKARAVICIUTE; RAMANAVICIENE, 2013; WELCH et al., 2017). Sua estrutura é constituída em cadeias leves (retângulos contendo a letra subscrita “L”) e pesadas (retângulos contendo a letra subscrita “H”).

Figura 7-A) Estrutura 3D de uma molécula de anticorpo. B) Representação esquemática de um anticorpo destacando suas regiões.



Fonte: Adaptado de (TRILLING; ZUILHOF, 2013).

Por sua vez, as cadeias podem ser fracionadas em domínios, havendo domínios constantes (C_L e C_H) e domínios variáveis (V_L e V_H), responsáveis pela identificação dos antígenos por ligações específicas (modelo chave-fechadura) (CHIU et al., 2019). Ademais, a

estrutura de um anticorpo pode ser fracionada em duas partes, denominados fragmentos: o fragmento de ligação do antígeno (F_{ab} - do inglês *antigen-binding fragmente*) e o fragmento cristalizável (F_c), formando o tronco da estrutura em “Y”. Enquanto a região de ligação com o antígeno tem a função de identificação, como o próprio nome sugere, o papel da região F_c é modular a atividade do anticorpo após a ligação antígeno-anticorpo se formar.

Além das características estruturais, os anticorpos possuem características químicas que moldam sua estrutura. Os resíduos de aminoácidos com características hidrofóbicas se contorcem e ocupam principalmente a parte interna da estrutura da biomolécula (CHIU et al., 2019). Por outro lado, os grupos funcionais hidrofílicos ficam localizados na região externa do anticorpo. Esses grupos quimicamente reativos, como aminas, carboxilas e hidroxilas estão espalhados por sua superfície.

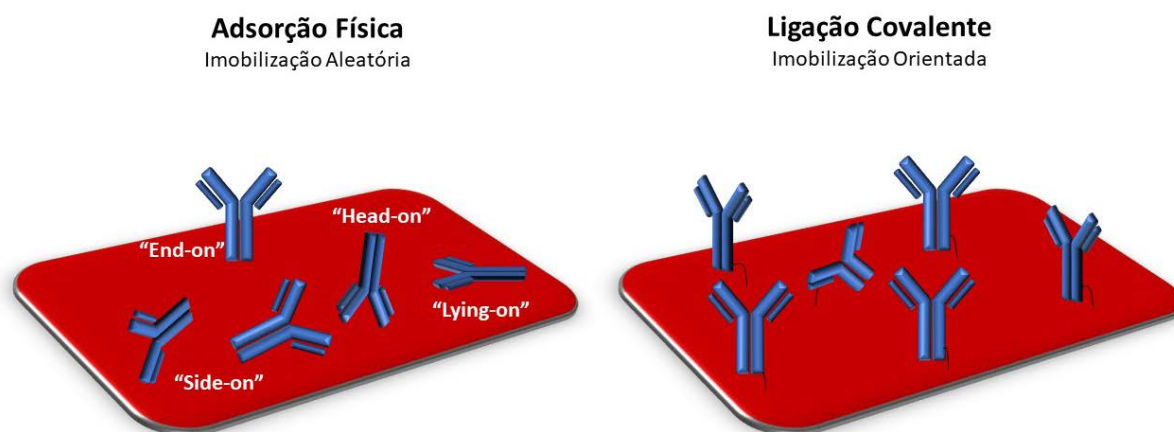
Do ponto de vista dos ensaios imunológicos, esses grupos funcionais hidrofílicos são de grande importância pois permitem traçar estratégias para imobilização do anticorpo em diferentes superfícies funcionalizadas, bem como a adição de moléculas que atuem como marcadores que forneçam um sinal mensurável para identificação do anticorpo após sua ligação com o antígeno (TRILLING; ZUILHOF, 2013; CHIU et al., 2019). Além dos grupos supracitados, os anticorpos possuem ainda pontes dissulfeto, espalhadas por toda sua estrutura e responsável pela formação das “dobradiças” que mantem a estrutura em Y. Esse grupo pode ser reduzido para formação do grupo tiol, tendo igual importância na utilização de estratégias para conjugação com outras moléculas e superfícies (TRILLING; ZUILHOF, 2013).

Como destacado, o conhecimento dos aspectos químicos da estrutura do anticorpo é importante para determinar as estratégias de imobilização (GAO; GUISÁN; ROCHA-MARTIN, 2022). Duas estratégias são principalmente aplicadas para a imobilização dos anticorpos sobre superfícies sólidas, sendo elas a imobilização por adsorção e imobilização por formação de ligação covalente (Figura 8) (WELCH et al., 2017; ZHANG et al., 2022). Apesar de conferir simplicidade ao ensaio, a estratégia de imobilização por adsorção não fornece controle da orientação dos anticorpos sobre o substrato, podendo afetar a capacidade de reconhecimento do antígeno e consequentemente o desempenho do imunossensor.

Em um cenário ideal, os anticorpos devem ser imobilizados sobre o substrato de forma a expor os sítios de ligação específicos (domínios variáveis) para o meio reacional enquanto a região F_c ficaria de face voltada para a superfície do substrato (perpendicular), como representado na Figura 8. Contudo, outras orientações do anticorpo sobre os substratos são

possíveis. Assim, é necessário conciliar os aspectos de densidade de recobrimento e orientação dos anticorpos para um bom desempenho imunossensorial (BYZOVA et al., 2017).

Figura 8-Ilustração esquemática para as formas de imobilização e as possíveis orientações dos anticorpos sobre substrato.



Fonte: Adaptado de (GAO; GUIJÁN; ROCHA-MARTIN, 2022).

A utilização de estratégias de imobilização por ligações covalentes pode auxiliar na orientação dos anticorpos sobre o substrato, uma vez que a imobilização ocorrerá através de ligação de grupos específicos do anticorpo com grupos específicos presentes no substrato (GAO; GUIJÁN; ROCHA-MARTIN, 2022). Além de conferir robustez e boa densidade de anticorpos orientados, a estratégia por formação de ligação covalente permite ainda a alguns imunossaios a possibilidade de reutilização (KONDZIOR; GRABOWSKA, 2020; GAO; GUIJÁN; ROCHA-MARTIN, 2022).

1.4. Imunoensaio Eletroquímico

Um dos primeiros imunossaios reportados na literatura utilizou a técnica de imunoprecipitação como abordagem para quantificação de um antígeno (WU, 2006; DAVIES, 2013a). Posteriormente, houve o advento do radioimunoensaio, seguido das técnicas empregando transdutores ópticos baseados em enzimas, como EMIT (do inglês *enzyme multiplied Immuno Technique*) e ELISA (do inglês *enzyme linked immunosorbent assays*), sendo um dos mais conhecidos e mundialmente difundidos imunossaios para fins acadêmicos e de diagnósticos (WU, 2006; DAVIES, 2013a).

Apesar disso, diversos esforços vêm sendo realizados para superar o que é considerado a principal desvantagem de imunoenaios: o fato de envolverem um grande número de etapas complexas. Isso resulta em longos períodos de análise e necessidade de mão de obra especializada. A transposição dessas desvantagens poderia resultar em uma maior descentralização e diminuição dos custos das análises, tornando testes específicos cada vez mais acessíveis (ZAIDI; SHAHZAD; BATOOL, 2020; KIM; PARK, 2021).

Nesse sentido, grandes esforços vêm sendo direcionados no desenvolvimento de imunoenaios eletroquímicos (KONDZIOR; GRABOWSKA, 2020; KIM; PARK, 2021). Os imunoenaios baseados em técnicas eletroquímicas apresentam diversas vantagens sobre as metodologias convencionais como relativo baixo custo, fácil manuseio, instrumentação simples, rápida resposta, fácil miniaturização e integração em plataformas portáteis (KONDZIOR; GRABOWSKA, 2020). O princípio de funcionamento de um imunossensor eletroquímico segue os mesmos princípios dos imunoenaios citados anteriormente. A alteração será no sinal analítico obtido após a imunorreação, o qual será convertido e mensurado eletroquimicamente (CHO et al., 2018; KONDZIOR; GRABOWSKA, 2020; KIM; PARK, 2021).

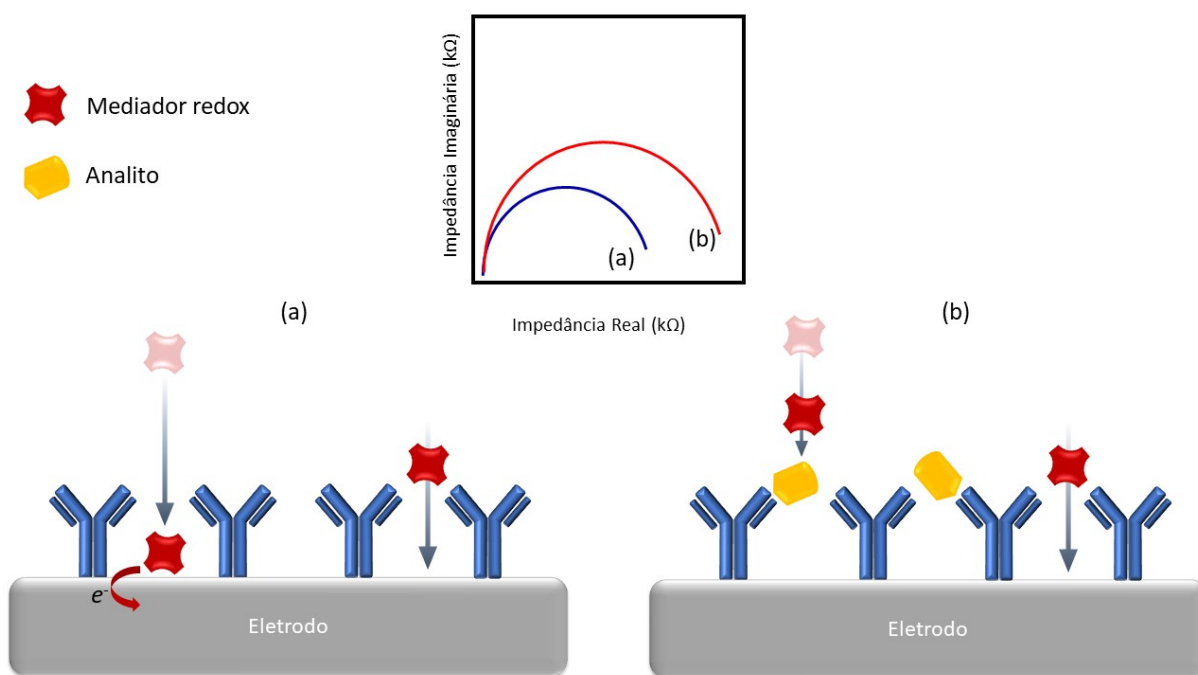
Muitos trabalhos reportando imunoenaios eletroquímicos empregam enzimas, mas ao invés de gerar produtos coloridos pela reação específica com substratos, a reação catalisada pela enzima produz (sub)produto eletroquimicamente ativos, que serão oxidados ou reduzidos, provendo um sinal analítico que pode ser mensurado e relacionado com a concentração de antígenos na amostra (SAMADI PAKCHIN et al., 2018; MONTERO-CALLE et al., 2019). Contudo, essa estratégia apresenta desvantagens como o grande número de etapas (eletro)químicas e a possível diminuição da capacidade de reconhecimento do anticorpo devido a alterações estruturais durante a etapa de formação de ligação covalente com os marcadores (HASSANPOUR; HASANZADEH, 2021).

Os imunossensores eletroquímicos livres de marcadores (do inglês *label-free*) são uma importante alternativa devido a sua estratégia de detecção direta (BARADOKE et al., 2020; HASSANPOUR; HASANZADEH, 2021). Seu princípio se baseia na resposta eletroquímica pela transferência eletrônica (oxidação ou redução) de uma espécie química em solução, denominada de mediador redox. Quando na presença do analito, a capacidade de transferência eletrônica sofre alteração devido ao impedimento de acesso do mediador redox

à superfície do eletrodo (*gate-effect*), resultando em diminuição do sinal eletroquímico (Figura 9) (DENG et al., 2016; LACH et al., 2019).

Contudo, algumas desvantagens para essa metodologia são apontadas em função da necessidade de dopagem da solução com grandes concentrações de reagentes com valências altas, como o par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, que resultam em possíveis falsos positivos e desvios da linha de base (BARADOKE et al., 2020; HASSANPOUR; HASANZADEH, 2021). Tentando superar esse desafio, a presente tese de doutoramento apresenta uma estratégia de detecção alternativa, utilizando polímeros condutores redox e sua seletividade de resposta ao oxigênio dissolvido, que atuou como mediador redox na construção de imunossensores eletroquímicos *label-free*.

Figura 9-Representação esquemática para o mecanismo de resposta de um imunossensor eletroquímico *label-free* baseado em espectroscopia de impedância eletroquímica.



Fonte: Autoria própria.

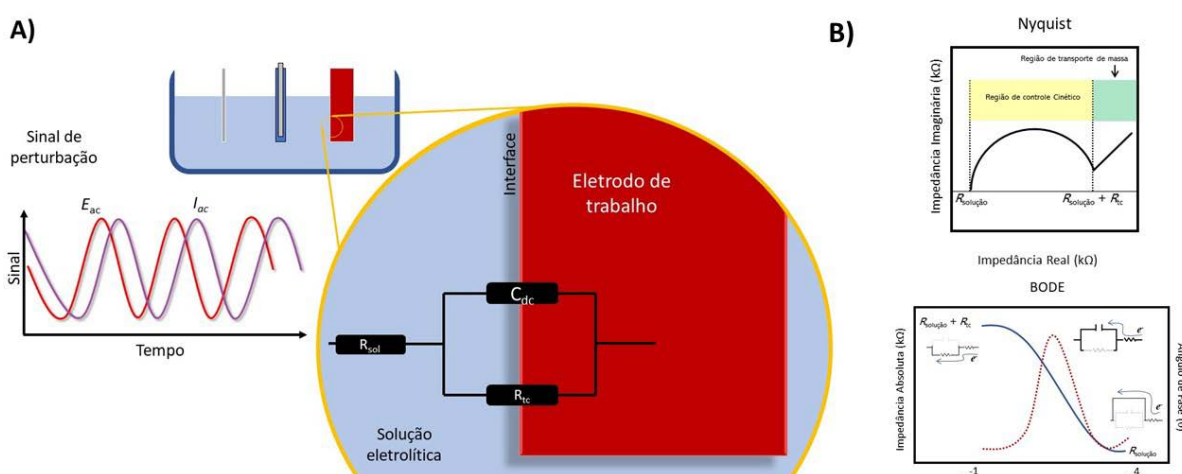
1.4.1. Utilização de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica para Imunossensoriamento

Nas últimas décadas, a utilização da espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) como técnica de transdução em plataformas de biorecognition, como imunossensores, para biosensoriamento ganhou grande destaque, principalmente pela impressionante sensibilidade alcançada pela técnica, chegando a limites de detecção na faixa de picomol

(BONANNI; VALLE, 2010; CONGUR; EKSIN; ERDEM, 2015). Além da sensibilidade, a técnica ainda apresenta as vantagens características das plataformas eletroquímicas, tal como baixo custo relativo, facilidade de manuseio e miniaturização (RUSSO et al., 2021).

O princípio da técnica é baseado em aplicar uma pequena perturbação ao sistema, na forma de potencial elétrico (em regime de circuito alternado) e obter um sinal de corrente alternada como resposta. Modulando-se a frequência da onda senoidal do sinal de perturbação é possível acompanhar diferentes fenômenos eletroquímicos do sistema (Figura 10) (VON HAUFF, 2019).

Figura 10-Representação esquemática do sinal de perturbação de uma interface eletroquímica (A) e das representações gráficas de Nyquist e BODE para o sinal de resposta (B).



Fonte: Autoria própria.

Dessa forma, a técnica é capaz de medir em uma mesma análise diferentes aspectos físico-químico que estão ocorrendo simultaneamente dentro do sistema eletroquímico, como condutividade da solução, carregamento da dupla camada elétrica (capacitância da dupla camada - C_{dl}), transferências de elétrons entre eletrodo/solução (resistência de transferência de carga - R_{tc}) e fenômenos de transporte de massa (elemento de Warburg - W). Ademais, informações morfológicas como estimativa da porosidade e rugosidade também podem ser alcançadas (LASIA, 2002).

Essa ampla capacidade de visualização dos fenômenos permitiu aos pesquisadores o desenvolvimento de estratégias de detecção que alcançassem níveis impressionantes de sensibilidade, as quais até então só eram possíveis por meio de técnicas consideradas padrão.

Com efeito, a EIE foi capaz de oferecer performance equivalente ou mesmo superior, podendo ainda superar as desvantagens apresentadas por essas técnicas, as quais incluem grandes dispêndios por envolver mão de obra especializada, equipamentos de alto custo e longos períodos de análise (STRONG et al., 2021).

Grande parte dos trabalhos de desenvolvimento de plataformas sensoriais que utilizam EIE exploram as reações faradaicas, através da variação de resistência de transferência de carga do sistema, como estratégia de sensoriamento (BARADOKE et al., 2020; STRONG et al., 2021). Isso é comumente realizado a partir de medidas onde o biossensor tem contanto com uma solução contendo o analito de interesse junto a um mediador redox (BARADOKE et al., 2020). À medida em que o biossensor interage com o analito, acompanha-se uma variação nos valores de resistência do sistema (R_{tc}) correlacionado com a concentração do analito em solução. A escolha dos pesquisadores pela utilização de mediadores redox tem como objetivo ampliar a razão sinal-ruído (RSR), devido grande parte do conjunto biomolécula-analito não se apresentar eletroquimicamente ativo no intervalo de potencial comum para meios aquosos. Apesar disso, a utilização de mediadores redox pode estar sujeita a possíveis falsos positivos na análise (BARADOKE et al., 2020; LE; PARK; CHO, 2020).

Nesse sentido, os polímeros condutores redox são alternativas promissoras uma vez que reúnem a facilidade de síntese por meio de eletropolimerização bem como a propriedade redox, necessária para atender as diferentes estratégias dos biossensores eletroquímicos sem a necessidade de adição de mediadores redox em solução. Ademais, apresentam flexibilidade e a possibilidade de ancoragem de diversos materiais biológicos por meio da interação com os grupos funcionais presentes em suas cadeias poliméricas (OLEAN-OLIVEIRA et al., 2021).

1.5. Materiais nanocompósito baseados em polímeros condutores

A investigação de materiais em escala nanométrica para fabricação de biossensores, em especial imunossensores, tem atraído crescente interesse durante as últimas décadas (NARESH; LEE, 2021). O principal motivo é a possibilidade de modulação de propriedades físicas e químicas em razão do tamanho e formato do nanomaterial. Recentemente, diversos esforços vem sendo dedicado para o desenvolvimento e aplicação de materiais híbridos (nanocompósitos), os quais apresentam melhoras em suas propriedades e características quando em comparação a suas formas individuais (POTTS et al., 2011; ZHANG et al., 2015). Dentre os materiais nanocompósitos desenvolvidos, aqueles baseados em polímeros

condutores estão recebendo especial atenção em pesquisas nas mais diversas áreas devido a facilidade de síntese bem como por formar materiais de flexíveis, biocompatíveis e de baixo custo.

Destaca-se as bioplataformas sensoriais formadas por polímeros condutores redox e nanopartículas de metais nobres (NPMN) como platina, prata e ouro (HAN et al., 2017). Especialmente, nanopartículas de ouro apresentam propriedades únicas como grande habilidade de adsorção, grande área superficial específica, boa biocompatibilidade bem como alta condutividade eletrônica. Apesar disso, nanopartículas de ouro são instáveis em solução e geralmente necessitam de um invólucro de moléculas, tais como alcanotóis, amins, nucleotídeos e polímeros para sua estabilização.

Nesse sentido, a presença de grupos funcionais nos polímeros condutores possibilita o crescimento de nanopartículas de ouro em meio a uma rede polimérica evitando a sua agregação ou dissolução. Por sua vez, as nanopartículas de ouro em meio a rede polimérica aumentam significativamente a área superficial do polímero condutor, além de atuar como mediador na transferência de elétrons que ocorre nos sítios redox do polímero (LU et al., 2018; TEPALE et al., 2019; ESSOUSI et al., 2020).

1.6. Nanopartículas de Ouro

Nanopartículas de ouro vem sendo extensivamente exploradas para as mais variadas aplicações (ASADI et al., 2021; CHEN et al., 2021; LEE; CHOI; HEO, 2021; QIAO; QI, 2021). Uma busca na plataforma *Science Direct* apresentou 110 000 resultados de trabalhos publicados relacionados a nanopartículas de ouro de 2010 até o presente momento. O grande interesse nessa classe de materiais é principalmente devido a suas interessantes propriedades químicas e físicas resultantes das suas dimensões em escala nanométricas (LOHSE; MURPHY, 2013; FREITAS DE FREITAS et al., 2018).

Nanopartículas de ouro podem assumir diferentes formatos e dimensões dependendo da rota sintética, bem como da aplicação desejada, uma vez que cada uma apresenta características específicas. Por exemplo, nanopartículas no formato de bastonetes interagem de duas diferentes maneiras com a luz por possuir valor de comprimento e largura diferentes um do outro. Esse aspecto é amplamente explorado com finalidades ópticas (CHEN et al., 2021; QIAO; QI, 2021).

Do ponto de vista eletroquímico, as nanopartículas de ouro são atrativas principalmente por sua ampla área superficial, a qual resulta em ampliação da resposta do sinal eletroquímico e alta condutividade eletrônica, podendo ser utilizado como um mediador, aumentando a eficiência de transferência eletrônica de um sistema eletroquímico (GUO; WANG, 2007; HAN et al., 2017; KIZLING et al., 2018).

As nanopartículas possuem grande variedade de rotas sintéticas que podem ser utilizadas para a sua obtenção. Os protocolos são categorizados como de cima para baixo (do inglês *top-down*), onde processos físicos e químicos são utilizados para degradar um material de partida em menores partes, alcançando a escala nanométrica; e de baixo para cima (*bottom-up*), onde a síntese inicia com precursores menores, tal como o sal de ouro, para formar estruturas maiores (QIN et al., 2018).

Elas também podem ser classificadas em métodos químicos, físicos e biológicos (QIN et al., 2018; QIAO; QI, 2021). Métodos químicos e biológicos utilizam agentes químicos como estabilizantes e redutores para obtenção das nanopartículas. A diferença entre eles é que para a classificação de método biológico, os reagentes necessitam ser não tóxicos (química verde). Assim, derivados de plantas são amplamente utilizados nessa metodologia de síntese, assim como o uso de agentes biológicos como bactérias e fungos. Nos métodos físicos, técnicas como ablação a laser, microondas, ultrassom, são utilizados para a obtenção das nanoestruturas.

A utilização de técnicas eletroquímicas para síntese de nanopartículas de ouro é uma interessante alternativa as rotas convencionais por oferecer alto controle sobre a forma da nanopartícula desejada, bem como na diminuição de etapas necessárias em rotas sintéticas convencionais, diminuindo custo de síntese e contribuindo positivamente com o meio ambiente (DUDIN; UNWIN; MACPHERSON, 2010; HOU et al., 2021).

1.7. Polímeros Condutores Redox

Desde sua descoberta no fim da década de 70, polímeros condutores vêm ganhando crescente atenção devido a seu grande potencial de aplicabilidade, recebendo o título de “metais sintéticos”, sendo uma alternativa a tecnologias utilizando materiais inorgânicos para áreas de materiais ópticos, eletroquímicos e dispositivos elétrico/eletrônico (LUO et al., 2021; OLEAN-OLIVEIRA et al., 2021; RAMANAVICIUS; RAMANAVICIUS, 2021). Polímeros condutores apresentam vantagens devido a sua diversidade química, baixa densidade, flexibilidade,

resistência a corrosão, fácil controle sobre sua forma e morfologia, e controle sobre a condutividade eletrônica.

A condutividade desses materiais é tipicamente explicadas por meio da teoria de bandas, onde a diferença de energia (*bandgap*), também chamada de banda proibida, entre a banda de valência (BV) e a banda de condução (BC) são utilizadas para classificar os materiais como condutores, semi-condutores e isolantes (LE; KIM; YOON, 2017; K; ROUT, 2021). No caso de condutores, as bandas BV e BC encontram-se sobrepostas, possibilitando o livre trânsito dos elétrons pela estrutura do material. Materiais isolantes apresentam *bandgap* suficientemente alto que impossibilitam a passagem de elétrons da BV para a BC e os semicondutores, como o nome sugere, possuem valores de *bandgap* intermediários (banda estreita), permitindo, sob determinadas circunstâncias, a promoção de elétrons para a BC.

A teoria de bandas explica o comportamento de semicondutor dos polímeros condutores, contudo é necessário um olhar também sobre a sua estrutura química. A principal característica que possibilita conferir condutividade eletrônica aos polímeros condutores é a presença de ligações π em sua cadeia polimérica (Figura 11) (LE; KIM; YOON, 2017; K; ROUT, 2021). A π -conjugação é caracterizada pela presença de ligações simples (ligação do tipo sigma - σ) e dupla (uma ligação sigma e uma ligação pi - π) arranjadas de forma alternada. Essa estrutura pode alternar as ligações, onde orbitais p_z se sobrepõem continuamente, resultando em uma condição que permite a movimentação dos elétrons ao longo da cadeia polimérica.

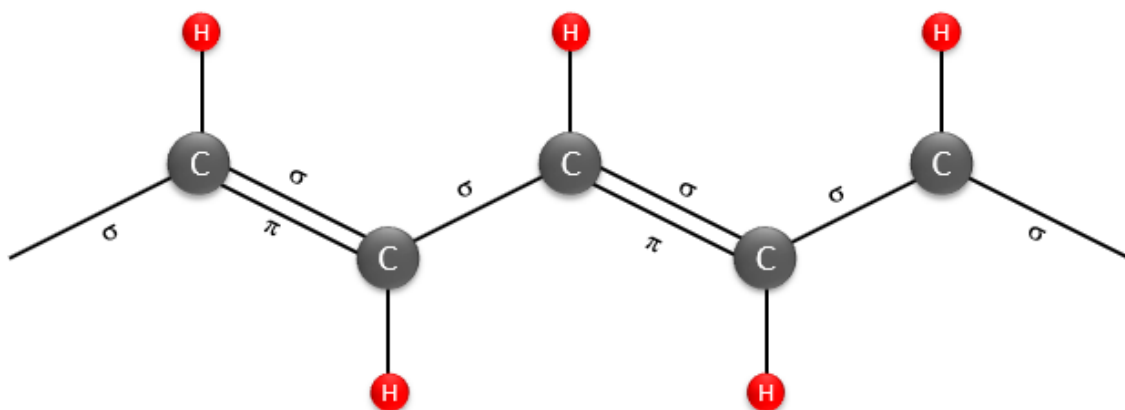
Uma característica de destaque dos polímeros condutores é a possibilidade de controle sobre sua condutividade. A modulação da condutividade da cadeia polimérica pode ser facilmente alcançada por meio da dopagem desses materiais. Há várias metodologias para dopagens de polímeros condutores, como dopagem redox, dopagem por injeção de carga e fotodopagem (MOHD RADZUAN; SULONG; SAHARI, 2017; OLEAN-OLIVEIRA et al., 2021). Nesse sentido, a palavra “dopagem” em polímeros se difere para aquela comumente utilizada na química inorgânica. Em inorgânica dopagem é a introdução de pequena quantidade de átomos de um elemento diferente daquele do material principal, de modo que os átomos do dopante substituam alguns átomos do material principal na rede cristalina.

A dopagem em um polímero condutor se dá por inserção de quantidades significativas de agentes que adicionam (dopagem tipo-n) ou retiram (dopagem tipo-p) elétrons na matriz polimérica com intenção de formação de *polarons*, *bipolarons* e *solitons* que podem ser

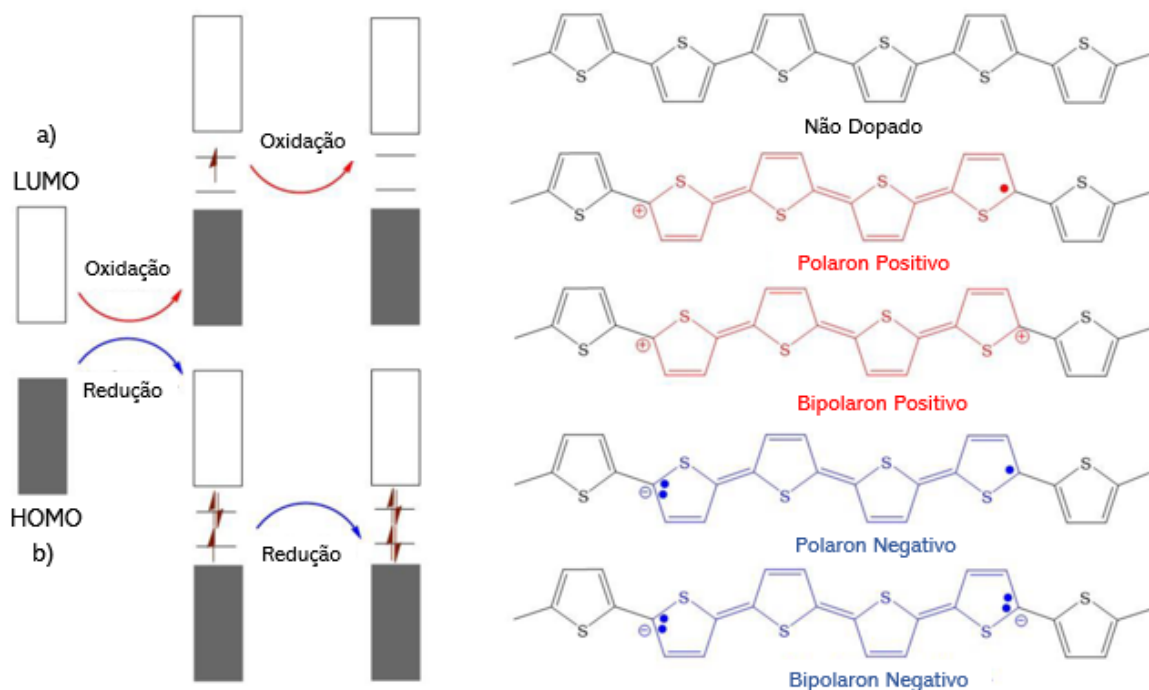
deslocalizados e conferem aos polímeros condutores condutividade comparável para a de alguns metais (**Figura 11B**) (BREDAS; STREET, 1985; ZOZOULENKO et al., 2019; K; ROUT, 2021).

Figura 11-A) Estrutura química do poliacetileno para exemplificação da cadeia polimérica com ligações π -conjugadas. **B)** Representação esquemática dos orbitais moleculares antes e após oxidação (a) ou redução (b) da cadeia polimérica. Os estados polarônicos foram exemplificados a partir da estrutura do politiofeno.

A)



B)



Fonte: Adaptado de (LE; KIM; YOON, 2017).

A dopagem do tipo-p, elétrons migram do orbital HOMO (*high occupied molecular orbital*) para a espécie dopante e uma carga positiva é gerada sobre a cadeia polimérica

(vacância). Para o caso da dopagem do tipo-n, elétrons são transferidos para o orbital LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*) aumentando a densidade eletrônica e permitindo a deslocalização da carga negativa gerada (LE; KIM; YOON, 2017; ZOZOULENKO et al., 2019).

Além da dopagem, características químicas e estruturais do polímero podem afetar sua condutividade bem como suas propriedades mecânicas (CHEN et al., 2020; K; ROUT, 2021). Características como comprimento da cadeia polimérica, presença de unidades não conjugadas e grau de polimerização podem aumentar ou diminuir a condutividade do polímero. Nesse sentido, um bom controle sobre a síntese interfere diretamente sobre seu desempenho.

Polímeros condutores são tipicamente obtidos por rotas de síntese química ou eletroquímica. Técnicas eletroquímicas são vantajosa por permitir a modulação de características através da alteração de parâmetros eletroquímicos empregados durante a síntese, como por exemplo, potencial aplicado e tempo aplicado (OLEAN-OLIVEIRA; OLIVEIRA BRITO; TEIXEIRA, 2020; OLEAN-OLIVEIRA et al., 2021). Além disso, técnicas eletroquímicas podem ser utilizadas para realizar a dopagem do polímero construído com grande controle sobre o grau de dopagem (LE; KIM; YOON, 2017).

1.7.1. Polímero Condutor Redox Baseado no Monômero Bismarck Brown Y: Um Azo-Polímero Condutor

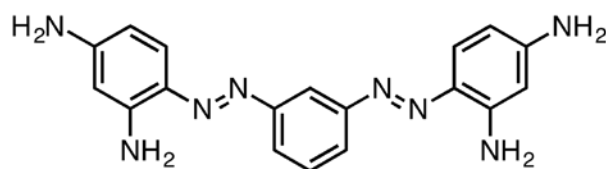
O azo-corante Bismarck Brown Y (4,4'-[1,3-Fenilenobis(azo)]-bis[1,3-fenildiamina] segundo a classificação da IUPAC) é um dos primeiros corantes baseados em anilina reportados na literatura. Sua síntese foi descrita pela primeira vez em 1863 por Carl Alexander Von Martius (BYERLY, 1953). O corante Bismarck Brown Y foi principalmente utilizado na coloração de tecidos, cultivo de células e cartilagens, para fins de estudos histológicos. Ainda como corante, também teve utilização no tingimento de celulose (BYERLY, 1953).

Sua estrutura química apresenta dois grupos azo (sendo classificado como um diazo) e duas aminas terminais (Figura 12), desempenhando papel fundamental para a formação do filme polimérico poli(azo-Bismarck Brown Y) (TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016a). Recentemente, em trabalhos desenvolvidos no Grupo de Pesquisa em Eletroanalítica e Sensores (GPES) do Prof. Dr. Marcos F. S. Teixeira, foram realizadas investigações das propriedades dos azopolímeros visando sua aplicação como plataformas sensoriais e

biosensoriais (TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016a; OLEAN-OLIVEIRA et al., 2019a, 2019b; OLEAN-OLIVEIRA; OLIVEIRA BRITO; TEIXEIRA, 2020; TREVIZAN et al., 2021).

Os azo-polímeros possuem estruturas conjugadas com terminações contendo grupos doadores ou receptores de elétrons possibilitando altas induções de polarizações. Seus filmes possuem isomeria geométrica *cis* e *trans* que podem alterar significativamente as propriedades físicas e químicas do material em função do tipo de conformação estrutural (APITZ et al., 2006). O isômero *trans* é geralmente mais estável energeticamente e consequentemente com maior predominância em filmes azo-polimérico. A interconversão entre as duas formas conformacionais podem ser induzidas por incidência de luz sobre o material polimérico. Este comportamento de foto-isomerização tem sido amplamente explorado no desenvolvimento de máquinas moleculares (do inglês *molecular machine*) (MERINO; RIBAGORDA, 2012). A foto-indução na rede polimérica pode alterar a condutividade em toda a sua cadeia, sendo bastante atrativo seu uso no desenvolvimento de novas plataformas sensoriais (DESHPANDE; AMALNERKAR, 1993; LANGE; MIRSKY, 2011).

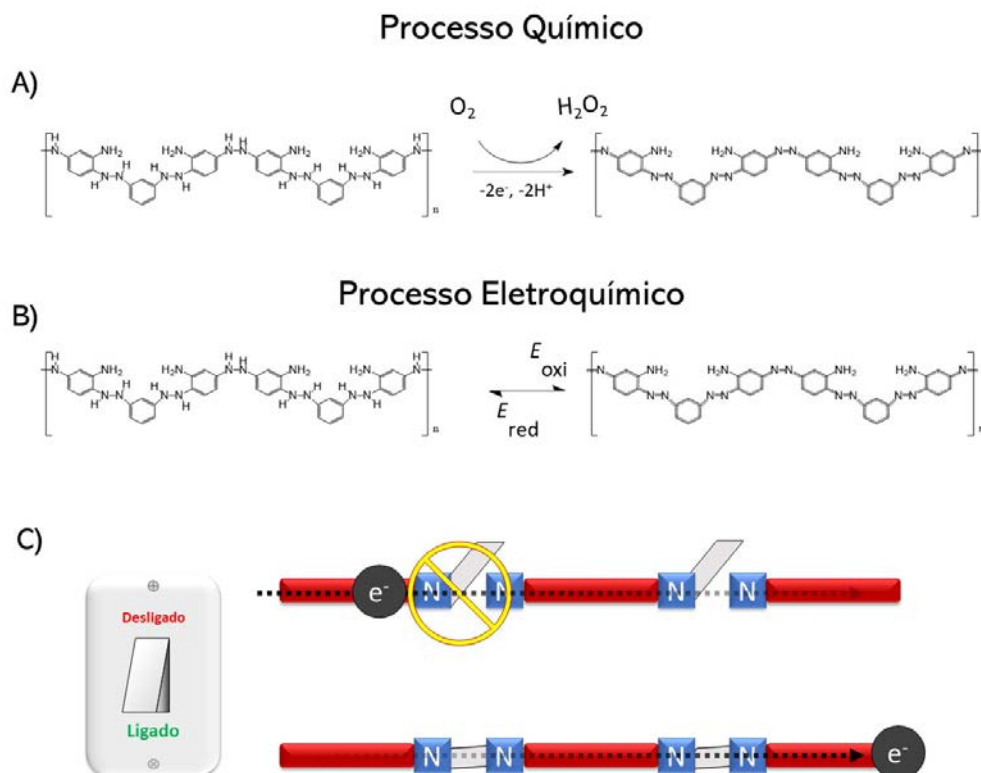
Figura 12 – Estrutura molecular do azo corante Bismark Brown Y.



Fonte: Autoria própria.

Outra propriedade notável e desejada para construção de sensores baseado em azo-polímeros é a possibilidade de redução e oxidação dos grupos azo, atuando como um polímero redox (Figura 13) (TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016a). O polímero derivado do monômero de Bismarck Brown Y permite modificações controladas das suas propriedades físico-químicas dependendo da aplicação de interesse. Recentemente o nosso grupo de pesquisa fez uso dessa propriedade desenvolvendo um interruptor molecular eletroquímico (Figura 13B) aplicando-o como material de reconhecimento para uma plataforma sensorial (OLEAN-OLIVEIRA; TEIXEIRA, 2018a; OLEAN-OLIVEIRA et al., 2019c). Através de técnica de eletropolimerização, um filme polimérico de Bismarck Brown Y foi construído sobre a superfície de um eletrodo de FTO.

Figura 13-A) Mecanismo redox do grupo azo por reação química (A) e eletroquímica (B). C) Imagem esquemática do comportamento de interruptor molecular apresentado pelo filme de poli(azo-BBY).



Fonte: Adaptados de (TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016a) e (OLEAN-OLIVEIRA et al., 2019c).

Uma primeira investigação demonstrou uma variação de resistência do sistema na ordem de kΩ pela simples variação do potencial aplicado sobre o sistema. Essa variação tinha origem na formação e quebra da π -conjugação da cadeia polimérica em função do potencial aplicado devido a oxidação ou redução do grupo azo do polímero (centro redox). Quando aplicado um potencial para redução do sistema, o polímero tinha sua π -conjugação interrompida devido a redução do grupo azo para forma de hidrazina. Por outro lado, quando aplicado um potencial para oxidação do sistema, ocorria a oxidação do grupo hidrazina para o grupo azo, reestabelecendo a π -conjugação do polímero.

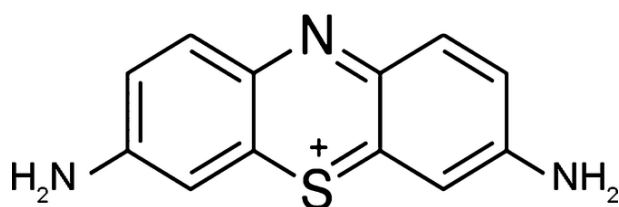
Esse comportamento também era obtido quimicamente pela exposição do polímero em sua forma reduzida para a molécula de oxigênio dissolvido. Nessas condições o grupo hidrazina era oxidado para o grupo azo pela molécula de oxigênio. Esse comportamento demonstrou ser dependente da concentração do oxigênio dissolvido.

Somado a isso, o polímero de Bismarck Brown Y apresenta um grande número de grupos amina livres. Essa característica permite a aplicação de estratégias de imobilização de biomoléculas como enzimas, DNA, anticorpos e proteínas, através da utilização de reagentes de ligação cruzada (como glutaraldeído ou carbodiamidas), sendo de grande interesse para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos.

1.7.2. Polímero Condutor Redox Baseado no Monômero Tionina

A tionina (3,7-diamino-5-fenotiazina, TH) é um corante catiônico do grupo das fenotiazinas primeiramente sintetizado por Charles Lauth no ano de 1861 (Figura 14) (KOSTJUKOVA; LEONTIEVA; KOSTJUKOV, 2021). A molécula de tionina é amplamente estudada devido a suas interessantes propriedades físico-químicas e apresenta diferentes aplicações como, tingimento de tecidos biológicos, fotossensibilizador em células solares, fotoiniciador de reações de polimerização e também no desenvolvimento de sensores (KRAMER; WINDRUM, 1955; NEUMANN; RODRIGUES, 1998; GUALDESI et al., 2020; KONDZIOR; GRABOWSKA, 2020; KOSTJUKOVA; LEONTIEVA; KOSTJUKOV, 2021; KUNTAMUNG; JAKMUNEE; OUNNUNKAD, 2021).

Figura 14-Estrutura molecular do corante tionina.



Fonte: Autoria Própria.

Além das aplicações citadas, a tionina possibilita a construção de filmes poliméricos condutores finos que exibem alta estabilidade química e física, além de grande concentração de centros redox por toda cadeia polimérica (KONDZIOR; GRABOWSKA, 2020; KOSTJUKOVA; LEONTIEVA; KOSTJUKOV, 2021). Isso permite que seus filmes poliméricos tenham aplicabilidade em reações de eletrocatalise e sensores eletroquímicos (TOPÇU; ALANYALIOĞLU, 2014; MAHBUBUR RAHMAN; LEE, 2021).

Diversas técnicas podem ser utilizadas para obtenção do filme polimérico de tionina, sendo as mais comuns a polimerização química pela utilização de um agente oxidante ou a

polimerização utilizando técnicas eletroquímica, conhecida como eletropolimerização (TOPÇU; ALANYALIOĞLU, 2014). A eletropolimerização apresenta diversas vantagens sobre as demais técnicas por ser econômica, não destrutiva e ambientalmente favorável. Ela pode ser realizada sem necessidades de ajustes temperatura e pressão, obtendo satisfatoriamente os filmes poliméricos em condições ambientes.

O primeiro trabalho encontrado em literatura empregando o filme polimérico de tionina para catálise foi escrito por Ohsaka e colaboradores (OHSAKA; TANAKA; TOKUDA, 1993). Eles reportam a construção de um eletrodo modificado com a poli(TH) por técnica de eletropolimerização e a investigação eletroquímica do comportamento catalítico frente a molécula de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH), justificando seu interesse no desenvolvimento de biosensores para identificação do NADH em reações dependentes de hidrogenases. Recentemente Rahman e colaboradores (MAHBUBUR RAHMAN; LEE, 2021) publicaram um trabalho reportando o uso de um eletrodo de carbono vítreo modificado por eletropolimerização com filme polimérico de tionina para detecção do neurotransmissor dopamina.

Na construção de imunossensores, o filme de poli(TH) apresenta grandes vantagens por seu polímero atuar propriamente como um mediador redox (SHAMSPUR et al., 2018). Nesse sentido, Shamspur e colaboradores (SHAMSPUR et al., 2018) construíram um imunossensor eletroquímico para antígeno específico da próstata (PSA) utilizando o filme polimérico de tionina como base para imobilização do anticorpo. O sinal analítico foi acompanhado pela variação da corrente do sistema pela reação dos centros redox com a molécula de H_2O_2 , promovida pela presença da enzima *horseradish peroxidase* (HRP) conjugada com anticorpo secundário.

Em um outro trabalho, Fan e colaboradores (FAN et al., 2019) construíram um imunossensor baseado em material compósito contendo o filme de poli(TH) para detecção do antígeno de câncer 125. Eles utilizaram como sinal analítico a variação da corrente do par redox da poli(TH), verificando que a resposta eletroquímica foi inversamente proporcional ao aumento da concentração do antígeno 125.

Para a presente proposta, buscaremos explorar o comportamento redox da politionina na determinação e quantificação do transportador de glicose 4 (GLUT-4) através da sua resposta a molécula de oxigênio dissolvido, atuando como mediador redox na solução.

Capítulo 2

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos baseados em espectroscopia de impedância eletroquímica e filmes nanocompósitos contendo polímeros condutores redox e nanopartículas de ouro para a detecção de biomarcadores associados ao diagnóstico de câncer.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolvimento e caracterização de filme nanocompósito baseado em polímeros condutores redox de Bismark Brown Y e nanopartículas de ouro.
- Desenvolvimento e caracterização de filme nanocompósito baseado em polímero condutor redox de tionina e nanopartículas de ouro.
- Avaliação eletroquímica dos filmes nanocompósitos baseado em técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica.
- Avaliação da resposta eletroquímica frente a molécula de oxigênio dissolvido visando sua utilização como mediador redox.
- Imobilização de anticorpos sobre eletrodo modificado com filme nanocompósito.
- Avaliação do desempenho do imunossensor construído frente ao biomarcador de interesse.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3. Materiais e Método

3.1. Reagentes

Os reagentes utilizados durante os estudos de síntese e otimização dos filmes nanocompósitos são reagentes comerciais de alta pureza. Eles foram listados e apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Especificações dos reagentes utilizados no desenvolvimento do projeto.

Reagente	Fórmula/Sigla	Marca	Pureza
4,4'-[1,3-Fenilenobis(azo)]-bis[1,3-fenildiamina] (Bismarck Brown Y)	BBY	Sigma-Aldrich	99%
Ácido cloroáurico	HAuCl ₄	Sigma-Aldrich	99%
Ácido clorídrico	HCl	Sigma-Aldrich	ACS
Dihidrogenofosfato de Sódio	NaH ₂ PO ₄	Merck	99%
Hidrogenofosfato Dissódico	Na ₂ HPO ₄	Merck	99%
Gás Oxigênio	O ₂	White Martins	99,9%
Gás Nitrogênio	N ₂	White Martins	99,8%
Glutaraldeído	GA	Synth	99%
Anticorpo de Captura	Ab-5-mC	Sigma-Aldrich	-
5-Metilcitosina	5-mC	Sigma-Aldrich	99,99%
Albumina de Soro Bovino	BSA	Sigma-Aldrich	99%
Acetato de tionina	TH	Sigma-Aldrich	99%
Anticorpo de Captura	Ab-GLUT-4	Abcam (ab33780)	-

3.2. Soluções

3.2.1. Soluções para Eletropolimerização do Filme de poli(azo-BBY)-AuNPs

As soluções para a formação dos filmes azo-poliméricos foram baseadas em trabalhos anteriores do grupo (TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016b; OLEAN-OLIVEIRA; TEIXEIRA, 2018a; OLEAN-OLIVEIRA et al., 2019c). Primeiro, pesou-se 0,1050 g do monômero Bismarck Brown Y e transferiu-se essa massa para um balão volumétrico de 25 mL. Após, foi adicionado ao balão volumétrico aproximadamente 20 mL de uma solução de HCl na concentração de 0,10 mol L⁻¹. A mistura foi levada ao banho de ultrassom por cerca de 15 minutos para total

dissolução do corante. O corante é facilmente dissolvido em água, sendo possível observar sua total solubilização ainda nos primeiros minutos de sonificação. Na sequência, completou-se o volume do balão até a marca. A solução foi transferida para um frasco coletor e em seguida foi borbulhado gás nitrogênio por tempo mínimo de 15 minutos para total retirada do oxigênio dissolvido em solução. Quando não utilizado, a solução foi mantida refrigerada em temperatura média de 4°C.

Separadamente, pesou-se 0,1699 g de HAuCl_4 e em seguida essa massa foi transferida para um balão volumétrico de 5 ml para obtenção da solução estoque de ácido cloroáurico. Ao balão foi adicionado cerca de 2 mL de solução de HCl 0,10 mol L^{-1} . Agitou-se manualmente até total dissolução do sólido e em seguida completou-se a solução até a marca. A solução foi igualmente desairada borbulhando-se gás N_2 por tempo mínimo de 15 minutos e estocada em refrigerador com temperatura de -18°C.

Por fim, com o auxílio de uma micropipeta, tomou-se 250 μL da solução estoque de HAuCl_4 e adicionando-a para solução de eletropolimerização contendo o monômero de Bismarck Brown Y.

3.2.2. Soluções para Eletropolimerização dos Filmes de Poli(HT) e Poli(TH)-AuNPs

A solução para eletropolimerização da poli(TH) foi preparada pesando-se 0,0718 g do monômero e transferindo-se essa massa para um balão volumétrico de 25 mL. Foi adicionado ao balão volumétrico aproximadamente 20 mL de uma solução de HCl na concentração de 0,10 mol L^{-1} . A mistura foi levada ao banho de ultrassom por cerca de 15 minutos para total dissolução do corante. O corante é facilmente dissolvido em água, sendo possível observar sua total solubilização ainda nos primeiros minutos de sonificação. Finalizando o banho sonificado, completou-se o volume do balão até a marca. A solução foi transferida para um frasco coletor e em seguida foi borbulhado gás nitrogênio por tempo mínimo de 15 minutos para total retirada do oxigênio dissolvido em solução. Quando não utilizado, a solução foi mantida refrigerada em temperatura média de 4°C.

Por fim, com o auxílio de uma micropipeta, tomou-se 250 μL da solução estoque de HAuCl_4 (descrita no item anterior) e adicionou-a para solução de eletropolimerização contendo o monômero de TH.

3.2.3. Solução Tampão Fosfato (PBS)

A solução de tampão fosfato salino (PBS do inglês *phosphate buffer saline*) 0,05 mol L⁻¹ foi preparada através da adição de 0,7098 g de Na₂HPO₄ (10 mmol L⁻¹), 2,3996 g de NaH₂PO₄ (40 mmol L⁻¹) e 2,9220 g de NaCl (100 mmol L⁻¹) em um balão volumétrico de 500 mL. Ao balão foi adicionado cerca de 400 mL de água e agitou-se até a completa dissolução dos sólidos. Completou-se o volume até o menisco. O volume do balão foi transferido para um béquer de 500 mL e o valor de pH foi ajustado para 7,40 com auxílio de um pHmetro (781 pH/ion Meter – Metrohm) utilizando solução de HCl concentrado.

3.3. Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura

As imagens dos eletrodos modificados foram obtidas através de Microscópio Eletrônico de Varredura de alta resolução (MEV-FEG) JEOL JSM 7100-F em modo de feixe eletrônico por emissão de campo em alto vácuo e temperatura constante.

3.4. Caracterização por Difração de Raios X

A análise estrutural dos eletrodos de FTO, poli(azo-BBY) e poli(azo-BBY)-AuNPs foram realizadas através da técnica de difração de raios X em um difratômetro SHIMADZU (modelo XRD-6000), com radiação Cu K α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) e monocromador de grafite, operando a 40 kV e 30 mA, no intervalo de 5° a 80° em 2 θ , com tempo de varredura de 1,00°/min, passo de 0,02° e tempo por passo igual a 1,20 s.

3.5. Medidas Eletroquímicas

3.5.1. Equipamentos

Para medidas de eletropolimerização e investigações voltamétricas, foi utilizado o potenciostato/galvanostato μ -autolab tipo III (Metrohm/Pensalab) gerenciado pelo software NOVA 2.1. Para as medidas utilizando espectroscopia de impedância eletroquímica, foi utilizado o equipamento PalmSens3 conectado à célula eletroquímica convencional de três eletrodos gerenciados pelo software PSTrace 5.9.

3.5.2. Células Eletroquímicas

3.5.2.1. Eletropolimerização e Medidas de Investigação do Desempenho

Eletroquímico

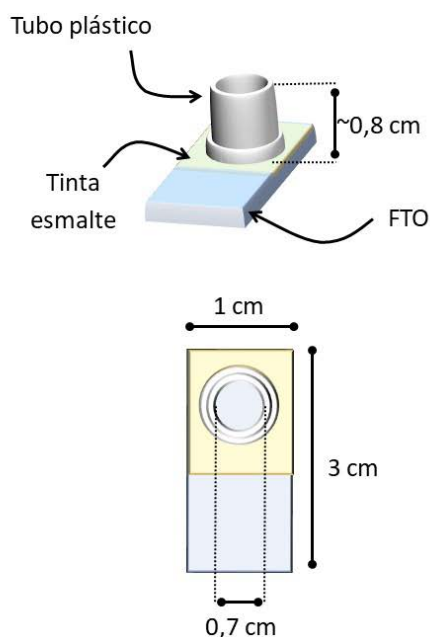
As medidas eletroquímicas de eletropolimerização e investigação do desempenho eletroquímico foram realizadas em uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos contendo um vaso de 50 mL com invólucro para banho termostatizado. O eletrodo de referência empregado foi o de calomelano saturado (ECS) preenchido com solução de KCl 3,0 mol L⁻¹. O eletrodo auxiliar foi o eletrodo de fio de platina e como eletrodo de trabalho empregou-se o eletrodo de óxido de estanho dopado com flúor (FTO) suportado sobre substrato de vidro de dimensões aproximadas de 3x1 cm.

3.5.2.2. Análises Imunoeletroquímicas para Espécie de DNA Metilado

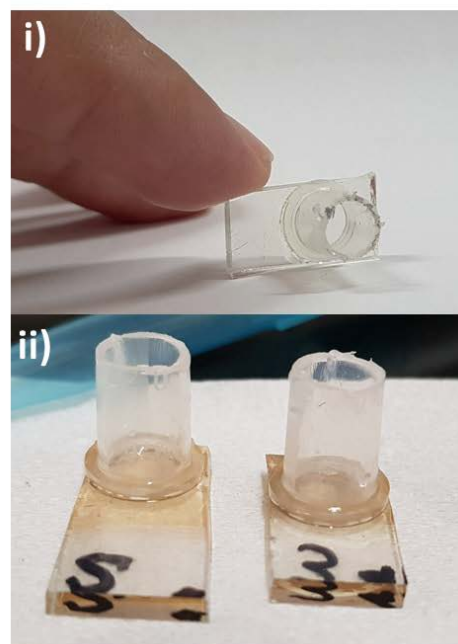
As análises eletroquímicas de imunossensoriamento baseado no filme de poli(azo-BBY)-AuNPs foram realizadas em uma minicélula eletroquímica construída sobre eletrodo de FTO (Figura 15).

Figura 15-A) Representação esquemática das características e dimensões da célula eletroquímica para as imunorreações. B) Imagens dos eletrodos antes (i) e após (ii) a modificação com o filme nanocompósito.

A)



B)



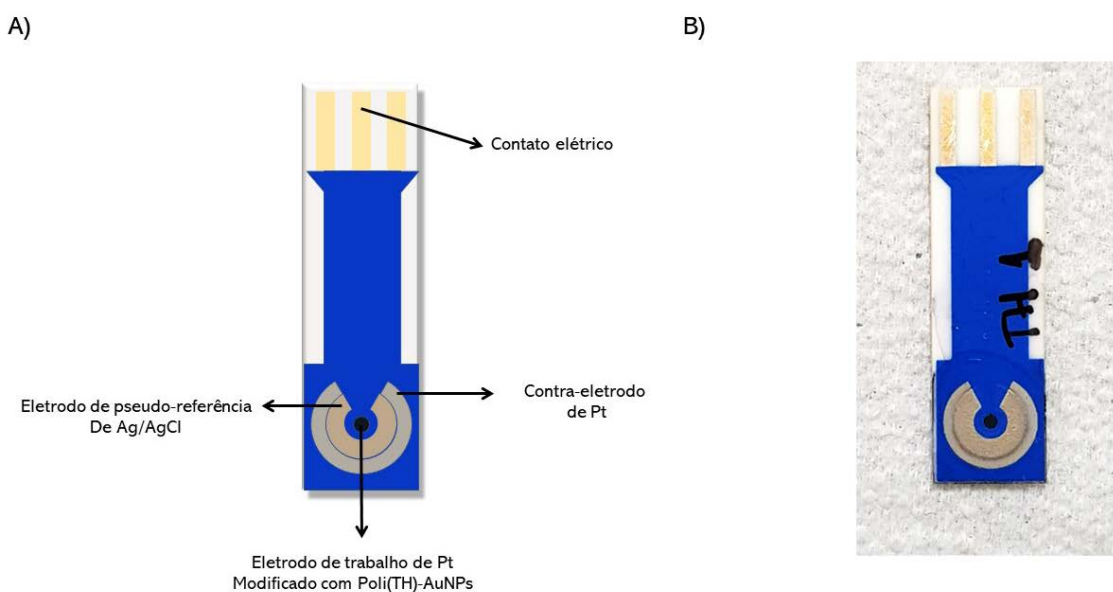
Fonte: Autoria própria.

A construção da célula teve início com o corte de um eppendorf de 500 μL aproximadamente em sua metade. A metade vasada do eppendorf foi posicionada e fixada sobre o eletrodo de FTO com o auxílio de base de tinta esmalte. A célula foi levada para um recipiente plástico e aguardava-se cerca de 1 hora para a total evaporação do solvente da tinta esmalte. Nessa configuração, usou-se a minicélula como eletrodo de trabalho, um fio de platina como eletrodo auxiliar e um fio de prata como pseudo-eletrodo de referência. O eletrodo de pseudo-referência teve seu potencial calibrado em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ na concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,50 \text{ mol L}^{-1}$. Houve um deslocamento catódico de aproximadamente -100 mV vs ECS. Para fins de padronização, todos os potenciais serão apresentados versus o potencial do eletrodo de calomelano saturado (ECS).

3.5.2.3. Análise Imunoeletroquímica para Espécie de GLUT-4

As análises eletroquímicas de imunossensorialmento da espécie de GLUT-4 baseado no filme de poli(TH)-AuNPs foram realizadas sobre eletrodo do tipo impresso (Figura 16) (do inglês *screen printed electrode* – SPE) da BVT Technologies, modelo AC1.W2.R1, contendo três eletrodos: eletrodo de trabalho de disco de platina (área geométrica de $0,79 \text{ mm}^2$), contra eletrodo de platina e um eletrodo de pseudo-referência de Ag/AgCl.

Figura 16-A) Representação esquemática do eletrodo impresso utilizado para fabricação do imunossensor de GLUT-4. B) Imagem do eletrodo modificado com filme de poli(TH)-AuNPs.



Fonte: Autoria Própria.

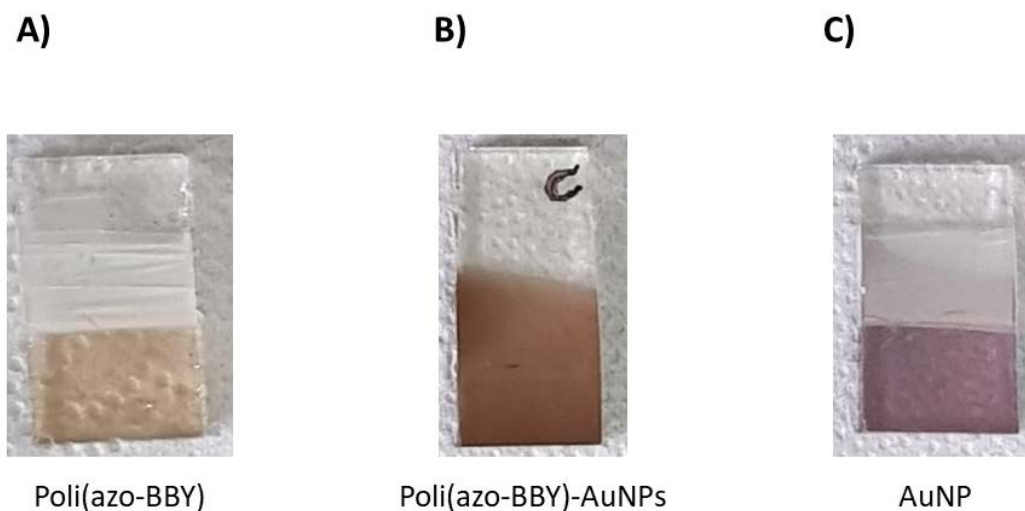
3.5.3. Eletropolimerização e Eletrodeposição

3.5.3.1. Bismark Brown Y

Anterior a eletropolimerização e eletrodeposição, os eletrodos de trabalho de FTO foram limpos. A limpeza consistiu em adicionar os eletrodos lado a lado com a face condutora voltada para cima em um copo de béquer. Após, adicionou-se acetona até que todo o corpo dos eletrodos estivesse submerso. O sistema foi posto em agitação por ultrassom por 5 minutos. Os eletrodos de FTO foram retirados um a um, lavados abundantemente com água deionizada e secos em fluxo de gás N_2 . Com os eletrodos secos, e com o auxílio de um paquímetro e fita Parafilm®, foram feitas delimitações na intenção de se obter uma área geométrica delimitada de $1,00\text{ cm}^2$.

A formação do filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-AuNPs por eletropolimerização foi realizada pela aplicação de 20 ciclos de potenciais, a uma velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} em um intervalo de potencial de $-0,30$ a $+1,0\text{ V}$ (vs. ECS) em solução contendo o monômero Bismarck Brown Y e $HAuCl_4$ em $HCl\ 0,10\text{ mol L}^{-1}$ em atmosfera de N_2 a 25°C . A eletropolimerização do poli(azo-BBY)-AuNPs resultou em um filme opaco de cor marrom (Figura 17). Após a síntese, o filme foi lavado em abundância com água deionizada com intuito de retirar possíveis monômeros adsorvidos. O filme pronto foi estocado em recipiente plástico com a face condutora voltada para cima.

Figura 17-Imagens dos eletrodos de FTO após eletropolimerização e eletrodeposição. A) Filme de poli(azo-BBY), B) filme de poli(azo-BBY)-AuNPs e C) eletrodo modificado com AuNP.



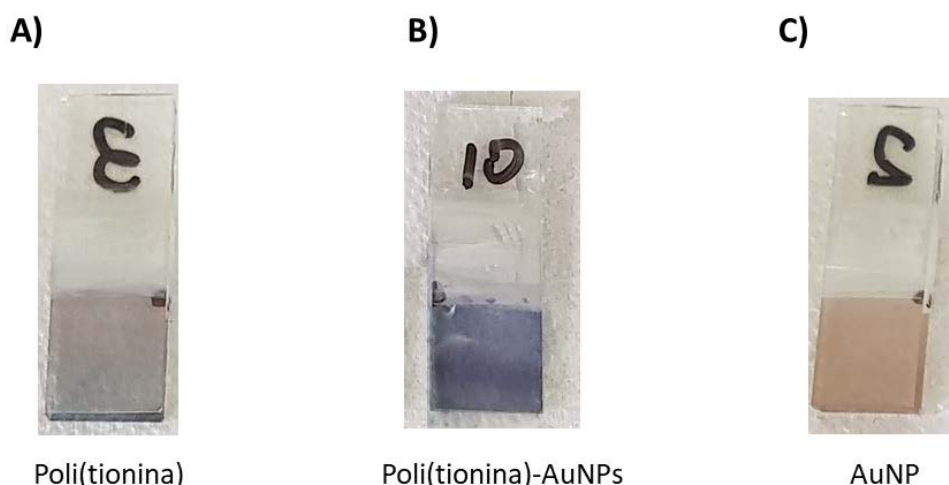
Fonte: Autoria própria.

A eletropolimerização do filme contendo somente o azo-polímero (poli(azo-BBY)) e a eletrodeposição somente da nanopartícula de ouro (AuNPs) foram conduzidas mantendo-se os parâmetros eletroquímicos. Porém, na solução de HCl 0,10 mol L⁻¹ foi adicionado somente o monômero BBY ou somente o sal de ouro. O filme de poli(azo-BBY) apresenta uma coloração característica marrom-avermelhada, enquanto o eletrodo com nanopartícula de ouro eletrodepositada apresentou a cor rósea.

3.5.3.2. Tionina

A formação do filme nanocompósito de poli(TH)-AuNPs por eletropolimerização foi realizada pela aplicação de 30 ciclos de potenciais, a uma velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹ em um intervalo de potencial de -0,30 a +1,60 V (vs. ECS) em solução de eletropolimerização com atmosfera de N₂ a 25°C. A eletropolimerização do poli(TH)-AuNPs resultou em um filme opaco de cor azul (Figura 18). Após a síntese, o filme foi lavado em abundância com água deionizada com intuito de retirar possíveis monômeros adsorvidos. O filme pronto foi estocado em recipiente plástico com a face condutora voltada para cima.

Figura 18-Imagens dos eletrodos de FTO após eletropolimerização e eletrodeposição. A) Filme de poli(TH), B) filme de poli(TH)-AuNPs e C) eletrodo modificado com AuNPs.



Fonte: Autoria Própria.

A eletropolimerização do filme contendo somente a tionina (poli(TH)) e a eletrodeposição somente da nanopartícula de ouro (AuNPs) foram conduzidas mantendo-se os parâmetros eletroquímicos. Porém, na solução de HCl 0,10 mol L⁻¹ foi adicionado somente

o monômero de tionina ou somente o sal de ouro. O filme de poli(TH) apresenta uma coloração característica azul, enquanto o eletrodo com nanopartícula de ouro eletrodepositada apresenta a cor rósea.

3.5.4. Avaliação do Desempenho Eletroquímico dos Filmes Poliméricos e Nanocompósitos

As caracterizações eletroquímicas por voltametria cíclica foram conduzidas em soluções de KCl 0,50 mol L⁻¹ (pH 2,0) e de PBS 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,4) utilizando velocidade de varredura de 25 mV s⁻¹ e 3 ciclos de potenciais aplicados. O momento da utilização de cada uma das soluções foi indicada durante o texto. Apenas o terceiro ciclo foi utilizado para o estudo do desempenho eletroquímico, após confirmação da sua estabilização em comparação ao segundo ciclo de potencial.

As medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica foram realizadas dentro de uma gaiola de Faraday devidamente aterrada. Utilizou-se o modo de varrimento de frequências, aplicando uma onda senoidal (AC) de 10 mV de amplitude em intervalo de frequência aplicada de 50 kHz a 0,10 Hz (10 passos por década). Os potenciais de corrente direta (DC) utilizados foram descritos durante o texto. Os ajustes matemáticos feitos sobre modelos de circuito equivalentes foram calculados por meio do software EIS Spectrum Analyzer. Nesse sentido, os elementos de capacitância foram substituídos por elementos de fase constante (CPE do inglês *Constant Phase Element*). O CPE é um elemento não-físico que representa a o desvio da idealidade dos elementos capacitivos de um sistema eletroquímico e é definido pela Eq. 4:

$$CPE = \frac{1}{Q(j\omega)^\alpha} \quad (4)$$

onde ω é a frequência angular e α é o expoente com valores contidos entre -1 e 1. Sendo $\alpha = 1$ um capacitor ideal.

Os valores de capacitância complexa foram obtidos pelo tratamento dos dados de impedância utilizando as equações Eq. 5 e 6 (FERNANDES et al., 2013):

$$C' = \frac{-Z''}{\omega|Z|^2} \quad (5)$$

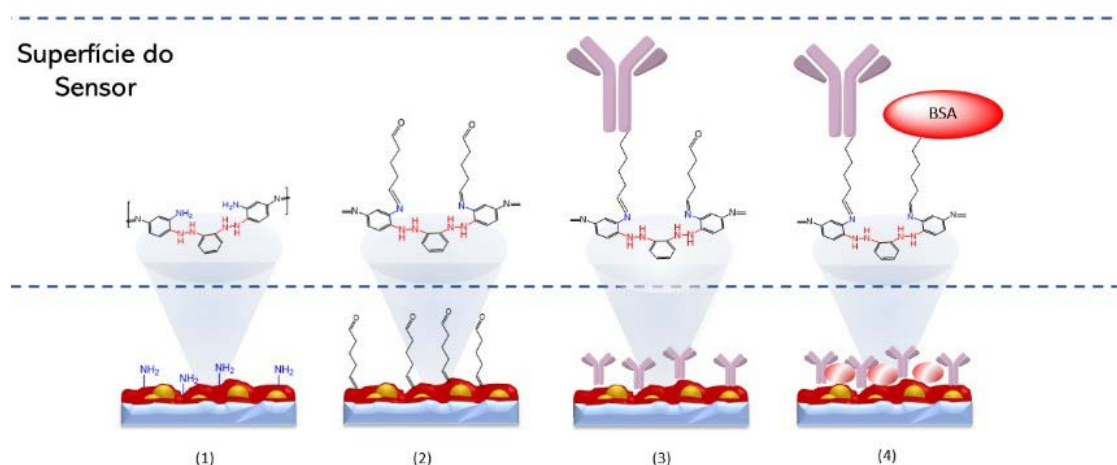
$$C'' = \frac{Z'}{\omega|Z|^2} \quad (6)$$

Onde C' é a capacitância real, C'' a capacitância imaginária e $|Z| = ((Z')^2 + (-Z'')^2)^{1/2}$.

3.5.5. Síntese do Imunossensor de Espécie de DNA metilado Basado no Filme de Poli(azo-BBY)-AuNPs

A preparação do imunossensor foi realizada por imobilização covalente do anticorpo 5-metilcitosina (Ab-5-mC) utilizando glutaraldeído (GA) como agente de ligação cruzada. A sequência de modificações foi esquematicamente ilustrada e pode ser conferida na Figura 19.

Figura 19-Ilustração das etapas de construção do imunossensor. Os números abaixo estão representando as etapas de modificação.



Fonte: Autoria própria.

Em resumo, antes de imobilizar o anticorpo na superfície do dispositivo revestido com poli(azo-BBY)@AuNPs (etapa 1), a superfície foi lavada com solução de PBS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,40). Após a lavagem com o tampão, $20 \mu\text{L}$ de solução de glutaraldeído a 5% (m/v) foi derramado na superfície e deixado em repouso por 5 minutos (etapa 2). O excesso de glutaraldeído na superfície do dispositivo foi removido por lavagem sucessiva com a solução de PBS. Posteriormente, $20,0 \mu\text{L}$ de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de solução de anticorpo 5-metilcitosina (Ab-5-mC) foi adicionado e deixado incubar à temperatura ambiente por 30 min (etapa 3). Novamente, o dispositivo revestido com poli(azo-BBY)@AuNP/Ab-5-mC foi lavado suavemente com tampão. Os sítios ativos de glutaraldeído remanescentes na superfície do polímero foram desativados por incubação com uma solução de albumina sérica bovina (BSA)

a 1% por 30 min (etapa 4). Por fim, o imunossensor foi lavado e utilizado para medidas impedimétricas. Quando não estava em uso, o imunossensor foi armazenado na geladeira em solução de PBS a -4°C.

3.5.6. Síntese do Imunossensor para GLUT-4 Baseado no Filme de poli(TH)-AuNPs

O preparo do imunossensor eletroquímico para Glut-4 envolveu a incubação do anticorpo Anti-Glut4 sobre a superfície do eletrodo SPE modificado com o filme de poli(TH)-AuNPs pelo método de adsorção física (Figura 20). Para isso, usou-se uma solução de tampão fosfato salina (PBS) na concentração de 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,4) contendo 0,3 mg mL⁻¹ do anticorpo GLUT-4. Com o auxílio de uma micropipeta, retirou-se 1 µl da solução contendo o anticorpo e espalhou-se esse volume sobre o filme nanocompósito. O sensor modificado foi então mantido em incubação por 12 horas (*overnight*) em temperatura de 4°C. Após o período de incubação, o eletrodo foi lavado com solução STF fria (~10°C) para retirada dos anticorpos que não aderiram ao sensor. Quando não estava em uso, o imunossensor foi armazenado na geladeira em solução de PBS a -4°C.

Figura 20-Representação esquemática do preparo do imunossensor para GLUT-4. Os números abaixo estão representando as etapas de modificação.



Fonte: Autoria Própria.

3.5.7. Curva Analítica para Padrão de DNA Metilado

A obtenção da curva analítica para o imunossensor de DNA metilado foi realizada como segue: com o auxílio de uma micropipeta de volume ajustável adicionou-se 250 µL de solução PBS, previamente saturado com gás oxigênio e em equilíbrio atmosférico, na célula eletroquímica adaptada (Figura 15). Fazia-se então a adição de padrão e aguardava-se o tempo de incubação de 40 minutos. Ao final do tempo de incubação fazia-se a análise por espectroscopia de impedância eletroquímica. Para cada adição foram registrados três

espectros. Após, dispensava-se solução analisada, lavava-se a superfície do imunossensor três vezes com solução de PBS e repetia-se o processo com o próximo padrão. Os espectros obtidos foram analisados pela aplicação de ajustes matemáticos sobre modelo de circuito equivalente.

3.5.8. Curva Analítica para Imunossensor de GLUT-4

A obtenção da curva analítica para o imunossensor de GLUT-4 foi realizada como segue: com o auxílio de uma micropipeta de volume ajustável adicionou-se 50 μL de solução PBS, previamente saturado com gás oxigênio e em equilíbrio atmosférico, sobre o eletrodo impresso. Fazia-se então a adição de padrão e aguardava-se o tempo de incubação de 60 minutos. Ao final do tempo de incubação fazia-se a análise por espectroscopia de impedância eletroquímica. Para cada adição foram registrados três espectros. Após, dispensava-se solução analisada, lavava-se a superfície do imunossensor três vezes com solução de PBS e repetia-se o processo com o próximo padrão. Os espectros obtidos foram analisados pela aplicação de ajustes matemáticos sobre modelo de circuito equivalente.

3.5.9. Análise de DNA metilado em Amostra Real

A análise de DNA metilado foi realizada em amostra de DNA extraída do músculo gastrocnêmico de rato Wistar macho (aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUAS da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNESP, campus de Presidente Prudente, Protocolo 01/2020). A extração foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Gasparino e colaboradores. A extração teve início pela adição do musculo gastrocnêmico em microtubo com 50 ml de tampão de lise (50 mmol L^{-1} tris-HCl, pH 8,0; 50 mmol L^{-1} de ácido etileno diamino tetracético – EDTA; 100 mmol L^{-1} de NaCl; 1% dodecil sulfato de sódio – SDS) e 200 mg/mL de Proteinase K (Invitrogen™) e em seguida incubados em banho-maria a 50 °C por uma noite. Posteriormente, o DNA foi purificado com duas extrações com fenol-Tris pH 8,0 e três de clorofórmio. Para a precipitação do DNA utilizou-se acetato de sódio (3 mol L^{-1}) e etanol absoluto (gelado) nas proporções de 1/10 e 2,5 vezes o volume, respectivamente, permanecendo incubado por 2 h a -20°C . Em seguida, o DNA foi retirado com uma pipeta de Pasteur adaptada, lavado com 2 mL de etanol 70%, e ressuspendido em 100 mL de tampão TE (10 mmol L^{-1} Tris-HCl, pH 8,0; 1 mmol L^{-1} de EDTA) e incubado com 30 mg/mL de RNase. O DNA permaneceu por 1 h em banho-maria a 37°C , sendo, em seguida, armazenado a -20°C , para posterior análise.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1. Desenvolvimento do Imunossensor Eletroquímico para Espécie de DNA metilado Baseado no filme nanocompósito de Bismarck Brown Y com Nanopartículas de Ouro

4.1.1. Construção do Nanocompósito de Azo-Polímero Condutor Redox com Nanopartículas de Ouro Encapsuladas

4.1.1.1. Eletropolimerização

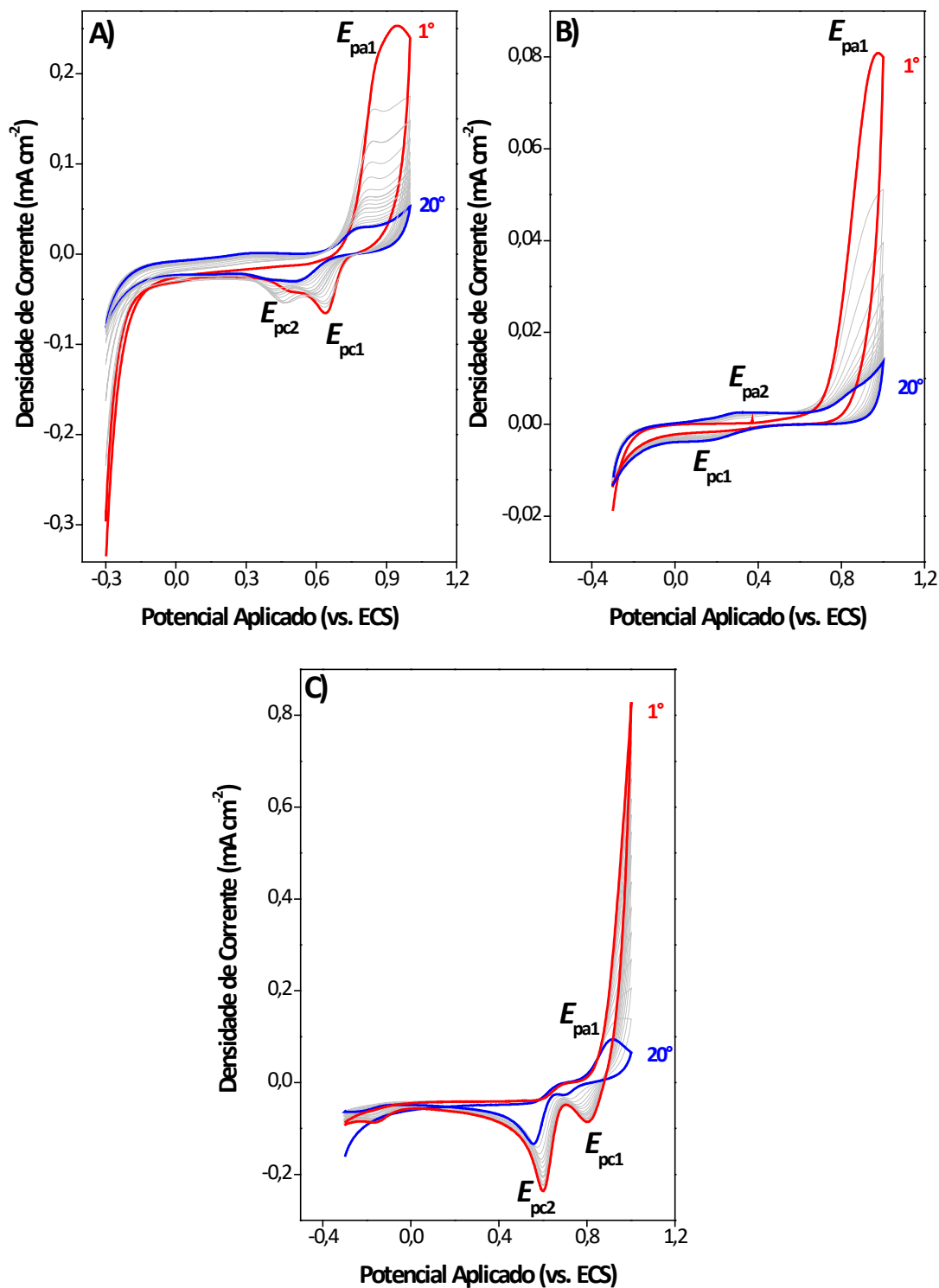
O filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-AuNPs foi construído em única etapa por eletropolimerização utilizando técnica de voltametria cíclica. Além de possibilitar amplo controle sobre a síntese do material, o uso da voltametria cíclica permite o acompanhamento do progresso da reação por meio dos voltamogramas (MARYS et al., 1999; ZHAO et al., 2020; OLEAN-OLIVEIRA et al., 2021).

Os parâmetros aplicados para a formação do filme nanocompósito, tais como velocidade de varredura, número de ciclos, intervalo de potencial aplicado e concentração do monômero em solução, foram baseados em estudos anteriormente realizados com o filme de poly(azo-BBY) (OLEAN-OLIVEIRA; OLIVEIRA BRITO; TEIXEIRA, ; OLEAN-OLIVEIRA; TEIXEIRA, 2018a; OLEAN-OLIVEIRA et al., 2019b, 2019a).

Na Figura 21 estão reunidos os voltamogramas cíclicos para eletropolimerização do filme de poli(azo-BBY)-AuNPs (Figura 21A), partindo de uma solução contendo o monômero de BBY e do sal HAuCl_4 ; do filme de poli(azo-BBY) (Figura 21B), partindo de uma solução contendo apenas o monômero de BBY; e para a eletrodeposição do ouro (Figura 21C) partindo de uma solução contendo apenas o sal de HAuCl_4 em solução.

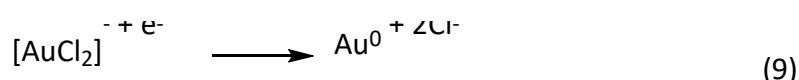
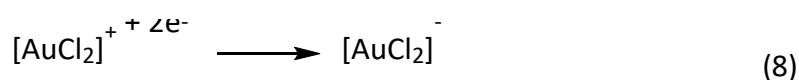
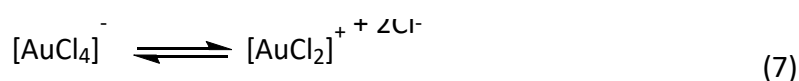
Avaliando-se o comportamento do filme poly(azo-BBY)-AuNPs (Figura 21A) durante a primeira varredura, avançando no sentido anódico de -0,30 para +1,0 V (vs. ECS), ficou claro a formação de um único pico de oxidação (E_{pa}) em 0,94 V. Por sua vez, durante a varredura catódica verificou-se dois picos de redução (E_{pc1} e E_{pc2}) nos potenciais de 0,64 e 0,47 V, respectivamente. Pela comparação do comportamento eletroquímico da formação dos filmes poli(azo-BBY)-AuNPs e poli(azo-BBY), foi possível verificar que o E_{pa} referente a formação do cátion radical pela oxidação do monômero de BBY (BBY^{*+}) foi mantido e sofreu apenas um pequeno deslocamento pela presença do sal de ouro ($E_{pa-BBY} = 0,97$ V).

Figura 21-Voltamogramas ciclicos para a eletropolimerização dos filmes de poli(azo-BBY)-AuNPs (A), poli(azo-BBY) (B) e eletrodeposição de nanopartículas de ouro (C) aplicado 20 ciclos de potenciais com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} em $\text{HCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$. $T=25^\circ$ e atmosfera de N_2 .



O comparativo dos voltamogramas para a eletropolimerização do filme de poli(azo-BBY)-AuNPs (Figura 21A) com a eletrodeposição do ouro (Figura 21C) permitiu concluir que os

picos observados durante a varredura catódica no primeiro ciclo são referentes a redução de espécies relacionadas ao sal de ouro. A presença de dois processos na varredura catódica é característica da redução de Au(III) para Au⁰ em duas etapas (ANDERSON; SAWTELLE, 1992). Em solução, o ácido HAuCl₄ é totalmente dissociado, encontrando-se na forma de [AuCl₄]⁻. A espécie de [AuCl₄]⁻ apresenta um equilíbrio químico com a espécie de [AuCl₂]⁺ (Eq. 7). Em sequência, o Au(III) na espécie [AuCl₂]⁺ sofre redução para Au(I), resultando no complexo [AuCl₂]⁻ (Eq. 8). Por fim, ocorre a redução de Au(I) para Au⁰ resultando na deposição de ouro formando as nanopartículas (Eq. 9).

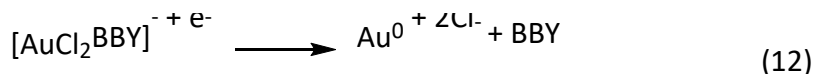
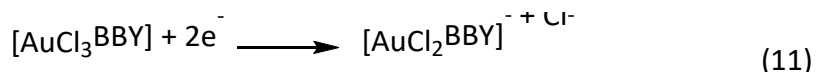
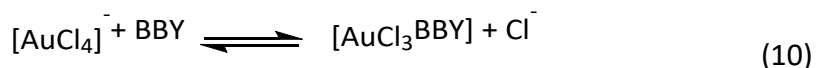


Contudo, foi verificado um deslocamento significativo dos valores de E_{pc} entre a solução contendo somente HAuCl₄ e a solução de eletropolimerização do poli(azo-BBY)-AuNPs (Tabela 2). Os valores variaram 0,16 e 0,14 V para E_{pc1} e E_{pc2} , respectivamente.

Tabela 2-Valores de potenciais de pico para o primeiro e último ciclo de potencial aplicado obtidos durante a eletropolimerização e eletrodeposição dos filmes sobre o eletrodo de FTO.

Eletrodo	1º Ciclo			20º Ciclo			
	E_{pa}	E_{pc1}	E_{pc2}	E_{pa}	E_{pa2}	E_{pc1}	E_{pc2}
V (vs ECS)							
Poli(azo-BBY)	0,97	-	-	0,86	0,31	0,14	-
AuNP	-	0,80	0,60	0,91	-	0,70	0,55
Poli(azo-BBY)@AuNP	0,94	0,64	0,47	0,77	-	0,50	0,40

Esse deslocamento pode ser resultado de uma interação entre o [AuCl₄]⁻ e o monômero BBY em solução, como por exemplo a entrada do BBY na esfera de coordenação do Au(III) pela substituição de um íon Cl⁻ com posterior redução da nova espécie formada em duas etapas (Eq. 10-12):



Resultado semelhante foi verificado por Đurović e colaboradores (ĐUROVIĆ et al., 2014), onde foi estudado a reação do íon $[\text{AuCl}_4]^-$ com diferentes nucleófilos. No trabalho, durante a investigação da reação do sal de ouro com o ligante piridina, os autores reportaram um deslocamento de 0,15 V no sentido catódico devido a formação de um complexo de Au-Py pela substituição de um cloreto por um ligante Py.

Com o desenvolvimento da eletropolimerização, uma alteração na intensidade e posição dos picos de potencial foram evidenciados. Primeiramente, o pico de oxidação (E_{pa}) apresentou progressivo deslocamento para menores valores, atingindo valor mínimo de 0,79 V no 20º ciclo de potencial aplicado. O deslocamento do potencial é indicativo da diminuição da energia necessária para geração de cátions radicais de BBY. O efeito de diminuição do sobrepotencial após a formação de núcleos do mesmo material é tipicamente verificado em metais, onde o potencial necessário para a formação dos primeiros núcleos é superior ao necessário para o desenvolvimento da reação após etapa de nucleação (MAYET et al., 2019; WANG et al., 2021). Comportamento semelhante pode estar ocorrendo para o filme de poli(azo-BBY).

Os picos de redução também sofreram deslocamento significativo no sentido catódico (Tabela 2). No filme de poli(azo-BBY)-AuNP, após completado o 20º ciclo, os picos catódicos antes claramente identificáveis, agora foram verificados sobrepostos. Novamente, o deslocamento para menores valores de potenciais representa uma diminuição da energia necessária para realização da redução das espécies.

O valor de corrente foi outro ponto observado durante o progresso da eletropolimerização. O filme de poli(azo-BBY) apresenta característica de incremento da corrente no intervalo de 0,0 a 0,60 V (vs. ECS) com o aumento do número de ciclos aplicados em função da formação do filme polimérico condutor sobre a superfície do eletrodo (OLEAN-OLIVEIRA; OLIVEIRA BRITO; TEIXEIRA, ; TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016a; OLEAN-OLIVEIRA et

al., 2019c; PACHECO; OLEAN-OLIVEIRA; TEIXEIRA, 2020; TREVIZAN et al., 2021). Semelhante comportamento foi verificado para o filme de poli(azo-BBY)-AuNPs.

A diminuição da corrente na região de E_{pa} anódico para ambos, poli(azo-BBY) e poli(azo-BBY)-AuNP, é um comportamento característico de eletropolimerização de filmes finos de polímeros condutores. Apesar da presença do polímero sobre a superfície do eletrodo resultar na diminuição do sobrepotencial necessário para conduzir a reação, a quantidade de cátions radicais formados diminui em função da diminuição da condutividade da superfície do eletrodo pela presença do filme polimérico.

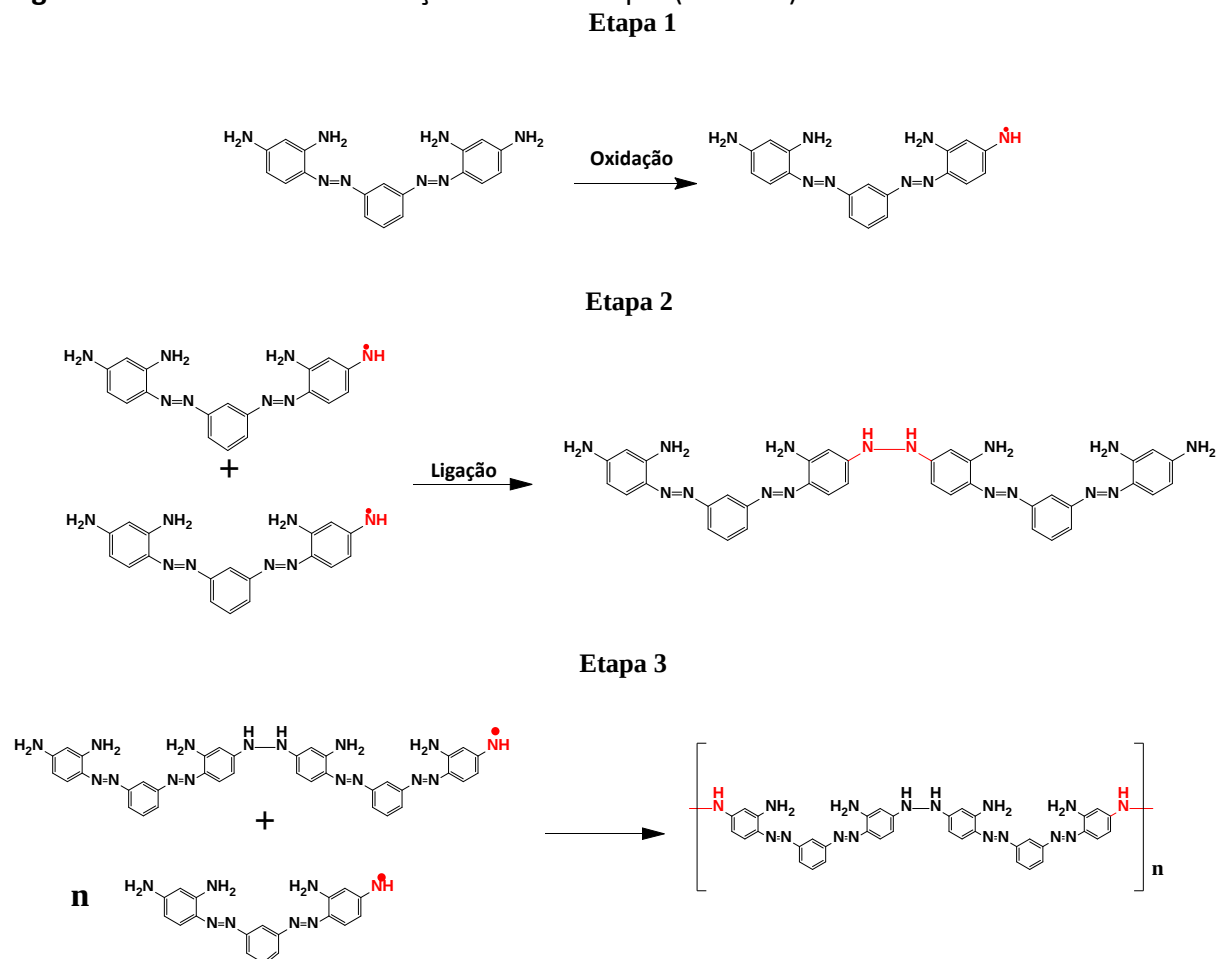
4.1.1.2. Mecanismo de formação do filme de poli(azo-BBY)-AuNPs e arquitetura formada

Até o momento, e no melhor de nossos esforços, não foram encontrados trabalhos reportando comportamento semelhante para a formação de nanopartículas encapsuladas por filmes poliméricos por etapa única e técnicas eletroquímicas. De fato, foi possível encontrar trabalhos aplicando semelhante estratégia e até mesmo formando nanopartículas aparentemente dentro da matriz polimérica, mas faziam isso em etapas separadas (GUTIÉRREZ PINEDA et al., 2015; INAGAKI; OLIVEIRA; ZARBIN, 2018; LU et al., 2018). Contudo, em nenhum deles foi proposto mecanismo para sua formação. Assim, baseados em trabalhos de eletroformação de nanopartículas de ouro e eletrocaracterizações conduzidas, foi proposto um modelo de formação do filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-AuNPs.

A hipótese para formação do filme nanocompósito tem início pela formação de uma primeira fina camada de filme polimérico de Bismark Brown Y ao final da primeira varredura avançando no sentido anódico. O mecanismo de formação de filmes poliméricos baseados em monômeros de Bismark Brown Y são amplamente difundidos na literatura e está representado esquematicamente na Figura 22 (TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016a; OLEAN-OLIVEIRA et al., 2019c, 2019b, 2021; PACHECO; OLEAN-OLIVEIRA; TEIXEIRA, 2020; TREVIZAN et al., 2021). A formação do filme de poli(azo-BBY) inicia-se pela formação do cátion radical $BBY^{\bullet+}$ (parte 1) pela aplicação de potenciais anódicos superiores a +0,80 V (vs. ECS). Os $BBY^{\bullet+}$ formados reagem entre si (*head-to-head*) formando uma nova ligação covalente N-N (hidrazina) (parte 2). Essa sequência de eventos ocorrendo de forma repetida resulta na formação da cadeia polimérica do poli(azo-BBY).

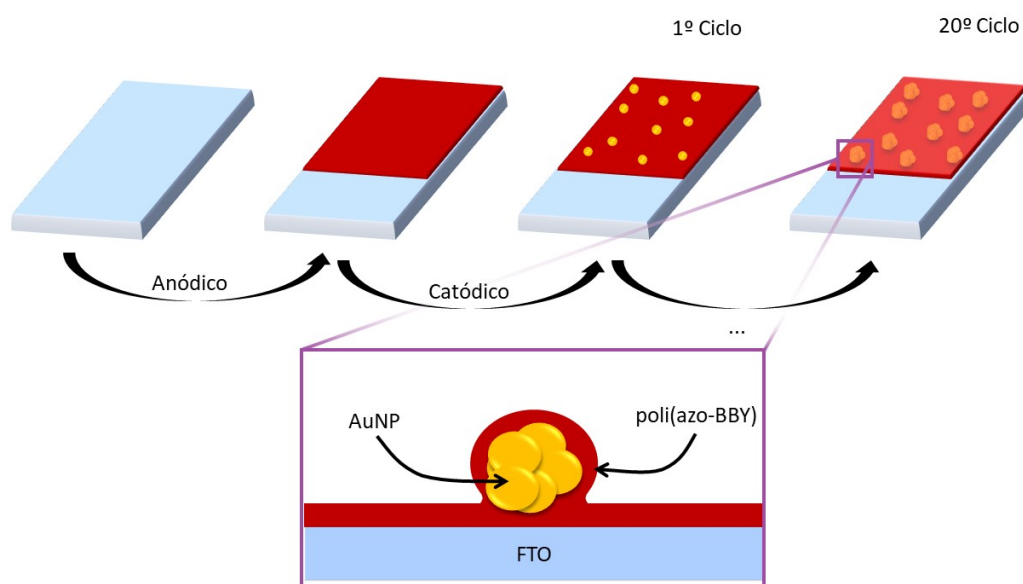
Após a primeira fina camada de azo-polímero formada (ou primeiros núcleos de polímeros), as espécies de ouro são eletroquimicamente reduzidas a Au^0 , passando pelas etapas convencionais de nucleação e crescimento (coalescência) (FREITAS DE FREITAS et al., 2018). Esses primeiros pequenos núcleos formados estão distribuídos ao longo de toda cadeia polimérica (Figura 23). Nos ciclos subsequentes o processo se repete, e novos núcleos são depositados sobre os núcleos anteriores, formando os nanoclusters. Ao mesmo tempo, camadas de poli(azo-BBY) vão se formando sobre os nanoclusters formados, encapsulando-os.

Figura 22-Mecanismo de formação do filme de poli(azo-BBY).



Fonte: Autoria própria.

Figura 23-Ilustração para a formação do filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-AuNPs sobre a superfície do eletrodo de FTO.



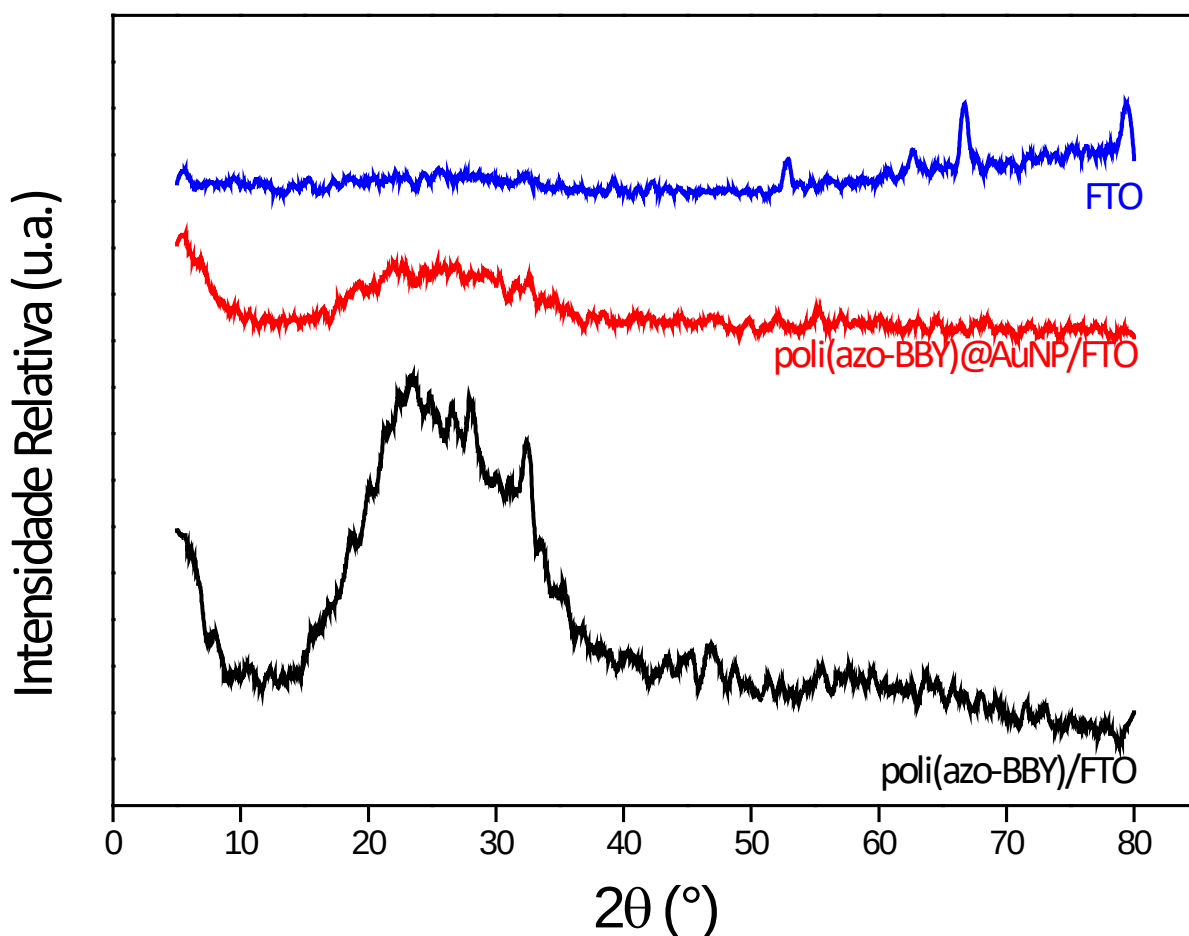
Fonte: Autoria própria.

4.1.2. Caracterização por Difração de Raios X

Os filmes eletropolimerizados de poli(azo-BBY) e poli(azo-BBY)-AuNPs foram caracterizados por técnica de Difração de Raios X e são apresentados na Figura 24. De acordo com a Figura 24, houve efetiva modificação da superfície do eletrodo de FTO, uma vez que após a modificação pelos filmes de poli(azo-BBY) e poli(azo-BBY)-AuNP não foi mais verificado o padrão de difração característico para o FTO (BATZILL; DIEBOLD, 2005).

Por sua vez, após a modificação com filme azo-polimérico o perfil apresentou um pico largo no intervalo de 15 a 40° característico para polímeros com estrutura amorfa (BEN ISHAY et al., 2016). A diminuição da intensidade do mesmo pico para o filme de poli(azo-BBY)-AuNPs pode revelar uma diminuição da organização estrutural do filme pela modificação do ambiente químico devido a introdução da nanopartícula a sua estrutura polimérica (ATANASOV et al., 2014; BEN ISHAY et al., 2016). Apesar da presença das nanopartículas no filme de poli(azo-BBY)-AuNPs, não foram constatados os picos relacionados a estrutura cristalina do ouro na forma de nanopartícula.

Figura 24-Difratograma de raios X dos eletrodos de FTO, poli(azo-BBY)@AuNP/FTO e poli(azo-BBY)/FTO.



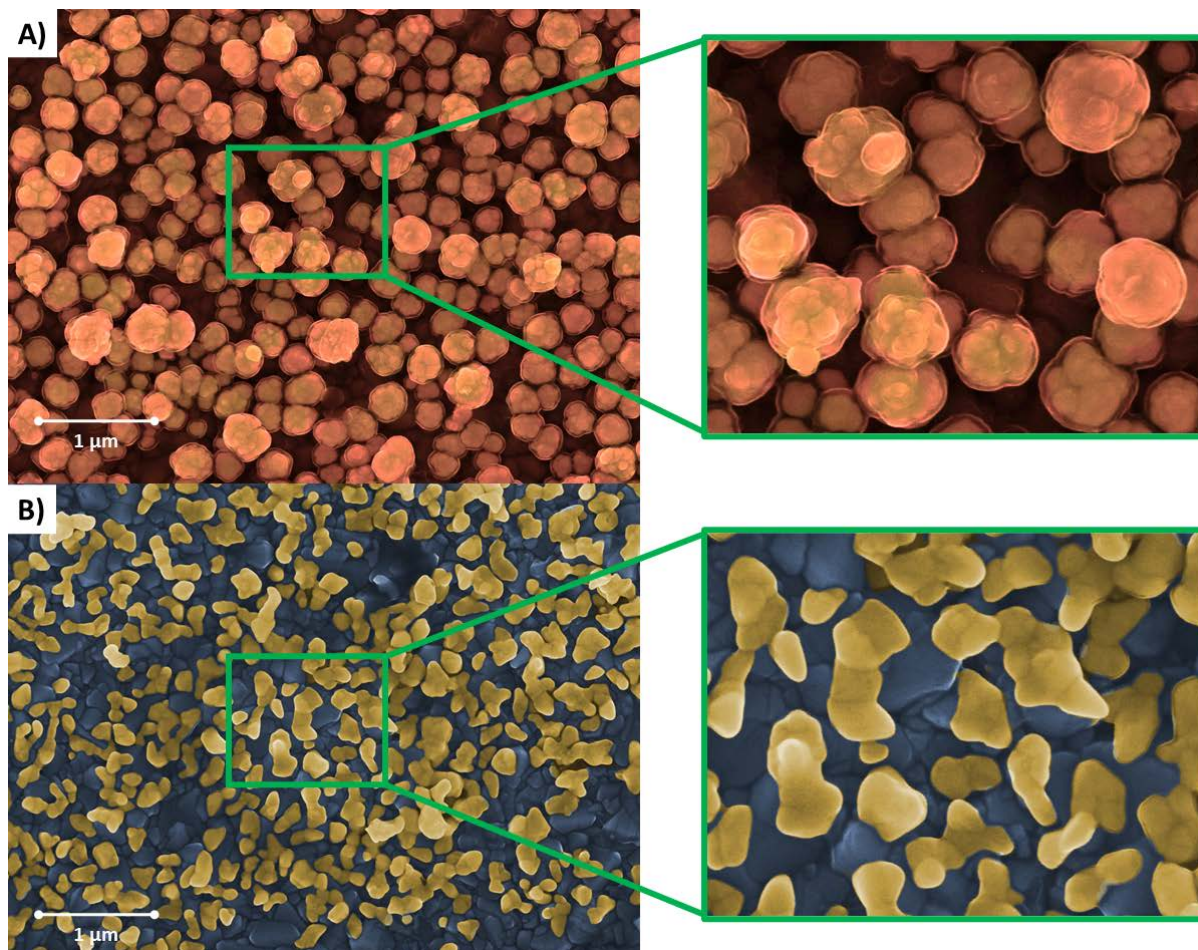
4.1.3. Caracterização morfológica

Para maior entendimento da estrutura formada após a eletropolimerização do filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-AuNPs, medidas de microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG) foram realizadas para obtenção de imagens para caracterização superficial (Figura 25). Durante a caracterização morfológica buscou-se realizar o comparativo da formação da estrutura de ouro na presença (poli(azo-BBY)-AuNP) e ausência do monômero (AuNP/FTO) na etapa de eletropolimerização.

Durante a análise da Figura 25A foi possível identificar claramente a formação das nanoestruturas de ouro na forma de clusters envolto por uma fina camada do filme azo-polimérico. A influência do polímero sobre a forma estrutural das nanopartículas ficou evidente ao realizar o comparativo para a Figura 25B. A eletrodeposição do ouro sem o

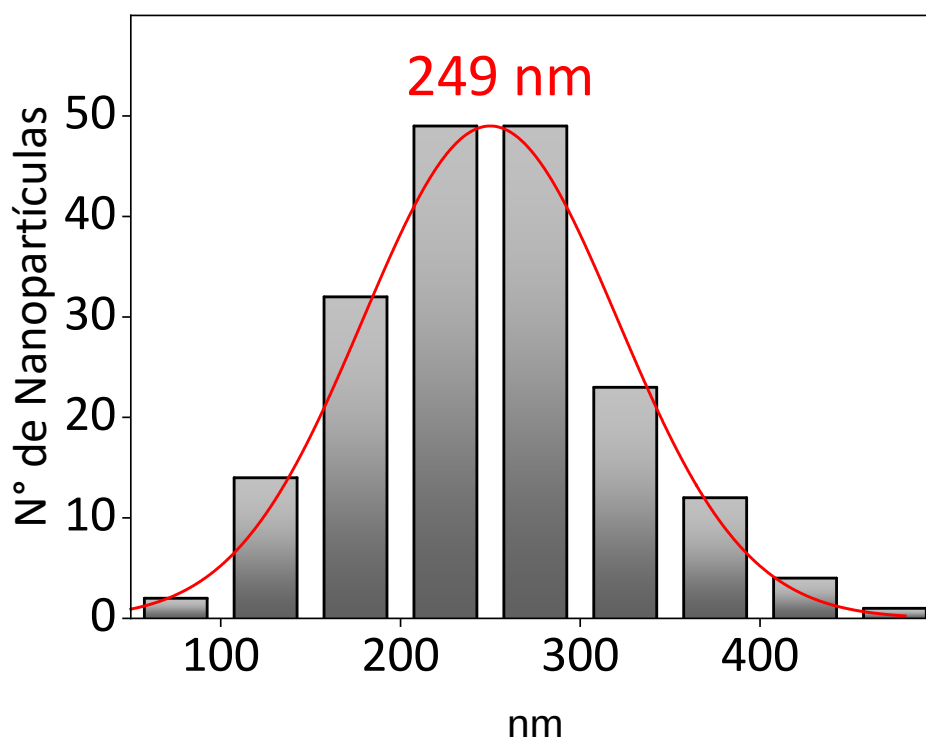
processo conjunto de formação do azo-polímero resultou em nanoestruturas irregulares espalhadas por toda a superfície do eletrodo de FTO.

Figura 25-Imagens obtidas por técnica de microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG) sobre os eletrodos de poli(azo-BBY)-AuNPs/FTO (A) e AuNP/FTO (B).



A partir da Figura 25, foram coletados os tamanhos médios das nanopartículas formadas para construção do histograma da Figura 26. A dimensão das nanopartículas variou entre 74 e 475 nm, com média de 249 nm. Devido a irregularidade da forma das nanopartículas eletrodepositadas sobre o eletrodo de FTO, não foi possível realizar a contagem e estimativa de seu tamanho médio.

Figura 26-Histograma com os valores de diâmetro médio das nanopartículas no filme de poli(azo-BBY)@AuNP.



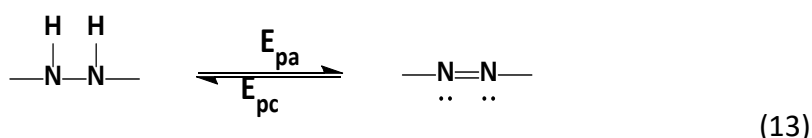
4.1.4. Caracterização eletroquímica do filme de poli(azo-BBY)-AuNPs

4.1.4.1. Caracterização por voltametria cíclica

O desempenho do filme de poli(azo-BBY)-AuNPs foi avaliado por voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica em solução PBS na ausência e presença de oxigênio dissolvido. A solução de tampão fosfato salino foi escolhida para os estudos em função da aplicação do nanomaterial sintetizado ser destinado a medidas de sensoriamento de biomateriais. A avaliação do desempenho eletroquímico na ausência e presença de O_2 dissolvido se faz necessária para avaliar e entender a reação promovida pelo oxigênio para o filme de Bismark Brown Y por meio da oxidação dos grupos azo presentes no polímero (OLEAN-OLIVEIRA; OLIVEIRA BRITO; TEIXEIRA, ; TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016b; OLEAN-OLIVEIRA; TEIXEIRA, 2018b). Os dados obtidos foram importantes para posterior utilização do oxigênio dissolvido como mediador redox na determinação da concentração de espécies de DNA metilado.

A Figura 27 apresenta os voltamogramas obtidos para os eletrodos de poli(azo-BBY)-AuNPs (Figura 27A), poli(azo-BBY) (Figura 27B) e AuNP (Figura 27C) em solução de PBS saturado com gás N_2 . Na ausência de O_2 é possível acompanhar os processos redox

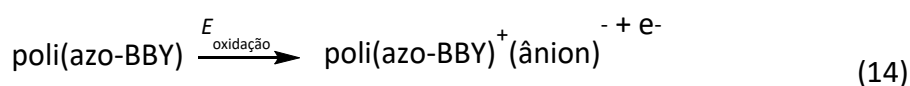
característicos do azo-polímero. Todos os eletrodos apresentaram comportamento redox. Para os eletrodos de poli(azo-BBY)-AuNPs e poli(azo-BBY), o sutil par redox visualizado foi associado a oxidação e redução do grupo azo na matriz polimérica (Eq. 13) (TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016a; OLEAN-OLIVEIRA; TEIXEIRA, 2018b).



O par redox verificado para o eletrodo de AuNP foi condizente com a formação de óxido sobre a superfície do ouro eletrodepositada, seguida de redução da camada de óxido formada (WANG et al., 2014).

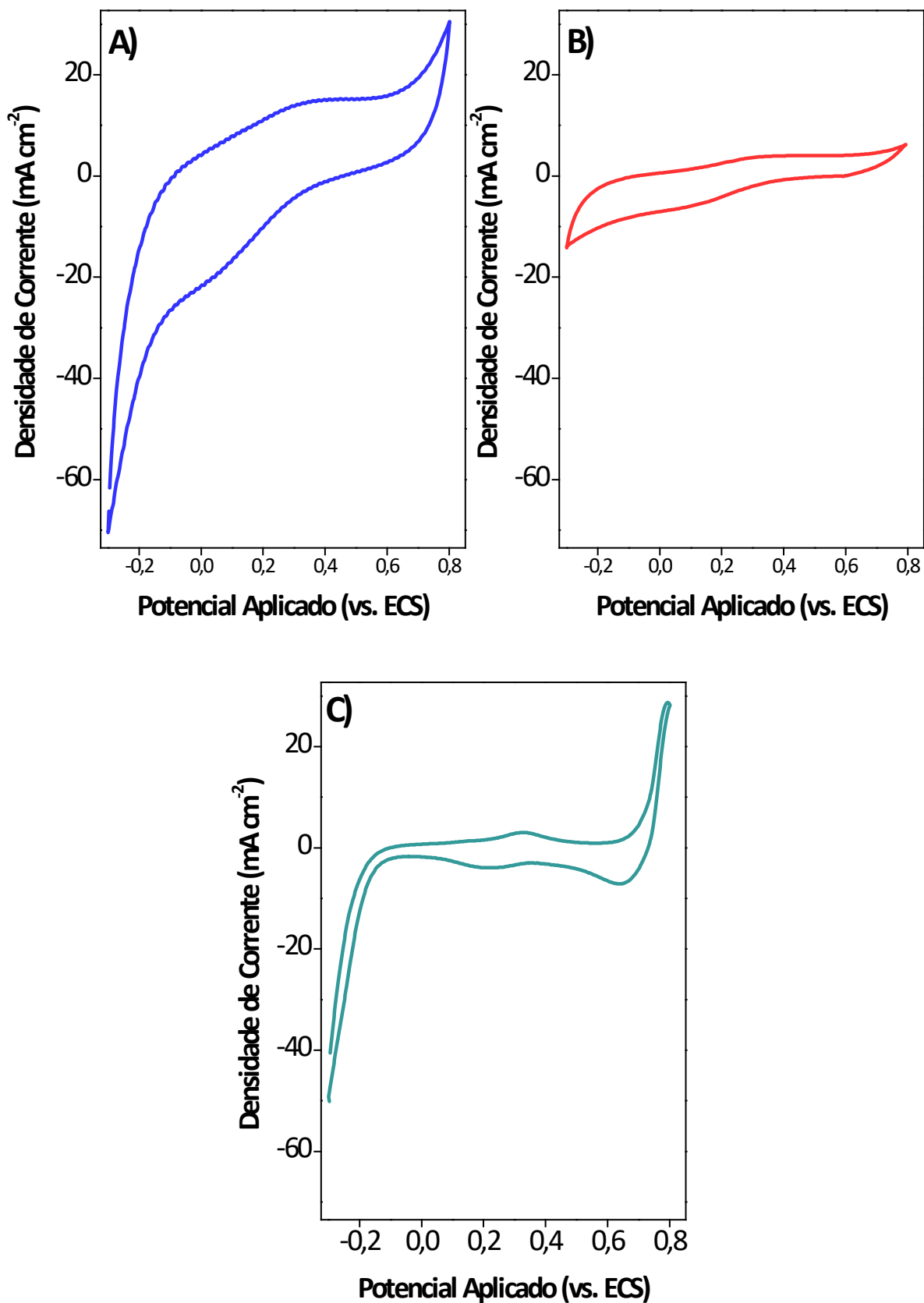
Em relação aos valores de corrente, foi perceptível um aumento significativo de seus valores para o eletrodo de poli(azo-BBY)-AuNP em relação ao eletrodo poli(azo-BBY). A ampliação da corrente faradaica é um indicativo do aumento do número de sítios redox ativos no polímero devido à presença das nanopartículas de ouro na matriz polimérica.

Foi verificado também um incremento da corrente não faradaica pela presença das nanopartículas. Filmes poliméricos condutores tipicamente apresentam alta capacidade de carregamento de carga devido a seu comportamento de pseudo-capacitância (SAHALIANOV et al., 2019). Durante a redução ou oxidação de seus centros redox contra-íons difundem para a matriz polimérica para equilíbrio das cargas elétricas, resultando em um carregamento de carga (pseudo-capacitância) (Eq. 14):



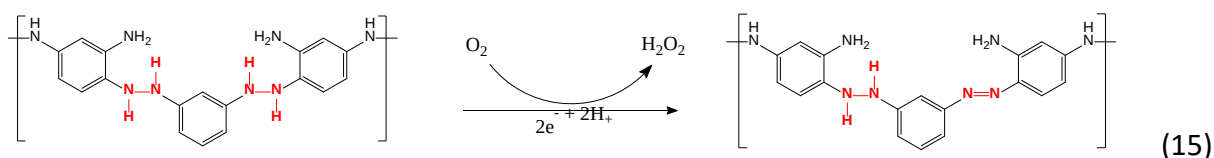
Dessa forma, o estudo voltamétrico para os eletrodos demonstrou um aumento do desempenho eletroquímico para o filme nanocompósito frente aos eletrodos modificados somente com o azo-polímero ou com as nanoestruturas de ouro eletrodepositadas. Em virtude da instabilidade do eletrodo de AuNPs e não atendimento dos objetivos do presente projeto, os próximos resultados focarão somente nos eletrodos de poli(azo-BBY)-AuNPs e poli(azo-BBY).

Figura 27-Voltamogramas cíclicos para a resposta eletroquímica dos filmes de poli(azo-BBY)@AuNP (A), poli(azo-BBY) (B) e AuNP (C) em solução de PBS 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,40) com velocidade de varredura de 25 mV s⁻¹. T=25° e atmosfera de N₂.



4.1.4.2. Resposta Frente ao Oxigênio Dissolvido

A ideia central para a proposta do presente material foi baseada em sua alta afinidade para a reação do grupo azo para a molécula de oxigênio (Eq. 15). A grande atenção sobre o oxigênio dissolvido foi em razão dessa espécie estar presente no meio reacional de imunoenaios, sejam eles eletroquímicos ou não. No melhor de nossos esforços, não foram encontrados registros nos protocolos para determinação de DNA metilado, assim como outros protocolos de imunossensores para outras espécies de antígeno, uma recomendação, ou exigência, para que fosse evitado o oxigênio dissolvido no meio reacional. Dessa forma, a utilização do oxigênio como mediador redox diminui a necessidade da adição de mais uma espécie química a solução (como por exemplo a adição do mediador redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$), ou a necessidade de etapas extras para marcação do antígeno ou anticorpo (*label-free*).

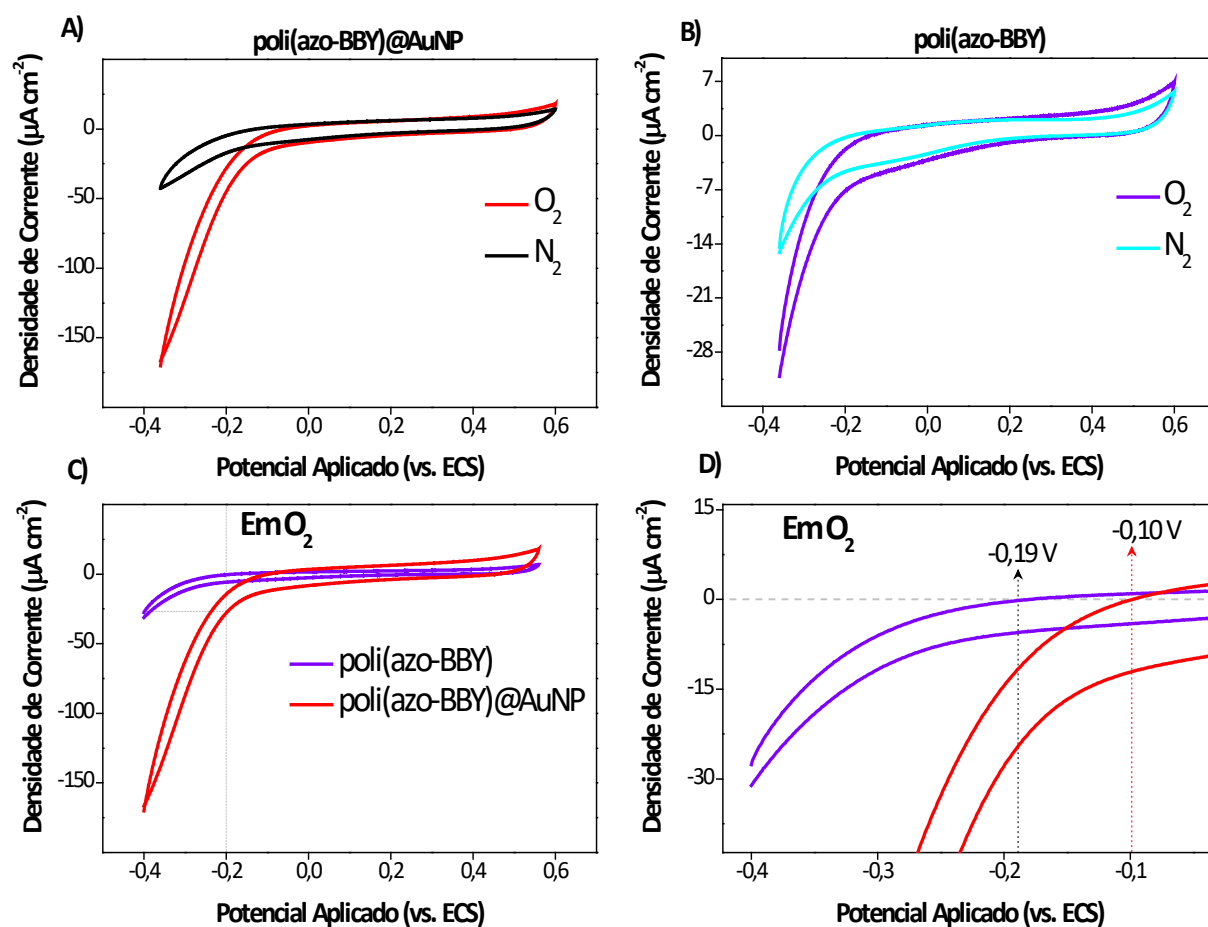


Na Figura 28 estão contidos os voltamogramas registrados na ausência (N_2) e presença de oxigênio dissolvido. Foi observado uma mudança significativa no perfil voltamétrico no intervalo de potencial de 0,0 a -0,40 V (vs. ECS), com incremento de corrente catódico relacionado a reação com o oxigênio. No potencial de -0,40 V (vs. ECS), os valores de corrente para o filme poli(azo-BBY)-AuNPs foram de -42 para -168 $\mu\text{A cm}^{-2}$, quando na presença de oxigênio dissolvido, representando um $\Delta I = 126 \mu\text{A cm}^{-2}$. Comparativamente, o incremento de corrente catódica para o filme de poli(azo-BBY) no mesmo potencial foi de apenas $\Delta I = 16 \mu\text{A cm}^{-2}$.

Esse resultado expressa o aumento do valor de corrente de aproximadamente 10 vezes. Resultados semelhantes de ganho de desempenho para reação de redução de oxigênio em sistemas contendo polímeros e nanopartículas foram encontrados (QIU et al., 2012; MUHAMAD; KHAIRUL; YUSOFF, 2019). O ganho de desempenho foi associado tanto ao aumento da área ativa dos materiais quanto pela capacidade catalítica da própria nanopartícula para a reação com o oxigênio. Também foi verificado uma diminuição do sobrepotencial para a reação com o oxigênio. Para o filme de poli(azo-BBY) a reação de

redução de oxigênio tem início em -0,19 V contra -0,10 V (vs. ECS) apresentado pelo filme nanocompósito. Uma diminuição de 90 mV na energia necessária para início da reação.

Figura 28- Voltamograma cíclico para resposta eletroquímica do filme de poli(azo-BBY)-AuNPs (A) e poli(azo-BBY) (B) em solução de PBS 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,40) saturado somente com o gás N₂ (linha preta) e somente com o gás O₂ (linha vermelha) com velocidade de varredura de 25 mV s⁻¹. C) Voltamograma comparativo para resposta em oxigênio dissolvido. D) Magnificação para região de reação de redução de oxigênio destacando os valores de potencial de *onset*.



4.1.4.3. Investigação por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

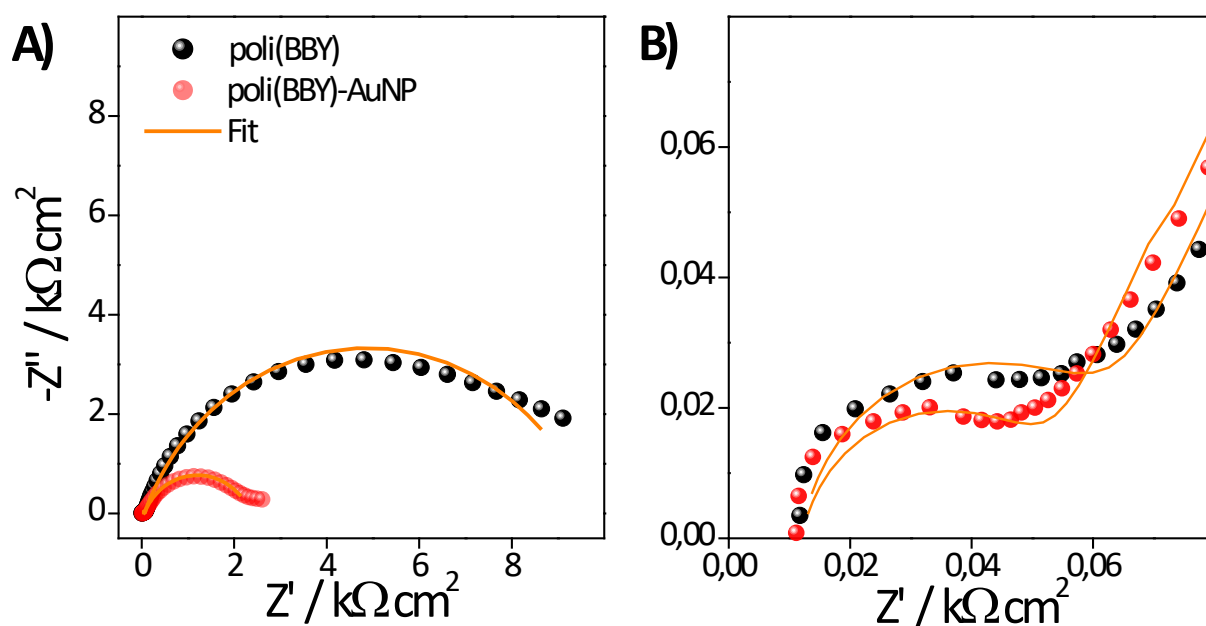
Os espectros obtidos para os filmes de poli(azo-BBY)-AuNPs e poli(azo-BBY) em potencial aplicado de -0,30 V (vs. ECS) na presença de oxigênio dissolvido estão reunidos na Figura 29. O potencial escolhido foi baseado nos resultados voltametricos do estudo anterior.

Foi possível verificar que ambos os eletrodos modificados apresentaram comportamento semelhante, onde dois arcos capacitivos foram evidenciados. O primeiro, de menor magnitude, em alta-média frequência (Figura 29B), comumente associado a fenômenos eletroquímicos ocorrendo na interface material/eletrodo (RANDVIIR; BANKS,

2013; LASIA, 2014; SINGH et al., 2015; RUDOLPH; RATCLIFF, 2017; ORAZEM; TRIBOLLET, 2020).

O segundo, de maior magnitude, em média baixa frequência (Figura 29A), comumente associado a fenômenos eletroquímicos na interface material/solução.

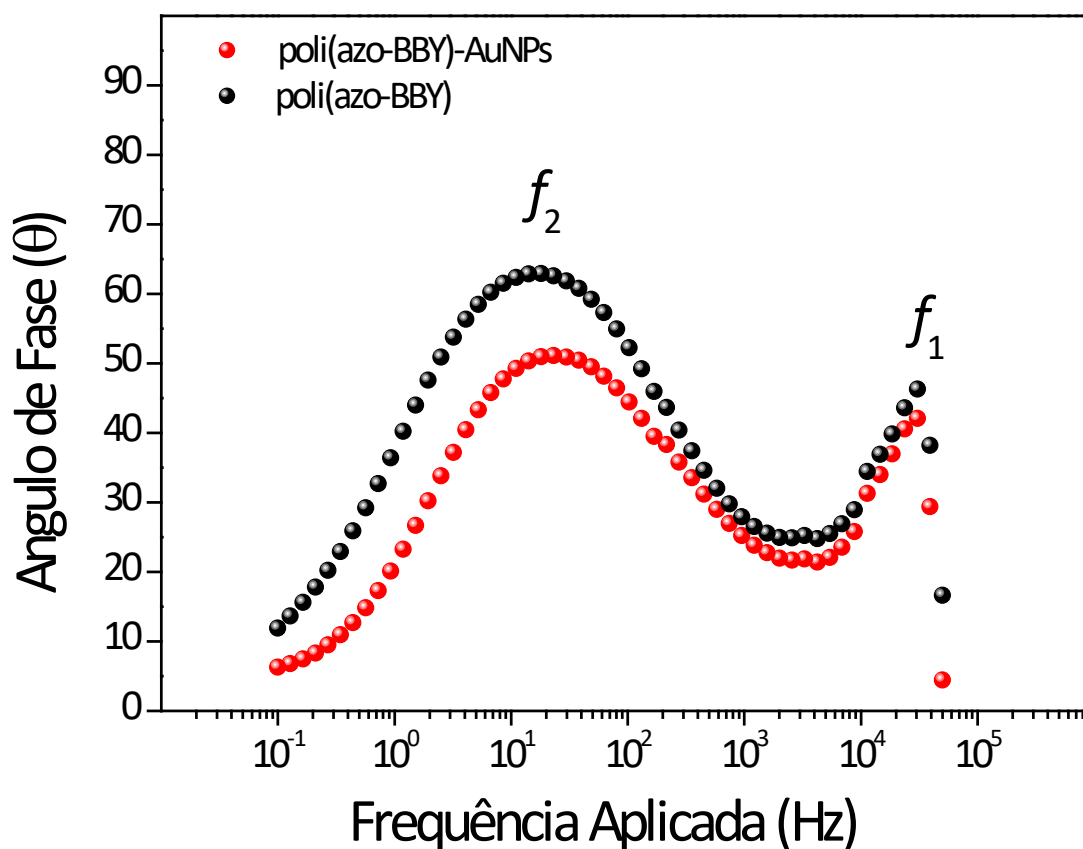
Figura 29-A) Espectros de Nyquist para os filmes de poli(azo-BBY)-AuNPs e poli(azo-BBY) em solução de PBS 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,40) saturado com gás O₂. Potencial aplicado de -0,30 V (vs. ECS). B) Magnificação do espectro para a região de alta frequência. O Fit linear é referente ao ajuste matemático do modelo de circuito equivalente da **Figura 32**.



O eletrodo de poli(azo-BBY)-AuNPs apresentou um arco capacitivo para a interface filme/solução significativamente menor em comparação com o filme de poli(azo-BBY)/FTO. A diminuição do arco é correlacionada com a diminuição da resistência de transferência de carga da interface (ORAZEM; TRIBOLLET, 2020), e consequentemente um indicativo de aumento do desempenho do filme nanocompósito frente a molécula de oxigênio dissolvido em comparação ao filme contendo apenas o azo-polímero.

Pela análise de BODE (θ versus log de Hz - Figura 30), foi constatado dois picos de frequência (f_1 e f_2). Especial atenção foi direcionada para o valor de f_2 , devido a essa frequência estar correlacionado com a reação com o oxigênio. O valor de frequência de pico é diretamente associado ao tempo de relaxação do sistema em uma relação inversa, o qual correlaciona a o tempo mínimo necessário para que um sistema que foi perturbado retorne a seu estado anterior a perturbação sofrida (ORAZEM; PÉBÈRE; TRIBOLLET, 2006; ORAZEM; TRIBOLLET, 2020).

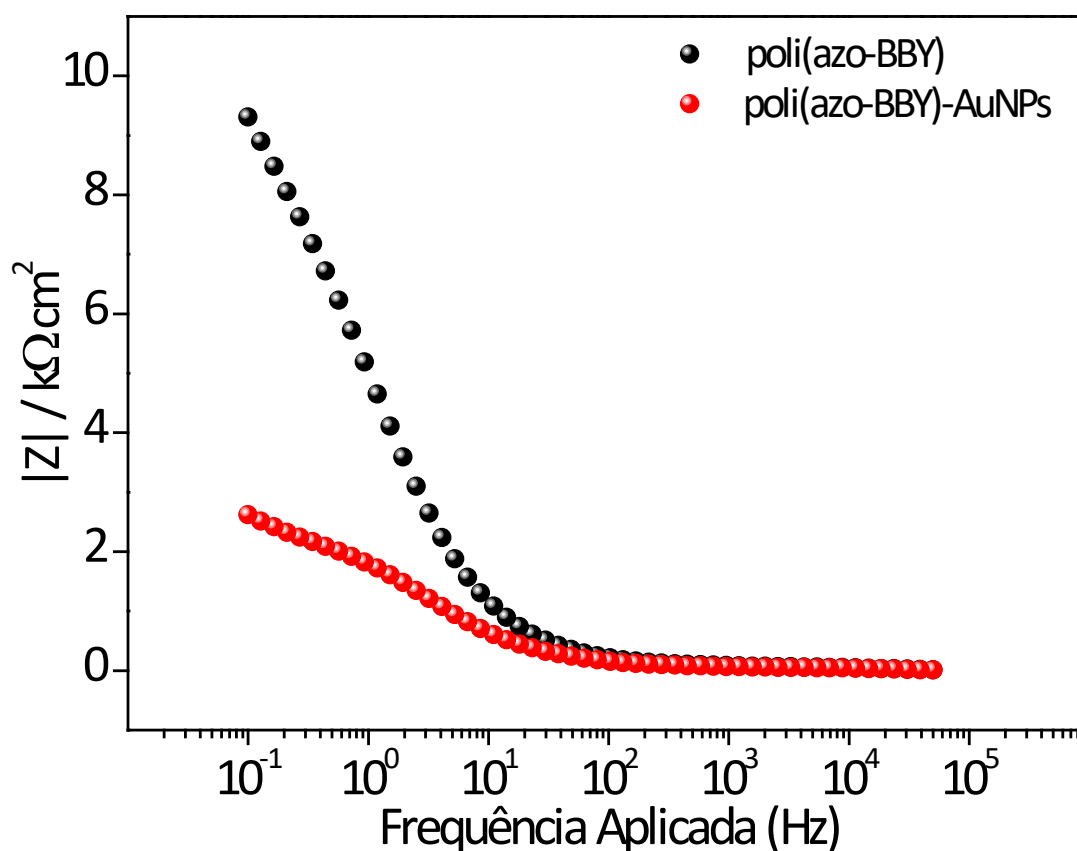
Figura 30-Espectro de BODE para os filmes de poli(azo-BBY)-AuNPs e poli(azo-BBY) em solução de PBS 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,40) saturado com gás O₂. Potencial aplicado de -0,30 V (vs. ECS).



Assim, maiores valores de frequência indicam, portanto, um melhor desempenho frente a reação que está sendo processada. De forma qualitativa, foi conclusivo que a presença das nanopartículas de ouro na matriz polimérica contribui diminuindo o tempo de relaxação e aumentando o desempenho eletroquímico do filme de poli(azo-BBY). Por sua vez, f_1 não demonstrou modificação de seu valor, sendo independente da presença das nanopartículas de ouro.

Por fim, a análise do espectro de BODE da Figura 31 (modulo da impedância versus frequência aplicada) foi realizada. A inclinação da região linear entre os platôs é um fator indicativo do valor de capacitância da dupla camada (C_{dc}). Quanto menor a inclinação, maior será o valor de C_{dc} . Consequentemente, a inclinação pode ser utilizada para verificação da área de superfície eletroativa. Nesse sentido, foi evidente o aumento da área de superfície ativa pela presença da nanopartícula para o filme de poli(azo-BBY)-AuNPs.

Figura 31- Espectro de BODE para os filmes de poli(azo-BBY)-AuNPs e poli(azo-BBY) em solução de PBS 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,40) saturado com gás O₂. Potencial aplicado de -0,30 V (vs. ECS).



4.1.4.4. Análise por Ajustes Matemáticos Sobre Modelos de Circuito Equivalente

Com o objetivo de realizar uma análise quantitativa dos elementos interfaciais, foi empregada a abordagem de ajuste matemático por modelos de circuito equivalente sobre os espectros obtidos (FREGER, 2005; LASIA, 2014; UYGUN; ERTUĞRUL UYGUN, 2014; ORAZEM; TRIBOLLET, 2020).

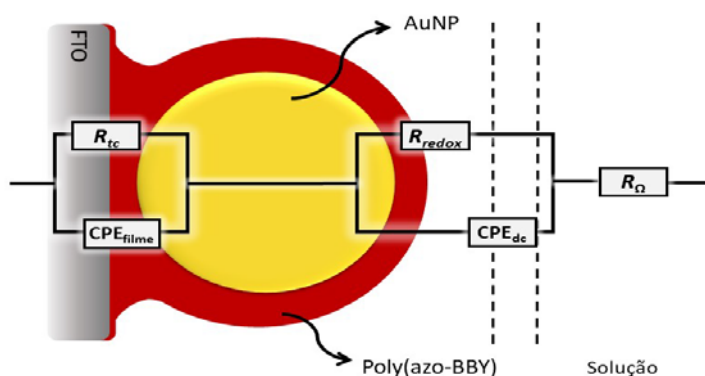
Analisando-se estrutura do poli(azo-BBY)-AuNPs, verificadas anteriormente por MEV, foi proposta a presença de ao menos uma resistência de transferência de carga (R_{redox}), associada para a reação redox ocorrendo na interface filme/solução. Em paralelo com R_{redox} , está um elemento capacitivo representando a capacitância da dupla camada elétrica (C_{dc}). Em decorrência das interfaces estarem contido em uma solução eletrolítica, um elemento resistivo para a resistência da solução foi inserido em série com o conjunto RC.

Para ambos os filmes, foi proposto um segundo conjunto RC em paralelo para interface eletrodo/filme. Sendo uma resistência de transferência de carga (R_{ct}) e uma capacitância relacionada ao fenômeno de pseudo-capacitância do filme polimérico (C_{filme}). As interfaces, bem como os elementos que a compõe podem ser sugeridos pela análise cuidadosa dos espectros construídos a partir dos dados obtidos por EIE. Por BODE (θ vs. Hz - Figura 30), foi verificado, em ambos os espectros, a presença de dois picos de frequência, sendo esse um indicativo para a presença de ao menos dois conjuntos paralelos contendo um elemento de resistência e um de capacitância cada (IZQUIERDO; KRANZ, 2016). Corrobora-se a isso a presença de dois semicírculos no gráfico de Nyquist (Figura 29).

Para o caso do filme nanocompósito, não foi verificado a presença de um terceiro arco capacitivo, ou pico de frequência, para a interface polímero/nanopartícula. Isso pode estar correlacionado a equivalência do valor de tempo de relaxação para esse fenômeno com o valor da interface filme/solução. Uma vez que fenômenos com tempos de relaxação próximos ou iguais podem apresentar uma sobreposição total do arco capacitivo (Nyquist) ou pico de frequência (BODE) (LASIA, 2014; HUANG et al., 2016). Dessa forma, assume-se que o valor de R_{redox} é uma resistência equivalente resultante da somatória dos fenômenos resistivos da interface polímero/nanopartícula e filme/solução. O mesmo raciocínio foi empregado para o valor de C_{filme} .

A Figura 32 apresenta o modelo de circuito equivalente proposto. Foi verificado, através dos ajustes matemáticos, que o único modelo que atendeu satisfatoriamente ambos os eletrodos.

Figura 32-Modelo de circuito equivalente proposto para o filme de poli(azo-BBY)-AuNPs e também utilizado para filme de poli(azo-BBY).



Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 3 estão listados os valores obtidos para o ajuste matemático sobre o modelo proposto. Os erros para os ajustes foram inferiores a 4% com um coeficiente $<10^{-3}$ para o teste de chi-square (χ^2).

Tabela 3-Parametros impedimétricos determinados a partir de ajustes matemáticos sobre modelo de circuito equivalente apresentado na Figura 32. Os erros foram inferiores a 4%.

Eletrodo	R_{Ω}	R_{ct}	R_{redox}	CPE_{dc}	CPE_{filme}	α_{dc}	α_{filme}
	(k Ω cm ²)			(μF cm ⁻² s ^{α-1})			
Poli(azo-BBY)	0,010	0,053	5,93	3,41	32,0	0,96	0,89
Poli(azo-BBY)-AuNPs	0,011	0,040	2,10	5,38	65,8	0,92	0,76

Como esperado, o valor de R_{redox} para o filme nanocompósito foi 2,8 vezes menor em comparação ao filme contendo apenas o azo-polímero, sendo um claro indicativo do aumento de desempenho para a reação do filme com a molécula de oxigênio para a arquitetura contendo as nanopartículas de ouro.

A partir dos valores de R_{redox} foram calculados os valores de taxa de transferência eletrônica aparente para os eletrodos (k_e) (Eq. 16) (CREAGER; WOOSTER, 1998):

$$k_e = \frac{1}{2R_{redox}CPE_{filme}} \quad (16)$$

Os valores obtidos foram 3,62 e 2,63 para o filme de poli(azo-BBY)-AuNPs e poli(azo-BBY), respectivamente. Uma vez que a constante representa a velocidade de processamento da reação (CREAGER; WOOSTER, 1998; ARMSTRONG; WILSON, 2000; BARD; FAULKNER, 2010), ficou evidenciado que a presença das nanopartículas de ouro na matriz polimérica aumenta a taxa de velocidade da reação.

Ademais, os valores de capacitância refletem o incremento da superfície eletroativa do material pela presença das nanopartículas. Para alcançar um resultado quantitativo, calculou-se o valor de superfície de espécie ativa baseando-se nos valores de CPE_{dc} pela relação (Eq. 17):

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA} \quad (17)$$

Onde Γ é o coeficiente de área eletroativa em mol cm⁻², n é o número de elétrons envolvidos na reação ($n=2e^-$), F a constante de Faraday (96485 C mol⁻¹) e Q a carga (C) obtida da capacitância aparente (C_{ap}) calculada do valor de CPE_{dc} pela relação (Eq. 18) (ALEXANDER; TRIBOLLET; ORAZEM, 2016; DE PAULI et al., 2019):

$$C_{app} = \frac{(R_{redox}CPE_{dc})^{1/\alpha}}{R_{redox}} \quad (18)$$

Os valores determinados de Γ foram $1,50 \times 10^{-11}$ e $2,79 \times 10^{-11}$ mol cm⁻² para os filmes de poli(azo-BBY) e poli(azo-BBY)-AuNPs, respectivamente. Ou seja, o número de centros redox ativos para desempenho de reação com o oxigênio dissolvido foi quase duas vezes superior para o filme nanocompósito.

Por fim, a performance eletrocatalítica foi avaliada comparando-se os valores de TOF (*turnover frequency*). O valor de TOF indica o número de moléculas reagindo por centro redox ativo em uma determinada unidade de tempo, comumente segundos (KOZUCH; MARTIN, 2012). O valor de TOF foi calculado pela relação (Eq. 19) (NAKAYAMA et al., 2016):

$$TOF = \frac{j}{nF\Gamma} \quad (19)$$

Onde j é a densidade de corrente (A cm⁻²) referente ao potencial de -0,30 V da Figura 28C. Os valores obtidos foram de 4,28 e 16,54 s⁻¹ para os filmes de poli(azo-BBY) e poli(azo-BBY)-AuNPs, demonstrando superioridade catalítica para o filme nanocompósito. Importante destacar que ambos os valores de TOF aqui reportados são superiores aos encontrados na literatura para materiais baseados em carbono livres de metais (~1,0 s⁻¹) bem como filmes baseados em polianilina (PANI) (~0,75 s⁻¹) (LEONARD et al., 2018; CHAKRABORTY et al., 2019).

4.1.5. Preparação do Imunosensor

A avaliação da aplicabilidade do material desenvolvido para imunoensaios eletroquímicos foi conduzida novamente por espectroscopia de impedância eletroquímica. Em função da necessidade de diminuição do volume da célula eletroquímica devido ao pequeno volume de material disponível, bem como o valor envolvido na análise, buscou-se construir uma célula eletroquímica de dimensões mínimas. A solução encontrada foi adaptar

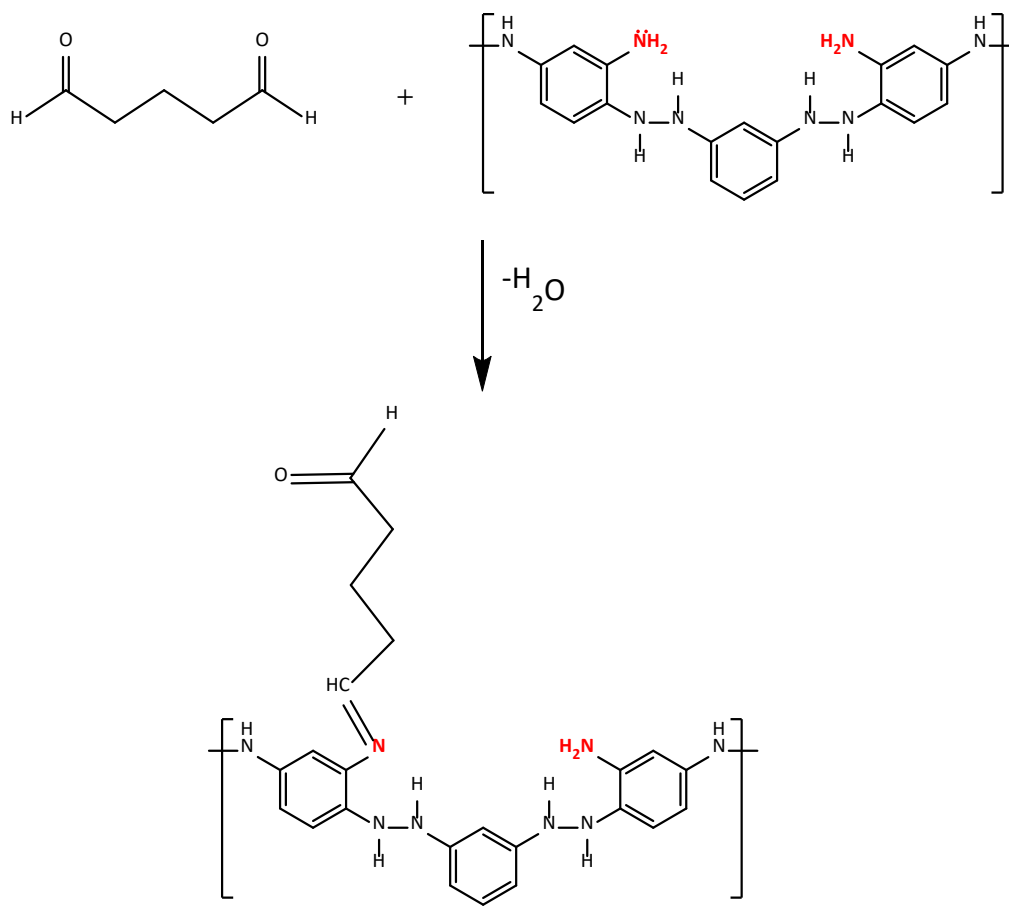
um poço sobre o eletrodo de FTO modificado com o filme de poli(azo-BBY)-AuNPs, o qual permitiu a operação da célula com volumes de 10 a 400 μL .

4.1.5.1. Ativação da superfície

A imobilização do anticorpo sobre o eletrodo de poli(azo-BBY)@AuNP foi realizada com auxílio da molécula de glutaraldeído (GA), atuando como agente de ligação cruzada (OLDE DAMINK et al., 1995; WELCH et al., 2017; CINCOTTO et al., 2019; KONDZIOR; GRABOWSKA, 2020). O glutaraldeído é amplamente utilizado para imobilização de biomoléculas (anticorpos, enzimas e proteínas diversas) por ele ter um baixo custo, ser facilmente manipulado e ser solúvel em uma série de solventes, incluindo a água, e principalmente, devido a sua reatividade com grupos amina, amida e tiols, grupos funcionais comumente presentes nas biomoléculas (MIGNEAULT et al., 2004; CINCOTTO et al., 2019). Para o presente trabalho, o GA se mostra uma interessante alternativa, visto que o filme polimérico de Bismark Brown Y apresenta grupos amina livres em sua estrutura que serão utilizados para reação estratégica com a molécula de glutaraldeído, funcionalizando a superfície para ancorar covalentemente o anticorpo de interesse.

O glutaraldeído reage com grupos amina para formação do grupo imina (base de Schiff), como exemplificado na Eq. 20. Dada a importância dessa reação, diversos estudos vêm sendo dedicados ao tema nas últimas décadas (MIGNEAULT et al., 2004; MERA et al., 2008; KARUNANITHY; HOLLAND; SIVAKUMAR, 2021). A preocupação com o tema é em função da possibilidade de reações laterais que permitem que em uma solução de glutaraldeído, mais de uma espécie exista em solução, e por consequência, participem da reação com as amins durante imobilização de biomoléculas. Em estudo recente, Karunanithy e colaboradores (KARUNANITHY; HOLLAND; SIVAKUMAR, 2021) reportaram que em solução de pH 7, prioritariamente o glutaraldeído estará em sua forma regular e alguma fração irá se encontrar na forma hemiacetal.

A Figura 33 apresenta os espectros de impedância eletroquímica para o filme de poli(azo-BBY)-AuNPs antes e depois da reação com glutaraldeído. Foi possível observar uma nítida modificação no diagrama de Nyquist (Figura 33A) pela ampliação do arco capacitivo devido ao aumento da R_{redox} , que sofreu um aumento de 22,4 para 55,7 $\text{k}\Omega \text{ cm}^2$ (Tabela 4). Esse aumento pode ser diretamente correlacionado a alteração na estrutura polimérica pela ligação covalente com o GA.



A análise do gráfico de capacitância complexa revelou um incremento da capacitância redox (C_r) (Figura 33B). O aumento do valor de capacitância condiz com o aumento do potencial químico para espécies redox adsorvidas sobre a superfície (BÜTTIKER; THOMAS; PRÊTRE, 1993). Podendo ser influência direta da inserção de grupos oxigenados na cadeia polimérica devido a formação de ramificação pela adição do GA a estrutura polimérica.

Um terceiro parâmetro para análise da modificação covalente da estrutura polimérica por meio dos dados obtidos por EIE foi realizado através do gráfico de Z' vs. C' (Figura 33C). Essa abordagem permite uma análise qualitativa do comportamento do sistema em função da frequência aplicada. O espectro foi subdividido em três diferentes regiões: alta, alta-média e média-baixa frequência. Em alta frequência aplicada, apenas o fenômeno de carregamento de carga para a dupla camada elétrica é verificado (TREVIZAN et al., 2021), havendo mínima influência de fenômeno resistivo.

Figura 33-Espectros obidos para a ativação do filme de poli(azo-BBY)-AuNPs antes (• preta) e após 5 minutos de incubação com glutaraldeído (• azul). A) Espectro de Nyquist, B) espectro de capacitância complexa e C) gráfico de capacitância versus impedância real.

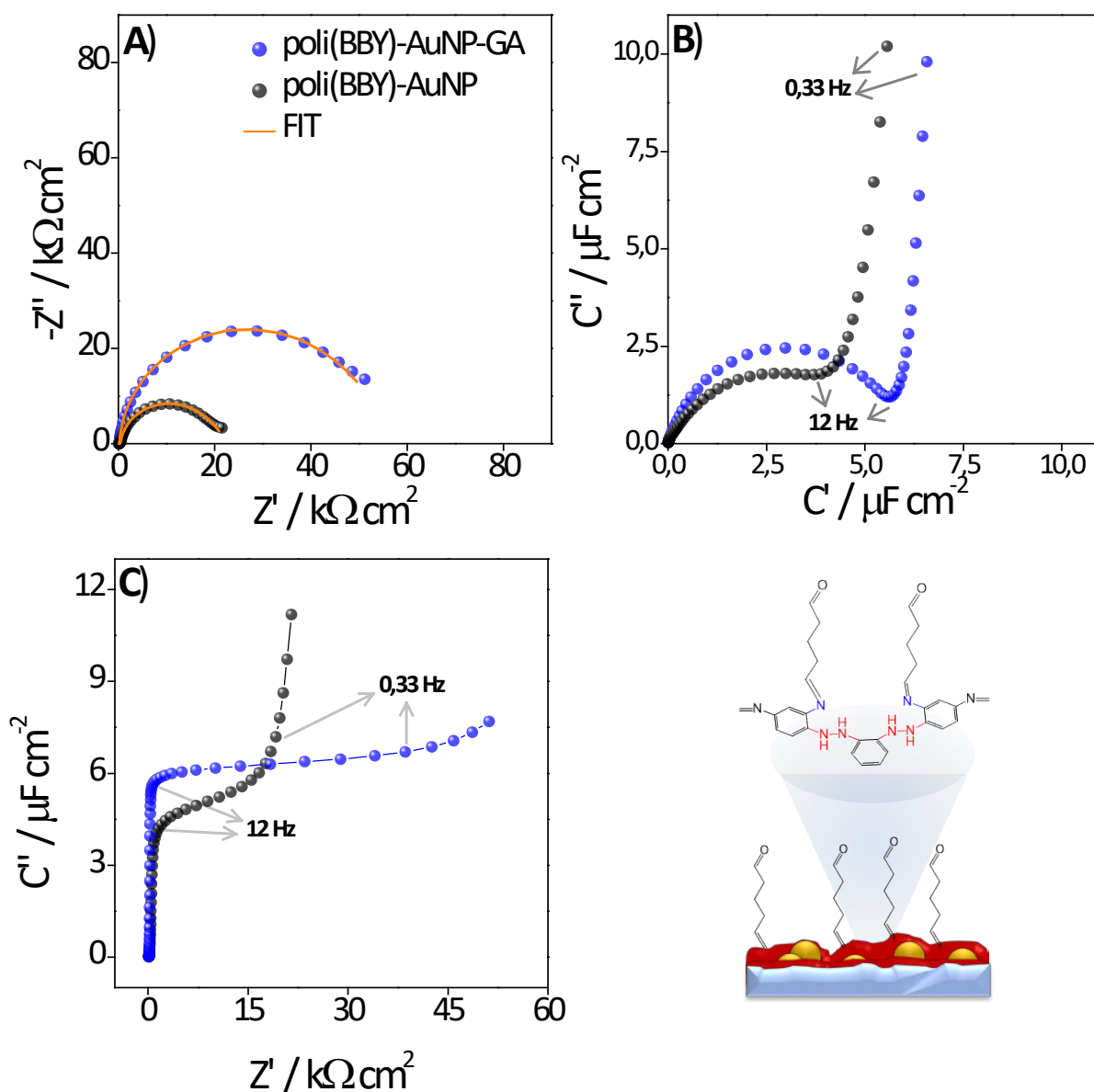


Tabela 4-Parâmetros impedimétricos determinados por meio do ajuste matemático sobre modelo de circuito equivalente para os espectros anterior e após ativação da superfície do eletrodo de poli(azo-BBY)-AuNPs com a molécula de glutaraldeído. Os erros apresentados foram inferiores a 4%.

Modificação	R_{Ω}	R_{ct}	R_{redox}	CPE_{dl}	α_{dl}	CPE_{film}	α_{film}	C_{redox}
com GA	$(k\Omega cm^2)$			$(\mu F cm^{-2} s^{\alpha-1})$		$(\mu F cm^{-2} s^{\alpha-1})$		$(\mu F cm^{-2})$
Antes	0,10	0,483	22,4	4,10	0,96	26,2	0,60	5,40
Depois	0,10	0,565	55,8	6,93	0,95	18,4	0,65	6,12

A presença de duas regiões de reta com comportamento distintos um do outro para frequências após 12 Hz foi indicativo de duas diferentes estruturas porosas no polímero (RANDRIAMAHAKA; ASAKA, 2010; TREVIZAN et al., 2021). Podendo conter uma região de maior densidade polimérica, e consequentemente de maior dificuldade de difusão do oxigênio dissolvido (alta impedância), e outra região de menor densidade polimérica (ou mesmo regiões de extrusão), sendo de menor dificuldade (baixa impedância). Após a modificação pelo agente de ligação cruzada foi verificado uma alteração no perfil do espectro. Ela representa uma maior alteração na região de baixa densidade, o qual após modificação com GA demonstrou maior resistência do sistema para o acesso a esses sítios ativos.

4.1.5.2. Imobilização do Anticorpo 5-metil citosina

A imobilização do anticorpo 5-metilcitosina (Ab-5-mC) nos sítios ativos foi investigada. A Figura 34A apresenta o diagrama de Nyquist para o eletrodo de poli(azo-BBY)-AuNPs-GA antes e após a imobilização do Ab-5-mC. O espectro apresentou uma diminuição do arco capacitivo após a imobilização covalente do anticorpo. De fato, a análise dos valores de R_{redox} demonstram uma diminuição de 55,7 para 36,0 $k\Omega\text{ cm}^2$ (Tabela 5). Mas, ainda superiores a R_{redox} para o filme nanocompósito sem modificação.

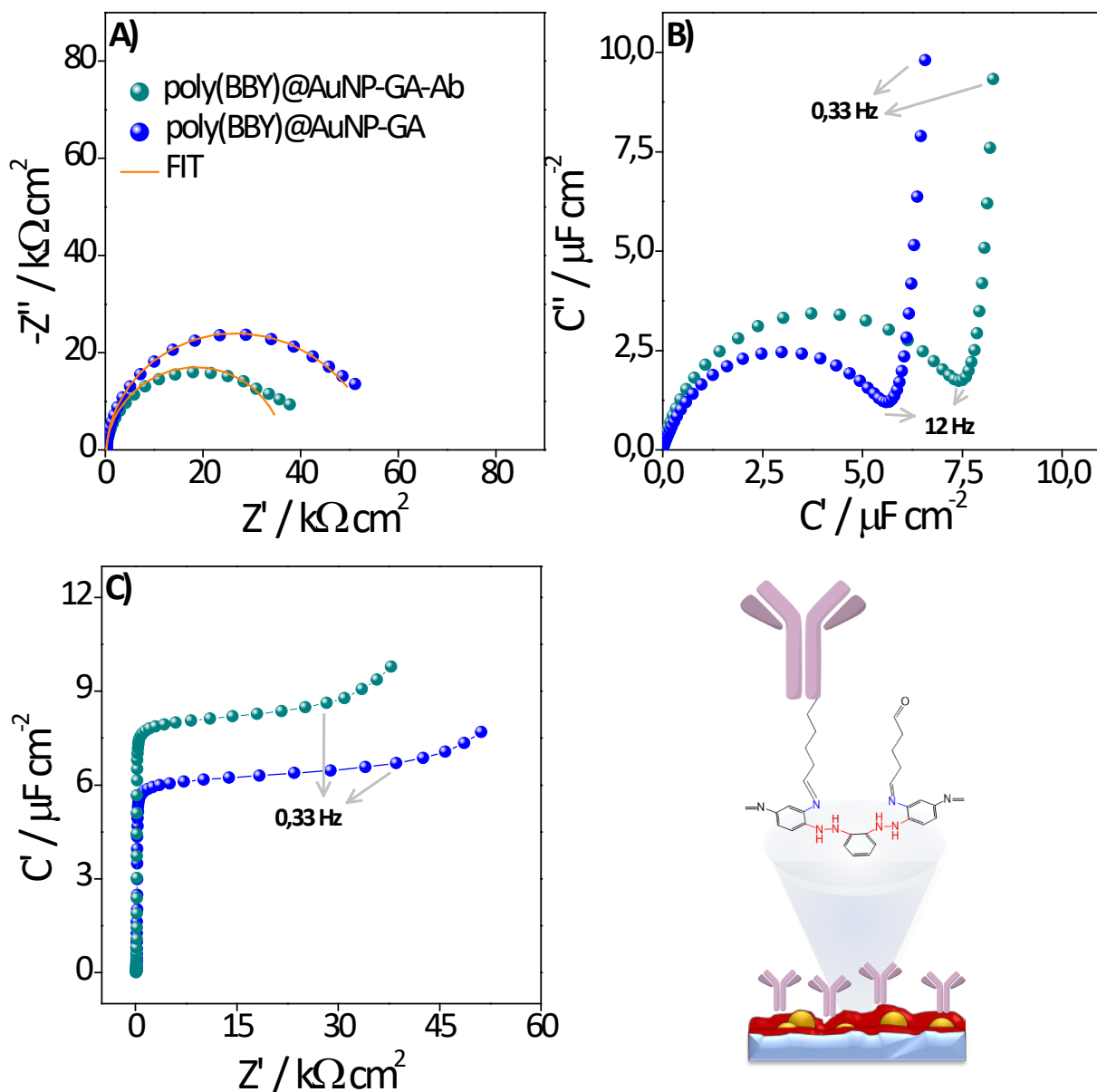
Tabela 5-Parametros impedimétricos determinados por meio do ajuste matemático sobre modelo de circuito equivalente para os espectros anterior e após imobilização do anticorpo Ab-5-mC sobre superfície do eletrodo de poli(azo-BBY)-AuNPs-GA. Os erros apresentados foram inferiores a 4%.

Modificação	R_{Ω}	R_{ct}	R_{redox}	CPE_{dl}	α_{dl}	CPE_{film}	α_{film}	C_{redox}
com Ab	$(k\Omega\text{ cm}^2)$		$(\mu F\text{ cm}^{-2}\text{ s}^{\alpha-1})$		$(\mu F\text{ cm}^{-2}\text{ s}^{\alpha-1})$		$(\mu F\text{ cm}^{-2})$	
Antes	0,10	0,565	55,8	6,93	0,95	18,4	0,65	6,12
Depois	0,10	0,211	36,1	9,06	0,96	11,2	0,61	7,79

A hipótese para elucidação do comportamento observado perpassa a afinidade do glutaraldeído pela molécula de oxigênio dissolvido (MIGNEAULT et al., 2004; ABAY et al., 2019). Em solução aquosa, o grupo funcional aldeído do GA pode reagir com o oxigênio dissolvido formando ácido carboxílico (VANOYE et al., 2013). Claramente, a extensão da reação dependerá de diferentes fatores. Porém, essa reação pode ter sido suficiente para ter

influenciado na concentração de oxigênio dissolvido durante o ensaio de avaliação da modificação da superfície.

Figura 34-Espectros obtidos para a modificação da superfície do filme de poli(azo-BBY)@AuNP-GA antes (• azul) e após (• verde) 30 minutos de incubação com anticorpo Ab-5-mC. A) Espectro de Nyquist, B) espectro de capacitância complexa e C) gráfico de capacitância versus impedância real.



Após a modificação com o anticorpo, grande parte dos grupos aldeídos “livres” foram ocupados, diminuindo a extensão da reação de consumo de oxigênio da solução de PBS utilizada para avaliação do sensor e resultado na diminuição do valor de R_{redox} . Na Figura 34B está a representação da capacitância complexa para a modificação pela imobilização do

anticorpo Ab-5-mC onde foi verificado uma ampliação da capacitância redox, indicando um aumento do acúmulo de espécies redox na interface filme/solução. Uma vez que a capacitância redox é influenciada pelo potencial químico, uma provável diferença de gradiente de concentração na interface filme/solução pela presença das macromoléculas pode estar influenciando para o aumento da capacitância redox do sistema.

A análise do sistema pela Figura 34C evidenciou que a presença do anticorpo altera a magnitude do comportamento do espectro, mas sua forma contendo duas regiões é mantida. Fica claro o aumento da capacitância do sistema bem como a diminuição da dificuldade de difusão do oxigênio pela matriz polimérica.

Por fim, propõe-se que o mecanismo de imobilização covalente do anticorpo sobre a superfície ativada do filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-AuNPs seja a mesma reação para a formação da ligação imina entre o GA e os grupos amina do poli(azo-BBY). A formação da ligação covalente ocorre por meio da reação dos grupos aldeídos do GA com os grupos amina dos resíduos de lisina presentes na estrutura proteica, formando ligação imina (TRILLING; ZUILHOF, 2013; WELCH et al., 2017; KONDZIOR; GRABOWSKA, 2020).

Importante destacar que os possíveis grupos funcionais ácidos carboxílicos presentes no filme, formados durante o processo de construção do sensor pela reação dos grupos aldeídos com o oxigênio pela exposição direta com o ar atmosférico, não influenciam na funcionalidade do GA como agente de ligação cruzada. Isso se deve a capacidade de reação do ácido carboxílico com grupos amina para formação de amidas (TRILLING; ZUILHOF, 2013; KONDZIOR; GRABOWSKA, 2020).

4.1.5.3. Bloqueio dos sítios remanescentes ativos com BSA

Após ativação da superfície do eletrodo e modificação pela imobilização do anticorpo de interesse, é necessária a desativação de possíveis sítios de ligação ainda remanescentes com intenção de eliminar possíveis falsos positivos. Uma das estratégias mais amplamente utilizadas é o emprego da albumina bovina (BSA) para bloqueio desses sítios de ligação. Apesar da reação do BSA com GA poder ser processada pela reação do aldeído do GA com diferentes grupos funcionais do BSA, estudos demonstram que essa imobilização se dá majoritariamente pela reação com os grupos amina de resíduos de lisina (SABATÉ DEL RÍO et al., 2019).

A desativação dos sítios ativos pela imobilização de BSA pode ser confirmada através do incremento observado do arco capacitivo do espectro de Nyquist (Figura35A). A análise por

modelo de circuito equivalente demonstrou um aumento expressivo de R_{redox} (Tabela 6), sendo cerca de 3 vezes maior comparado ao valor obtido após modificação com o anticorpo. Esse resultado é indicativo da dificuldade de acesso do oxigênio dissolvido para RRO nos sítios redox do azo-polímero, conseqüentemente aumentando a resistência de transferência eletrônica.

Tabela 6-Parametros impedimétricos determinados por meio do ajuste matemático sobre modelo de circuito equivalente para os espectros anterior e após desativação dos sítios ativos remanescentes presentes na superfície do eletrodo de poli(azo-BBY)-AuNP-GA-Ab com a molécula de BSA. Os erros apresentados foram inferiores a 4%.

Modificação	R_{Ω}	R_{ct}	R_{redox}	CPE_{dl}	α_{dl}	CPE_{film}	α_{film}	C_{redox}
com BSA	(k Ω cm ²)		(μF cm ⁻² s ^{α-1})		(μF cm ⁻² s ^{α-1})		(μF cm ⁻²)	
Antes	0,10	0,211	36,1	9,06	0,96	11,2	0,61	7,79
Depois	0,10	0,276	112,0	2,90	0,80	7,39	0,82	3,68

Os dados obtidos através da capacitância complexa (Figura 35B) indicam um bloqueio não somente dos sítios ativos remanescentes de GA, mas também de grande parte da área eletroativa do filme nanocompósito, formando uma espécie de filme. Isso fica claro quando feita a análise pelo gráfico de C' vs. Z' , onde tem-se a total modificação do comportamento do espectro revelando agora a presença de uma forma de cavidade (TREVIZAN et al., 2021).

Por meio dos valores de C_r , o grau de recobrimento pode ser estimado através dos valores de coeficiente de espécie eletroativa (Γ) pela relação (Eq. 18)(BARD; FAULKNER, 2010):

$$\Gamma = \frac{C_r k_b T}{eFA} \quad (21)$$

Onde k_b é a constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23}$ J K⁻¹), T é a temperaturam em Kelvin (298 K), e é a carga elementar ($1,60 \times 10^{-19}$ J), F a constante de Faraday ($96\,485$ C mol⁻¹) e A a área do eletrodo. Os valores calculados foram de $5,75 \times 10^{-12}$ e $3,92 \times 10^{-12}$ mol cm⁻². Sendo um grau de recobrimento superior a 30% da área de superfície eletroativa.

Por fim, foi analisada a resposta do sensor frente a diferentes concentrações de oxigênio dissolvido para verificação da manutenção da resposta do filme de poli(azo-BBY)-AuNps frente a molécula de oxigênio após as sucessivas modificações da superficiais. Pela

análise dos espectros apresentados na Figura 36, fica evidente que mesmo com as sucessivas modificações da superfície do filme de poli(azo-BBY)-AuNPs para fabricação do imunossensor, o sinal de resposta baseado em oxigênio se manteve satisfatório.

Figura 35-Espectros obtidos para a modificação do filme de poli(azo-BBY)-AuNPs-GA-Ab antes (• verde) e após 30 minutos de incubação com a proteína BSA (• vermelha). A) Espectro de Nyquist, B) espectro de capacitância complexa (ampliada) e C) gráfico de capacitância versus impedância imaginária.

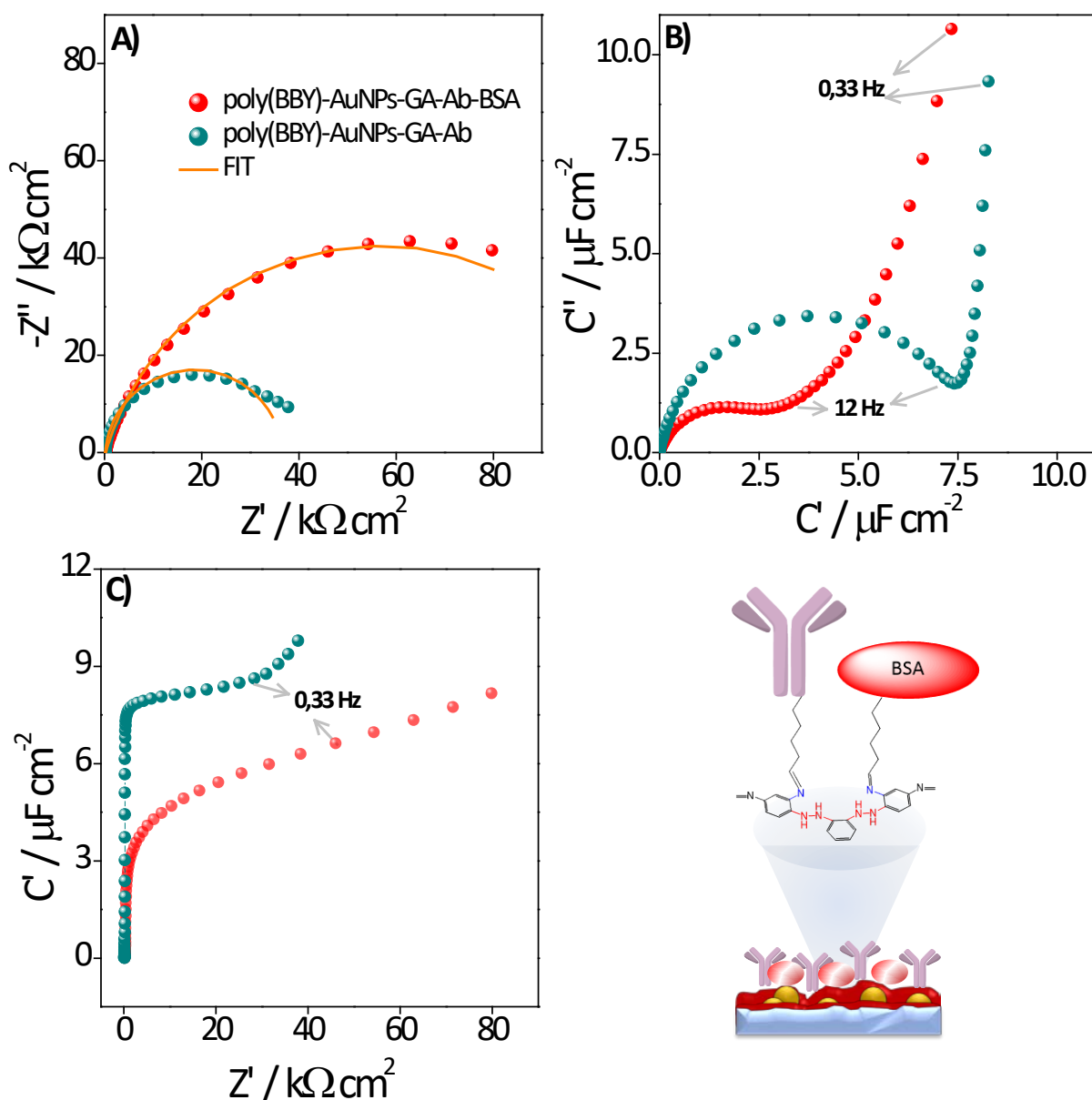
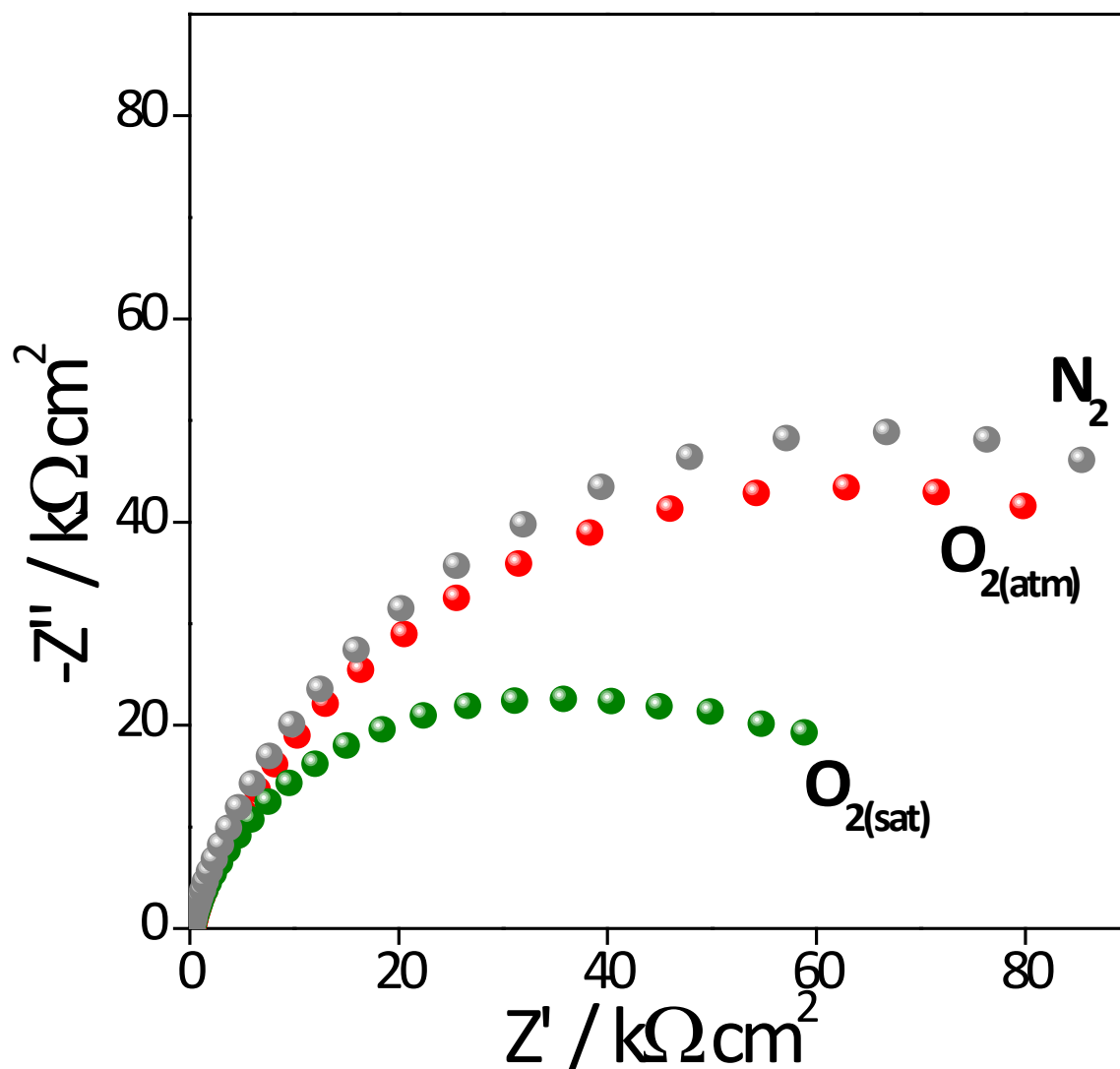


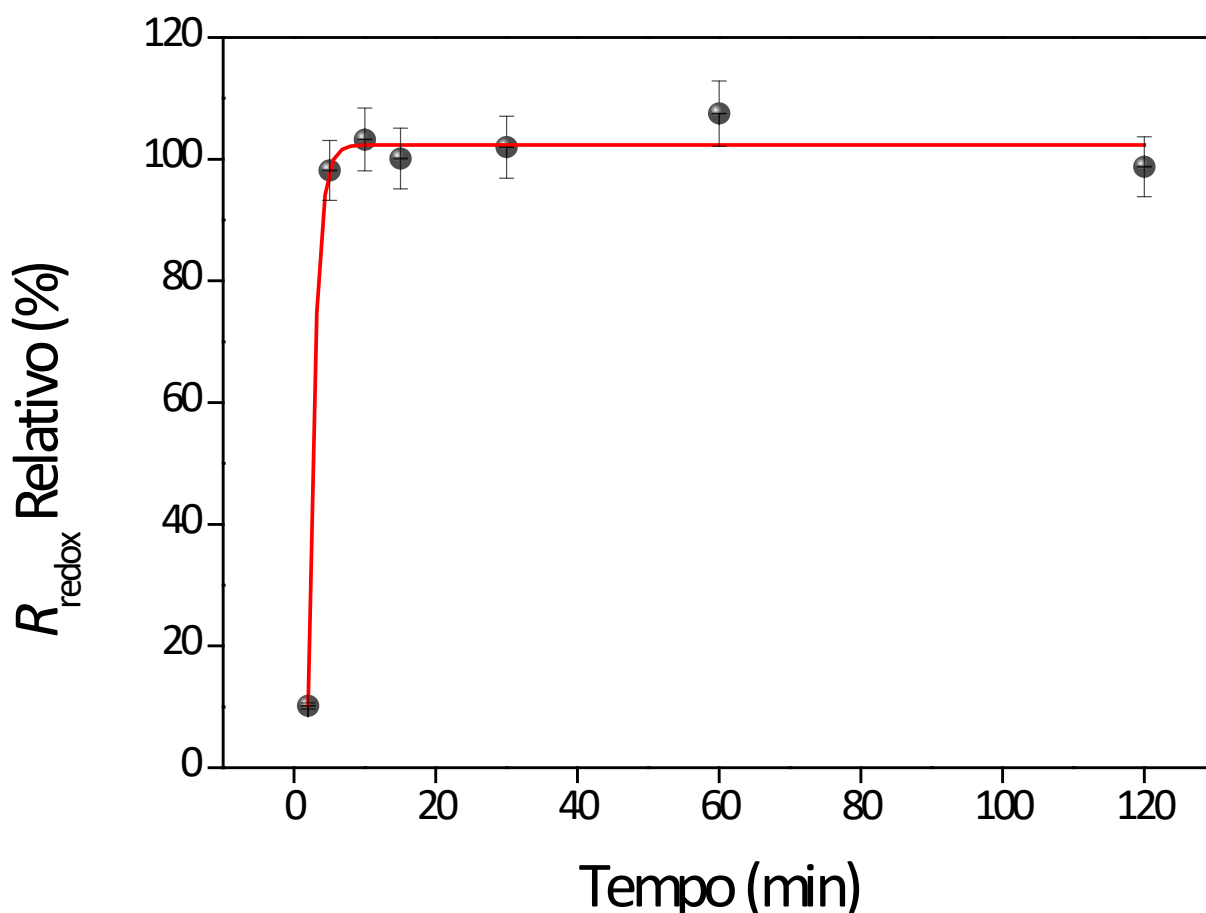
Figura 36-Espectro de Nyquist para o imunossensor de poli(azo-BBY)-AuNPs-GA-Ab-BSA em solução aquosa de PBS 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,40) saturada com os gases N₂, O₂ e ar atmosférico. Potencial aplicado de -0,30 V (vs. ECS).



4.1.5.4. Otimização dos parâmetros analíticos

Os tempos de incubação para cada etapa da construção do imunossensor foi avaliado objetivando-se alcançar a melhor razão sinal/ruído. A análise foi realizada por EIE e foram avaliados os intervalos de tempo necessários para que a resposta eletroquímica apresentasse estabilização de sinal, considerando que nesse determinado ponto, a reação foi completa ou alcançou o equilíbrio. O parâmetro escolhido para acompanhamento da análise foi a resistência redox (R_{redox}), obtido através da análise por modelo de circuito equivalente reportado anteriormente (Figura 32). Para fins de simplificação, só serão exibidos os dados de R_{redox} em função do tempo aplicado nas análises sem a exibição dos espectros.

Figura 37-Variação relativa dos valores de R_{redox} em função do tempo de incubação do filme de poli(azo-BBY)-AuNPs com glutaraldeído. A barra de erro é relativa ao desvio padrão para a resposta de três diferentes eletrodos.

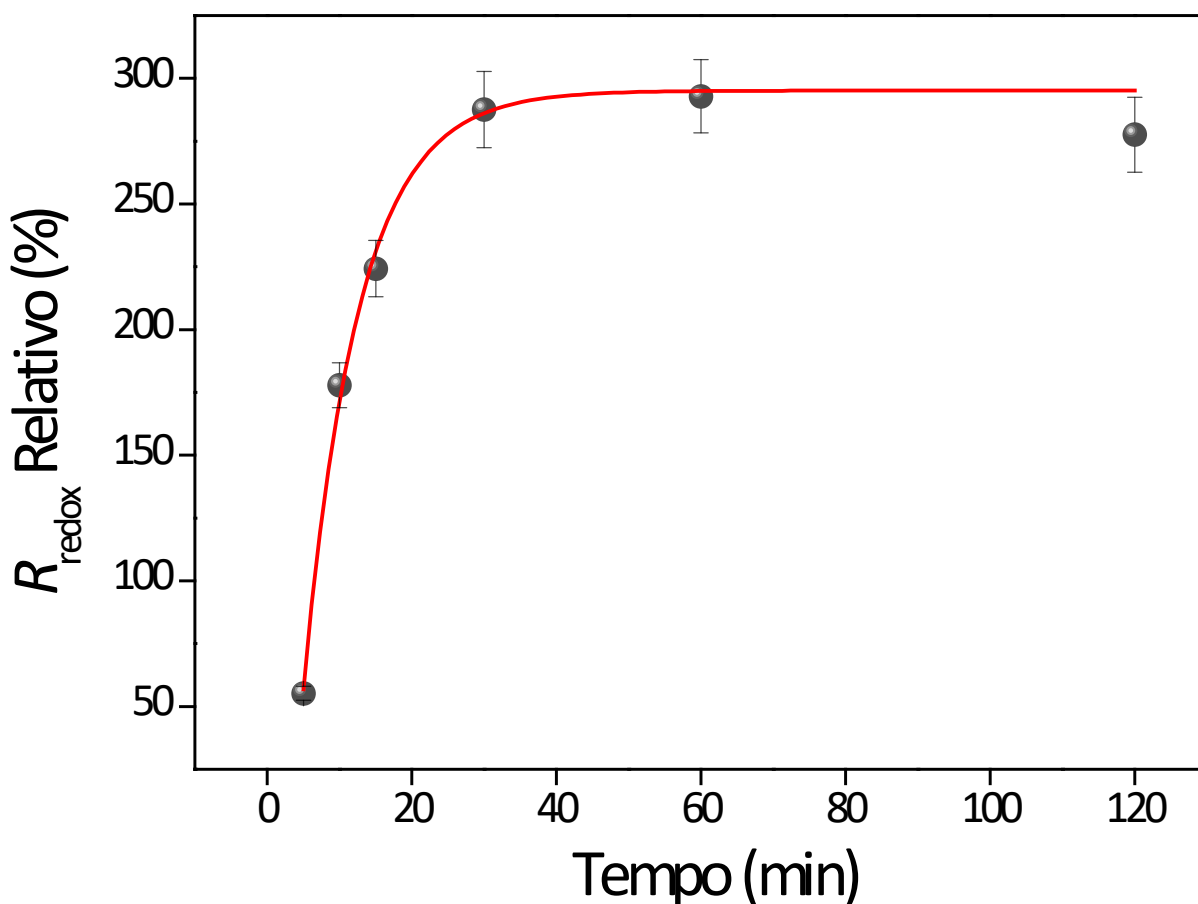


Na Figura 37 estão contidos os dados obtidos para a modificação da superfície por GA. A reação processou-se de forma rápida, onde após 5 minutos o valor do sistema atinge um equilíbrio. De fato, estudos cinéticos espectrofotométricos da reação do GA com moléculas contendo grupo amina reportam rápido desenvolvimento da reação, mesmo em curto espaço de tempo (CHEUNG; NIMNI, 1982; KARUNANITHY; HOLLAND; SIVAKUMAR, 2021). Isso é indicativo que o tempo de exposição verificado é suficiente, tratando-se de um filme fino ($\Gamma \sim 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$), para que os grupos amins livres do polímero tenham reagido completamente o GA adicionado.

Da mesma forma, foi investigado o tempo de incubação para imobilização do anticorpo Ab-5-mC. A Figura 38 apresenta a variação de sinal de R_{redox} em função do tempo de incubação do anticorpo. A reação apresentou comportamento típico para incubação de anticorpo sobre eletrodo (AZRI et al., 2018; POVEDANO et al., 2018a; CHINNADAYYALA; CHO, 2021; PAL et al.,

2021), onde se processou mais lentamente no início da reação, aumentando progressivamente, seguida de um ponto de saturação, após 30 minutos, onde o sinal de variação de R_{redox} se manteve relativamente estável.

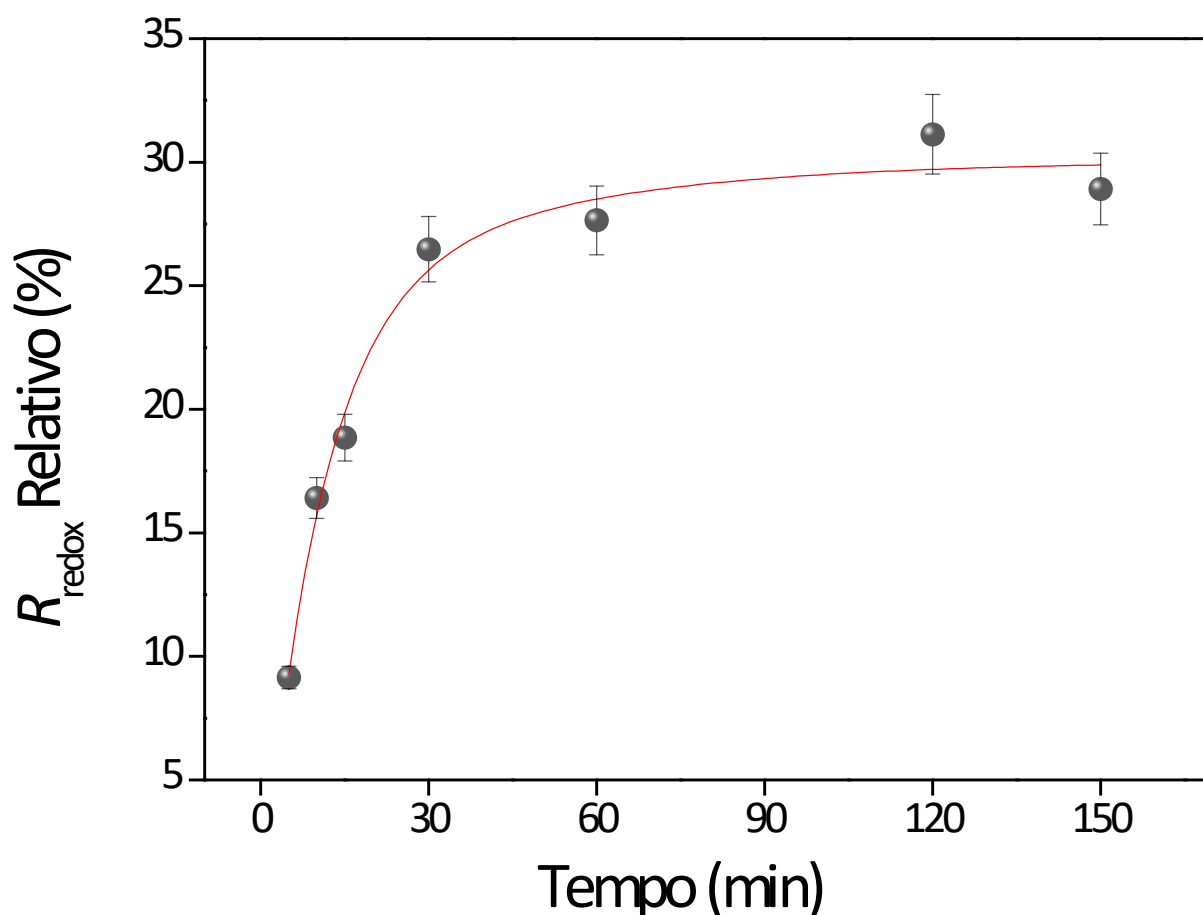
Figura 38- Variação relativa dos valores de R_{redox} em função do tempo de incubação do filme de poli(azo-BBY)-AuNPs-GA com o anticorpo Ab-5-mC. A barra de erro é relativa ao desvio padrão para a resposta de três diferentes eletrodos.



O sinal em 30 minutos apresentou variação superior ao de 95%, sendo escolhido para continuidade das otimizações. O valor de tempo de incubação obtido está dentro da média de intervalo de incubação do anticorpo de captura apresentado por diferentes imunossensores eletroquímicos (AZRI et al., 2018; POVEDANO et al., 2018a; CHINNADAYYALA; CHO, 2021; KUNTAMUNG; JAKMUNEE; OUNNUNKAD, 2021; PAL et al., 2021). Inclusive, esse é o tempo sugerido no protocolo disponível no kit ELISA para determinação de DNA metilado utilizado como referência para o presente trabalho.

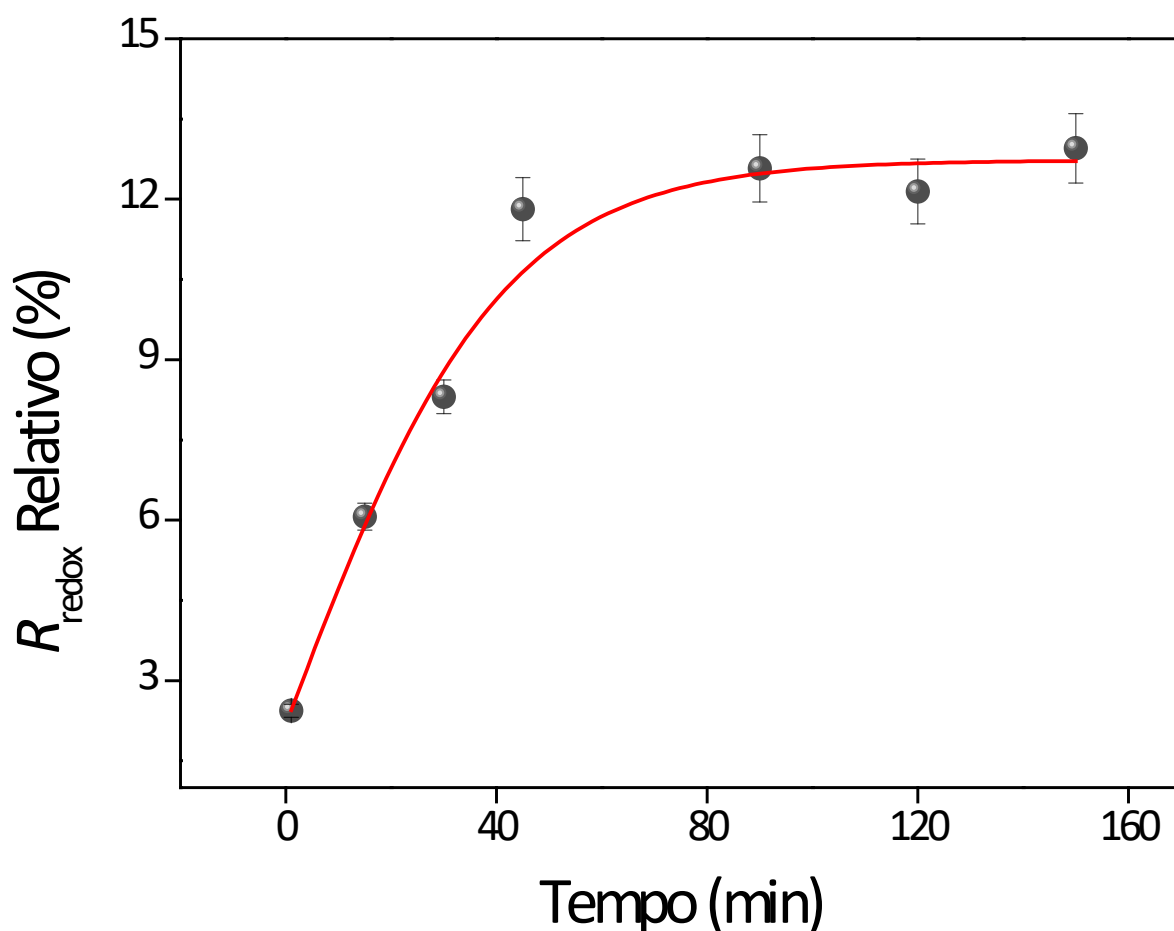
O tempo de incubação da proteína BSA para a desativação dos sítios remanescente foi igualmente avaliado e os resultados apresentados na Figura 39. Novamente o comportamento verificado foi uma curva de comportamento logarítmica com valores estabilizando a partir de 30 minutos. O tempo verificado novamente foi próximo do apresentado por trabalhos utilizando BSA para bloqueio de superfície em imunossensores eletroquímico (KUNTAMUNG; JAKMUNEE; OUNNUNKAD, 2021; PAL et al., 2021; RAHMATI et al., 2021).

Figura 39- Variação relativa dos valores de R_{redox} em função do tempo de incubação do filme de poli(azo-BBY)-AuNPs-GA-Ab com a proteína BSA. A barra de erro é relativa ao desvio padrão para a resposta de três diferentes eletrodos.



Por fim, foi avaliado o tempo de incubação frente a molécula de 5-metilcitosina. A Figura 40 apresenta os valores de R_{redox} para a resposta do sensor frente ao analito em diferentes tempos de incubação. O máximo sinal de variação da resposta de R_{redox} foi verificado após 40 minutos de incubação, sendo esse o tempo escolhido como tempo mínimo para a análise das espécies de DNA metilado.

Figura 40-Variação relativa dos valores de R_{redox} em função do tempo de incubação do filme de poli(azo-BBY)-AuNPs-GA-Ab-BSA frente ao padrão de 5-metilcitosina. A barra de erro é relativa ao desvio padrão para a resposta de três diferentes eletrodos.



A Tabela 7 contém os dados listados dos tempos otimizados para construção do sensor, bem como o comparativo com o imunoensaio comercial de referência utilizado para o presente estudo. Foi possível verificar que o tempo médio de cada etapa foi próximo ou inferior aos trabalhos reportados na literatura. Destaca-se que o presente imunossensor apresentou um tempo total de ensaio inferior em comparação com o kit Elisa para DNA metilado. Parte do tempo salvo foi devido ao encurtamento de etapas como incubação de um anticorpo secundário.

Tabela 7-Valores comparativos do tempo médio necessário para cada execução de cada etapa para determinação de concentração de DNA metilado entre o sensor e o kit comercial.

	Poli(azo-BBY)-AuNPs	Comercial
	Tempo	
Etapa	Minutos	
Ativação	5	-
Anticorpo Captura	30	60
Bloqueio BSA	30	30
Incubação Antígeno	60	40
Anticorpo Secundário	-	30
Solução de desenvolvimento	-	10
Total	125	170

4.1.5.5. Desempenho do sensor frente a molécula de 5-metilcitosina

O desempenho do sensor de poli(azo-BBY)-AuNPs frente a diferentes concentrações da molécula de 5-metilcitosina (Figura 41). Assim como no protocolo de referência para o kit comercial, foi utilizado o padrão de 5-metilcitosina para construção de uma curva analítica. As medidas de EIE foram conduzidas também em solução de PBS 0,05 mol L⁻¹ com pH 7,40 (25°C) saturada com oxigênio e em equilíbrio atmosférico. As concentrações de padrão de 5-mC utilizadas foram 0,005, 0,01, 0,04, 0,08 e 0,12 ng ml⁻¹.

Como verificado pelo espectro de Nyquist na Figura 41A, houve aumento do arco capacitivo do sistema com o aumento da concentração de 5-mC em decorrência do aumento do bloqueio da superfície após a efetivação da ligação entre o 5-mC e o sítio de reconhecimento do Ab-5-mC. A efetividade da ligação altera a superfície aumentando a dificuldade de acesso das moléculas de oxigênio para os grupos azo do polímero.

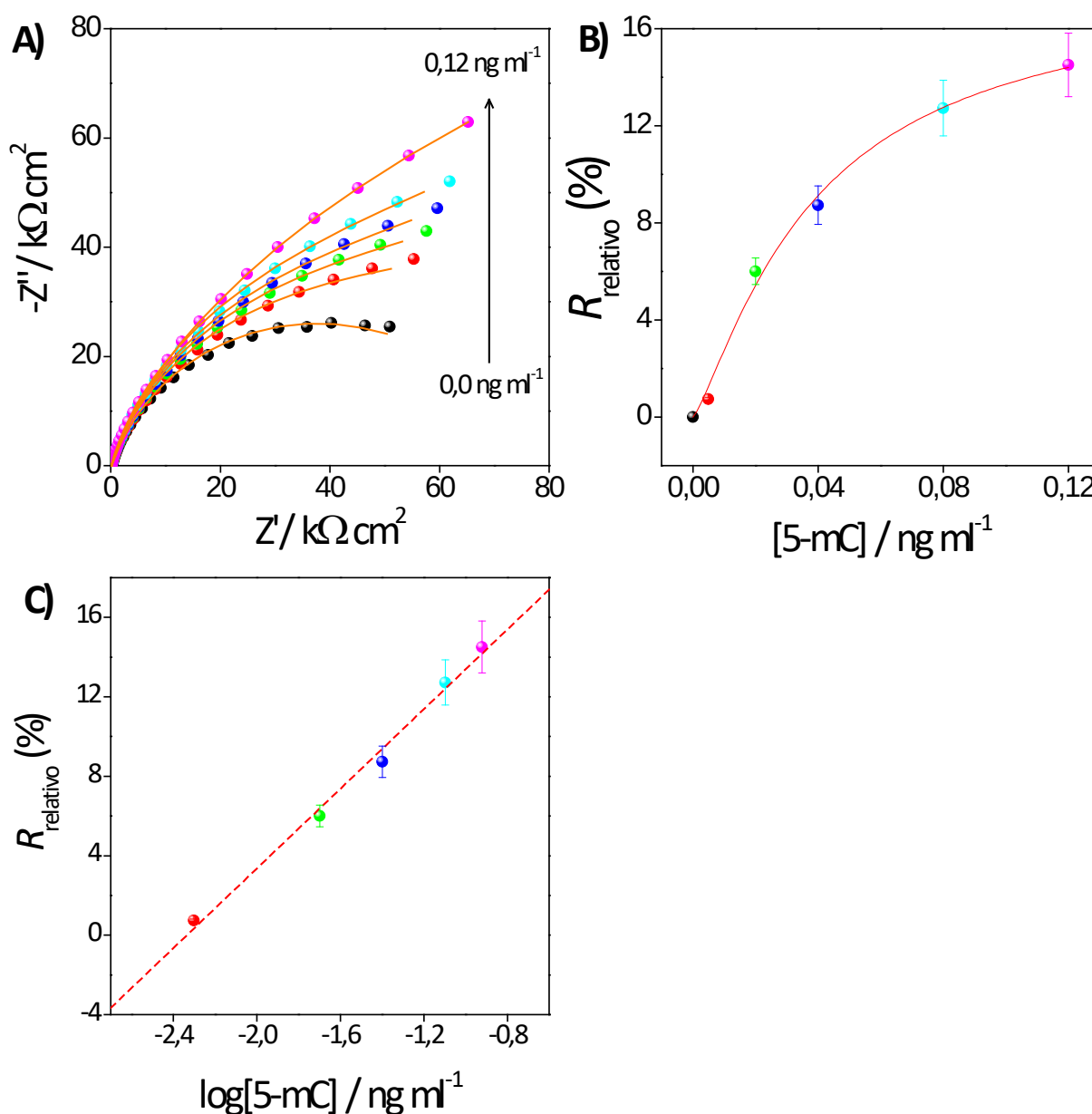
Os espectros foram analisados por modelagem matemática sobre o modelo de circuito equivalente da Figura 41 e a resposta relativa da variação de R_{redox} foi utilizada para construção da curva analítica apresentado na Figura 41B e C (Eq. 22).

$$R_{\text{relativo}}(\%) = \frac{R_{\text{redox}} - R_0}{R_0} \times 100 \quad (22)$$

Os valores de R_{redox} em função da concentração de 5-mC apresentaram o comportamento característico de cinética enzimática para a saturação dos sítios de reconhecimento para uma dada concentração de analito. A aplicação do logaritmo da concentração de 5-mC permitiu a obtenção de uma linearidade descrita pela Eq. 23.

$$R_{\text{relativo}} (\%) = 23.4 + 10.0 \log[5\text{-mC} (\text{ng mL}^{-1})] \quad (n = 5; r^2 = 0.9960) \quad (23)$$

Figura 41-A) Espectros de Nyquist (A) e suas respectivas curvas analíticas (B e C) para a resposta do imunossensor frente a diferentes concentrações de 5-mC em solução de PBS 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,40) em O₂ saturado em equilíbrio atmosférico. A barra de erro representa o desvio padrão para o mesmo eletrodo em três diferentes experimentos.



O valor de limite de detecção para o imunossensor de poli(azo-BBY)-AuNPs para espécies de DNA metilado foi de $0,64 \text{ pg mL}^{-1}$. O valor foi calculado segundo recomendação da IUPAC por meio da relação $3s/\sigma$, onde s é o desvio padrão do branco e σ o valor de coeficiente angular obtido através da curva analítica.

Buscou-se comparar o valor de limite de detecção de forma direta com trabalhos recentes da literatura foram listados na Tabela 8. Assim, foi possível verificar que o presente imunossensor demonstrou desempenho satisfatório uma vez que apresentou limite de detecção menor comparado aos trabalhos reportados na literatura.

Tabela 8-Valores de limite de detecção de sensores eletroquímicos para DNA metilado.

Referência	Limite de detecção	Técnica eletroquímica
	ng mL ⁻¹	
(ZHOU et al., 2014)	1,30	EIE
(YIN et al., 2015)	0,150	DPV
(SHEN et al., 2016)	0,170	DPV/EIE
Presente trabalho	6,4 x10 ⁻⁴	EIE

4.1.5.6. Afinidade de ligação antígeno-anticorpo

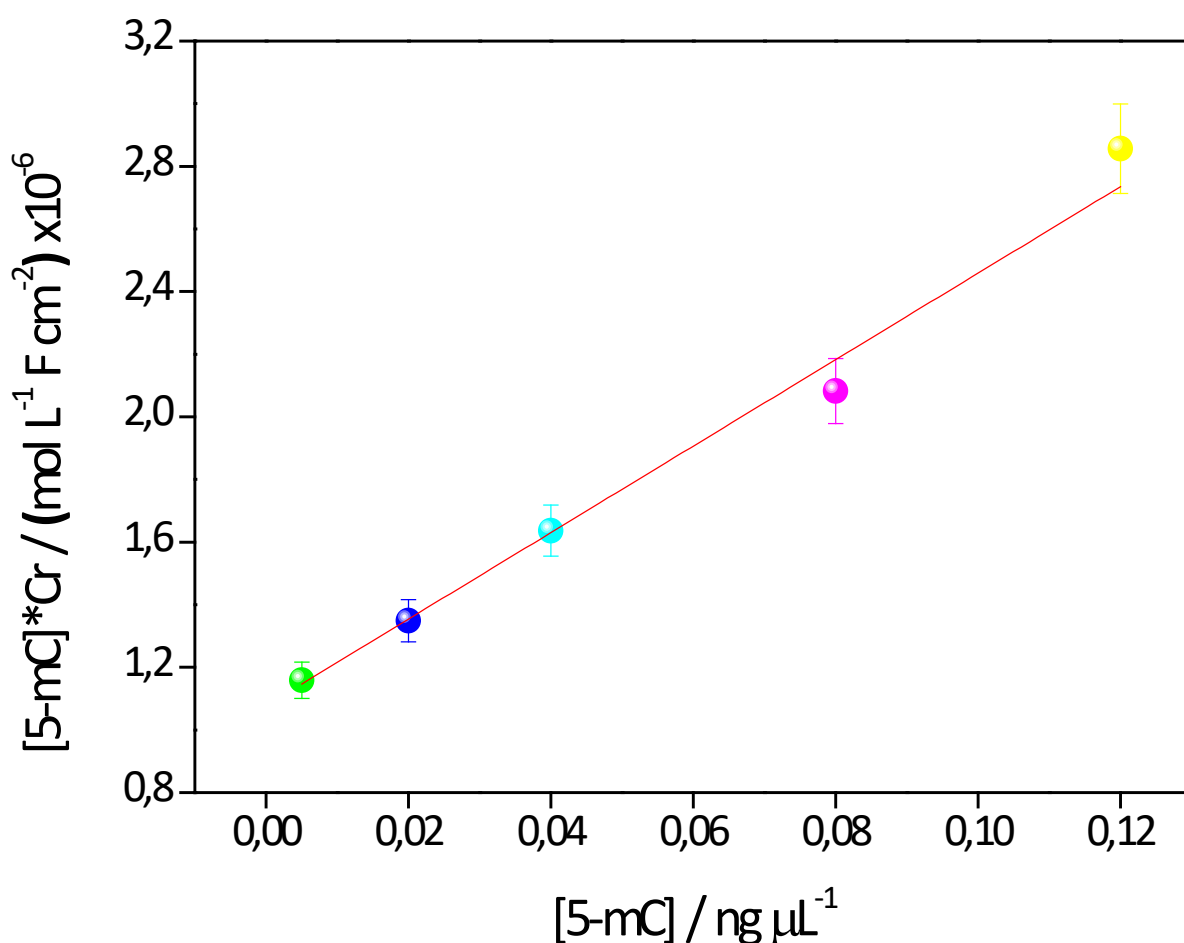
Para verificação da integridade e capacidade de reconhecimento do anticorpo após a sua imobilização sobre o filme nanocompósito, buscou-se avaliar o valor de constante de afinidade (k_d) do imunossensor de poli(azo-BBY)-AuNPs (XIA et al., 2013; LANDRY et al., 2015). A **Figura 42** apresenta a isoterma de Langmuir para o imunossensor de poli(azo-BBY)-AuNPs baseado nos dados de capacitância redox para cada adição do antígeno.

O valor de constante de afinidade pode ser obtido através modelo de adsorção de Langmuir pela Eq. 23 (KOR; ZAREI, 2016; NISHITANI; SAKATA, 2018).

$$\frac{[5-mC]}{\Delta R} = \frac{[5-mC]}{R_m} + \frac{1}{K_d R_m} \quad (24)$$

ΔR corresponde ao inverso da variação da capacitância redox do sistema ($1/C_R$), R_m é o máximo de sinal e $[5-mC]$ a concentração de 5-metilcitosina. Dessa forma, a partir do coeficiente linear do gráfico foi obtido o valor de $(K_d R_m)^{-1}$, e pelo coeficiente angular o valor de R_m^{-1} . O valor calculado de k_d para o presente imunossensor foi de 1,49 L μmol^{-1} . Esse valor demonstra que a estratégia utilizada para construção do imunossensor foi bem-sucedido, uma vez que o valor foi próximo de 1,20 L μmol^{-1} determinado para o antígeno-anticorpo livre de 5-metilcitosina (RAJAKUMARA et al., 2016).

Figura 42-Relação Linear de [5-mC]xCr versus [5-mC]. Forma de isoterma de Langmuir usada para o complexo 5-mC/Ab-5mC.

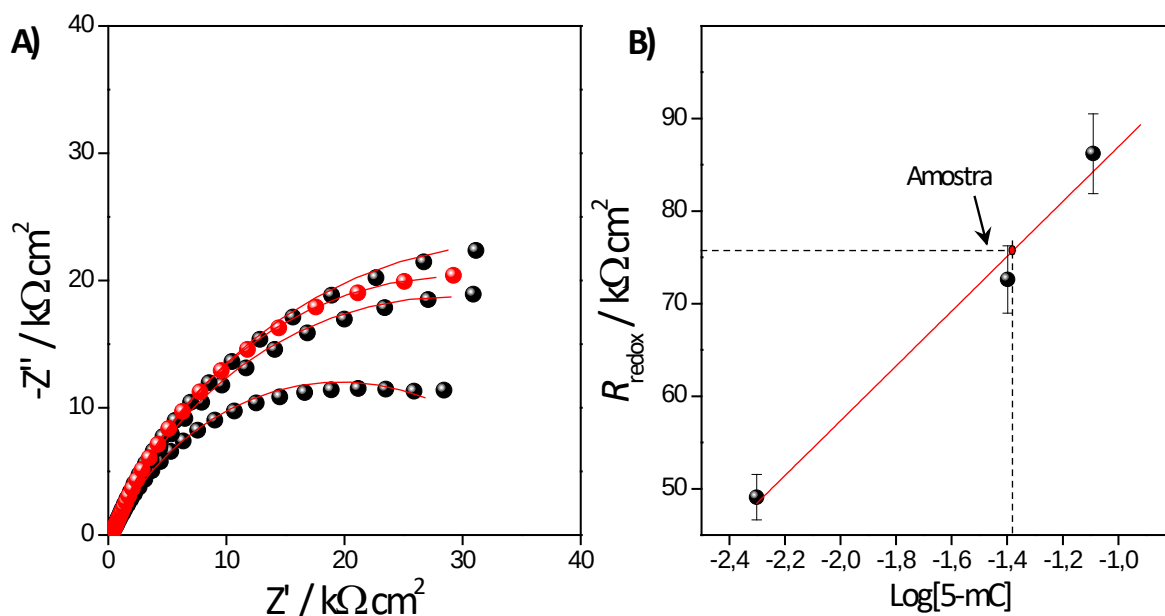


4.1.6. Análise em Amostra Real

Após verificação do desempenho analítico do imunossensor frente ao padrão de 5-metilcitosina, foi realizada a análise comparativa frente ao kit comercial com amostra de DNA extraída do sangue de um animal (rato Wistar macho) de grupo controle. Essa etapa do estudo contou com a colaboração do Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPFis). Responsáveis pela extração do DNA e quantificação do nível de DNA metilado por meio do kit ELISA comercial.

A Figura 43A apresenta o diagrama de Nyquist para a calibração do imunossensor (espectros na cor preta) e a análise da amostra real (espectro na cor vermelha). Na Figura 43B está a curva de calibração com o ponto destacado em vermelho representando o resultado da leitura da amostra.

Figura 43-A) Espectros de Nyquist para calibração do imunossensor de DNA metilado realizada em solução de PBS 0,05 mol L⁻¹ com potencial aplicado de -0,30 V. Os espectros na cor preta representam as adições de padrão de 5-mC e na cor vermelha o espectro obtido para a amostra real. B) Curva de calibração e quantificação da amostra.



Foram realizadas três leituras da amostra a fim de calcular o desvio padrão. Como resultado, a análise realizada através do kit comercial ELISA forneceu o valor calculado de concentração da amostra de 544 ng ml^{-1} de espécies de DNA metilado. Por sua vez, a análise realizada pelo imunossensor eletroquímico forneceu uma concentração calculada de $561 \pm 19 \text{ ng ml}^{-1}$ de Espécies de DNA metilado. Uma variação de aproximadamente 3% entre as duas técnicas.

4.2. Desenvolvimento de Imunossensor para Glut-4 baseado em filme polimérico redox de poli(TH) com nanopartículas de ouro

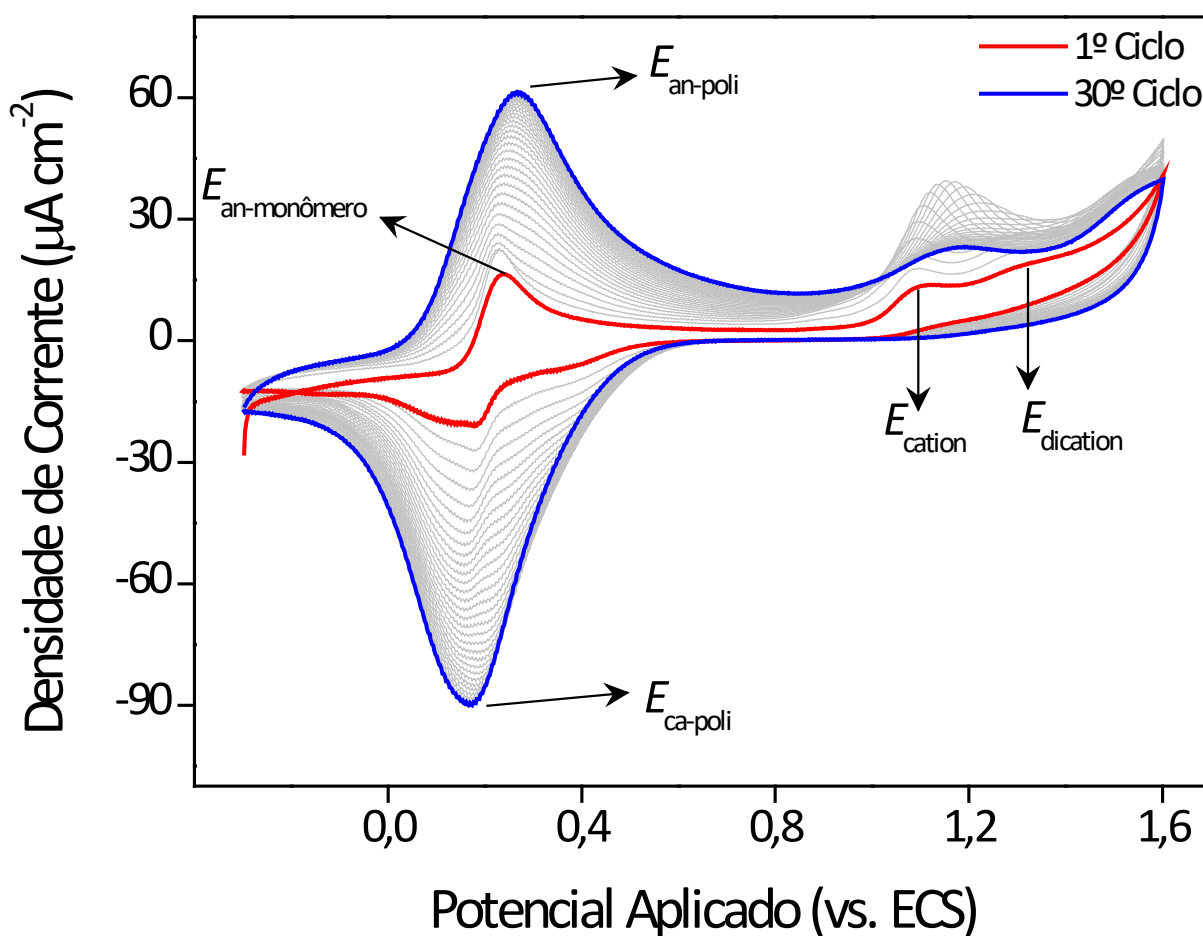
4.2.1. Desenvolvimento do filme de poli(TH)

4.2.1.1. Eletropolimerização

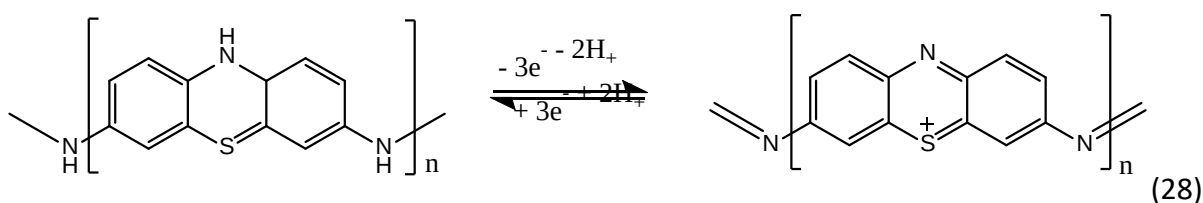
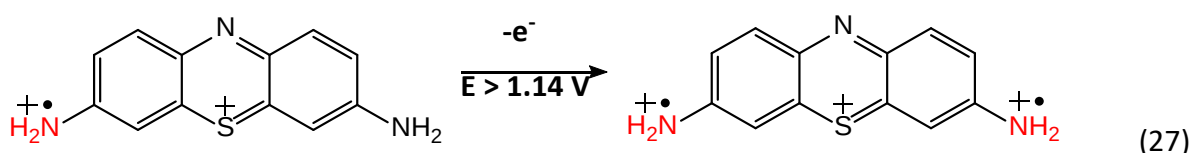
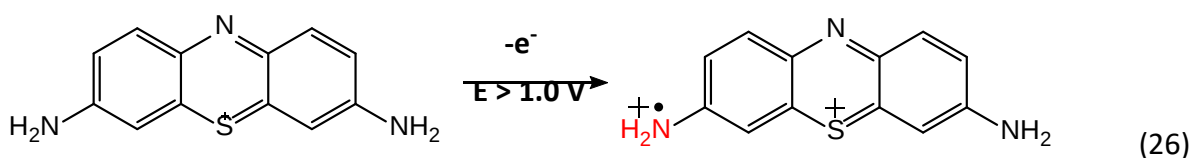
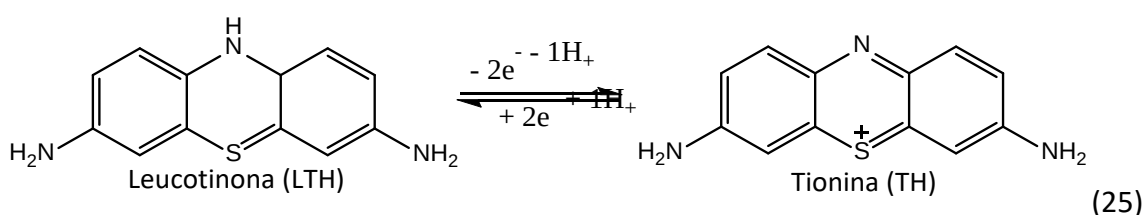
A técnica de eletropolimerização é amplamente utilizada na eletrossíntese de polímeros, pois permite grande controle sobre o revestimento da superfície de substratos condutores pelo filme polimérico formado (MARYS et al., 1999; TOPÇU; ALANYALIOĞLU, 2014; OLEAN-OLIVEIRA et al., 2021).

A Figura 44 apresenta o voltamograma cíclico para a formação do filme de poli(TH) sobre eletrodo de FTO.

Figura 44-Voltamograma cíclico para a eletropolimerização do filme de poli(TH) pela aplicação de 30 ciclos de potenciais com velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} em solução de HCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com 10 mmol L^{-1} do monômero tionina. $T=25^\circ$ e atmosfera de N_2 .



Durante o primeiro ciclo de potencial aplicado foi verificado um primeiro pico de oxidação ($E_{\text{ap-monômero}} = 0,24 \text{ V}$) referente ao comportamento redox do monômero tionina em solução (eq. 25) (HUANG et al., 2011; TOPÇU; ALANYALIOĞLU, 2014; TIAN et al., 2020). Ainda no primeiro ciclo, avançando no sentido anódico, dois outros picos foram verificados e atribuídos para os processos de oxidação irreversível de formação do cátion ($\text{TH}^{+•}$) e dicátion radical ($\text{TH}^{2+•}$) do monômero tionina (Eq. 26 e 27) (BARSAN; GHICA; BRETT, 2015). A geração das espécies radicalares dá início a formação do filme polimérico condutor de poli(TH) através da formação de novas ligações C-N (Eq. 28) (PAULIUKAITE et al., 2010).



Durante a varredura catódica, foi verificado um pico de redução referente a redução do filme polimérico formado (BARSAN; GHICA; BRETT, 2015). A posição do pico de redução se assemelha aquela verificada para a redução do monômero tionina em solução quando realiza-

se a voltametria em uma janela de potencial que não atinge o potencial necessário para formação dos cátions radicais.

Durante os ciclos seguintes foi verificado um aumento progressivo nos valores de corrente com destaque para o intervalo de potencial de 0,0 a 0,40 V, relacionado a reação de oxido-redução da poli(TH) formada (BARSAN; GHICA; BRETT, 2015). O incremento nos valores de corrente foi um claro indicativo da formação do filme de poli(TH) sobre a superfície do eletrodo de FTO (TOPÇU; ALANYALIOĞLU, 2014; TIAN et al., 2020; OLEAN-OLIVEIRA et al., 2021).

Por outro lado, a corrente na região da formação das espécies radicalares apresentou um incremento seguido de um decréscimo. A formação dos cátions radicais é dependente da estrutura e composição da superfície do eletrodo (BARSAN; PINTO; BRETT, 2008; HUO; LUO; LI, 2009). Com o recobrimento progressivo da superfície do eletrodo de FTO pelo filme de poli(TH) a área exposta do FTO para solução diminui, diminuindo a produção de cátions radicais.

4.2.2. Comportamento eletroquímico

4.2.2.1. Voltametria Cíclica

A Figura 45 apresenta o voltamograma obtido para o filme de poli(TH) em solução aquosa de KCl 0,50 mol L⁻¹ com pH ajustado para 2,0. O filme de poli(TH) apresenta um par redox bem definido, como demonstrado anteriormente pela Eq. 28, com E_{pa} em 0,21 V e E_{pc} em 0,14 V.

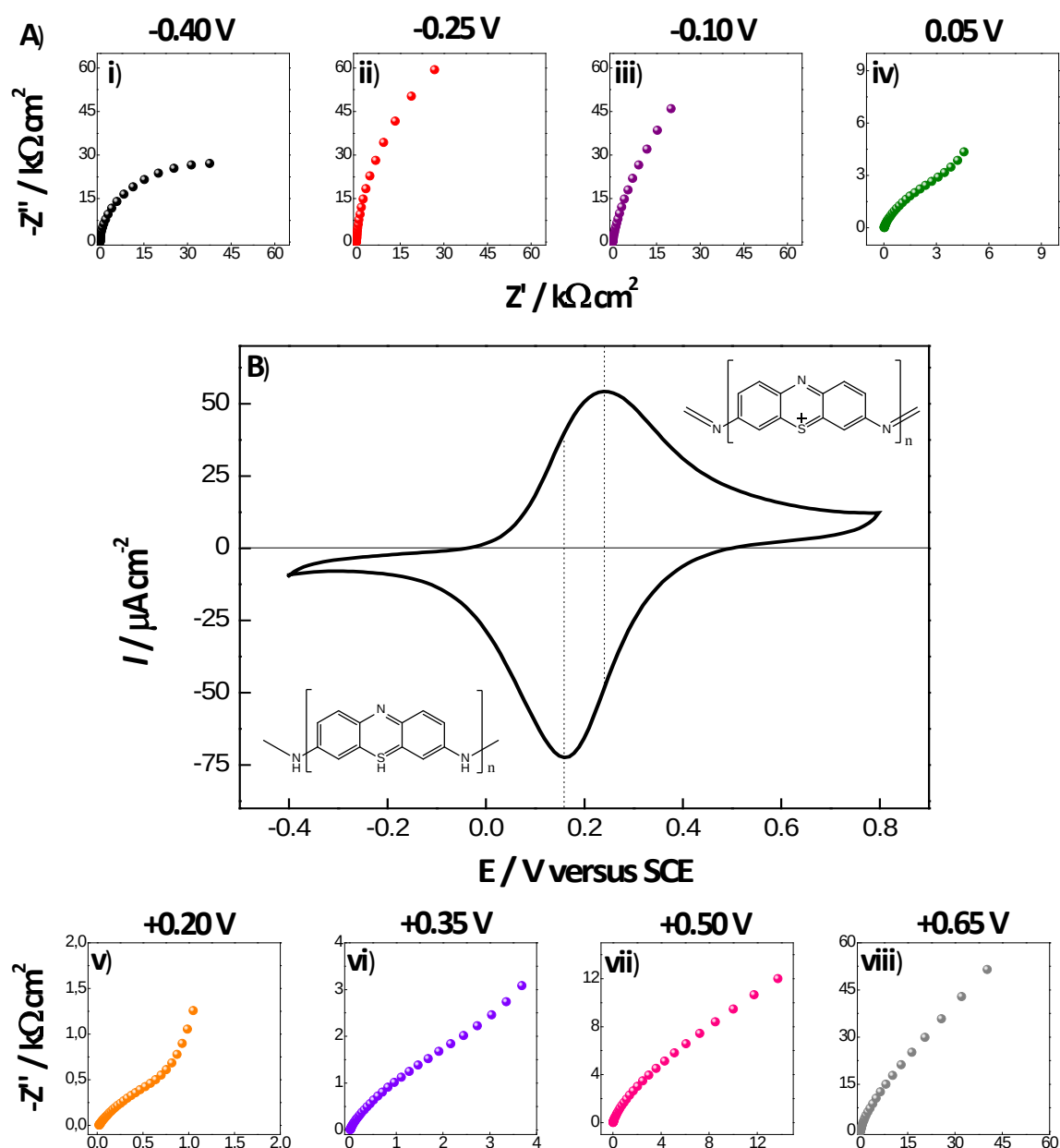
4.2.2.2. Caracterização do Filme de Poli(TH) por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

Para melhor entendimento e caracterização do comportamento eletroquímico do filme de poli(TH), medidas de EIE foram conduzidas sobre o filme polimérico aplicando-se diferentes potenciais que compreendem todo o intervalo de potencial utilizado na voltametria cíclica (Figura 45).

Na Figura 45 foi possível observar que a variação do potencial aplicado sobre o filme polimérico altera significativamente o comportamento do espectro de EIE, alterando seus valores de impedância. Para alcançar valores quantitativos dos elementos interfaciais

resistivos e capacitivos foram realizados ajustes matemáticos sobre modelo de circuito equivalente.

Figura 45-Resposta eletroquímica do filme de poli(TH) em solução de KCl 0,50 mol L⁻¹ em atmosfera de N₂. A) Espectros de Nyquist para os potenciais aplicados de -0,40 V to +0,65 V vs. ECS (de i a viii). B) Voltametria cíclica registrada em velocidade de varredura de 25 mV s⁻¹. As formas reduzida e oxidada do polímero estão sendo representadas no gráfico de voltametria cíclica.

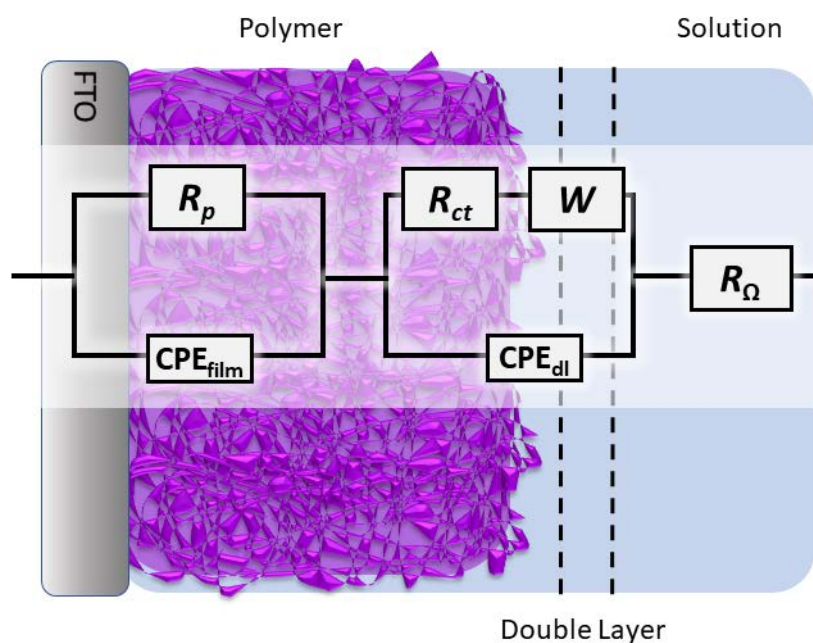


A Figura 46 apresenta o modelo de circuito equivalente utilizado para os ajustes matemáticos dos diferentes espectros. O presente modelo de circuito equivalente apresenta

três elementos resistivos, sendo uma resistência da solução ($R_{\Omega} = 14,0 \, \Omega$), uma resistência de transferência de carga relacionado a interface polímero/eletrodo (R_p) e uma resistência de transferência de carga para a interface filme/solução relacionada ao comportamento redox do filme de poli(TH) (R_{redox}).

Os elementos capacitivos são atribuídos para a capacitância da dupla camada (CPE_{dc}) e pseudo-capacitância do polímero (CPE_{filme}), característico de filmes poliméricos condutores (SAHALIANOV et al., 2019). Por fim, a presença do elemento de Warburg, relacionado ao fenômeno de transporte de massa para migração dos contra-íons para o interior do filme polimérico [38]. O modelo de circuito equivalente proposto foi similar ao verificado em literature para trabalhos similares envolvendo o estudo de polímeros condutores redox (BARSAN; PINTO; BRETT, 2008; PACHECO; OLEAN-OLIVEIRA; TEIXEIRA, 2020).

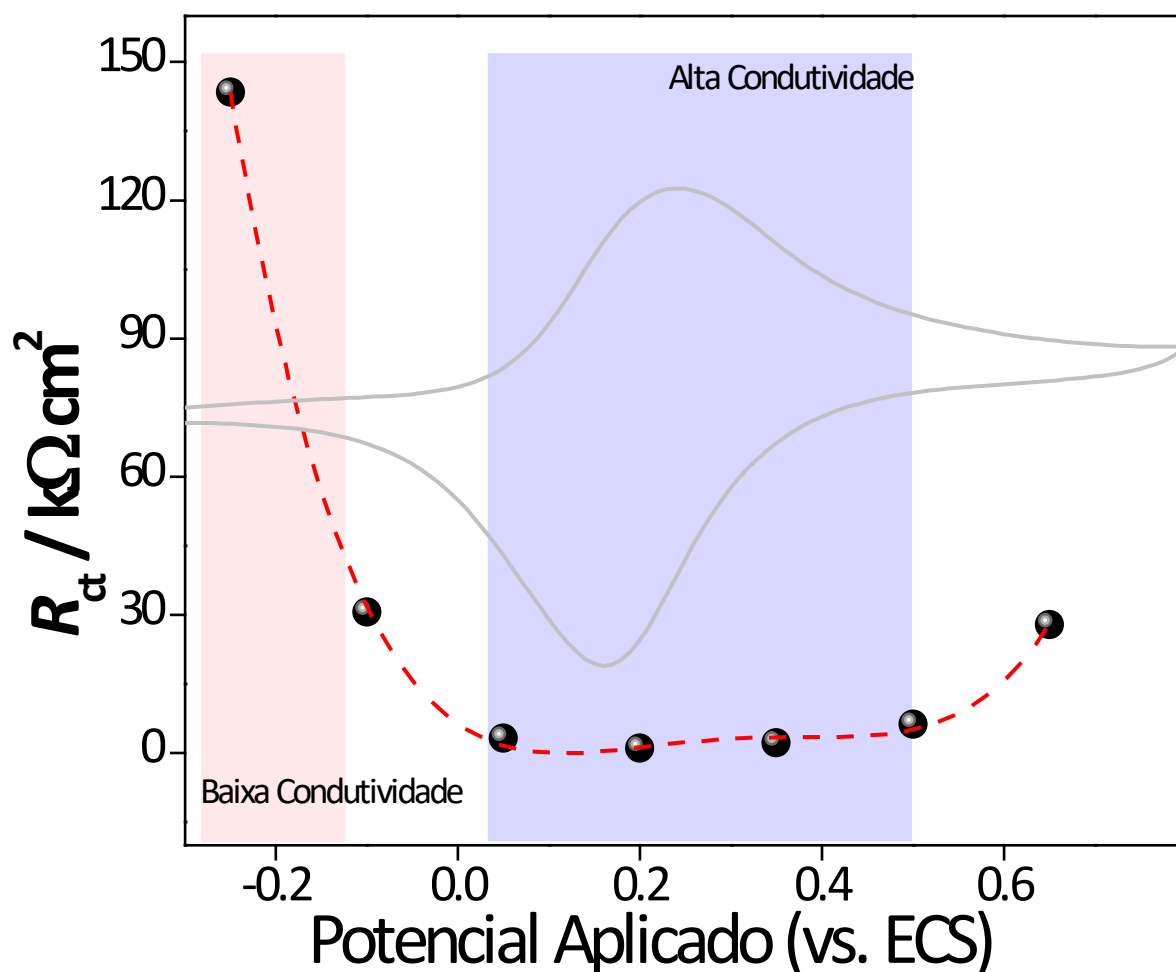
Figura 46-Modelo de circuito equivalente para ajustes matemáticos sobre espectros obtidos para o filme de poli(TH).



Fonte: Autoria Própria.

Para melhor visualização dos resultados obtidos, os dados foram organizados na forma de gráficos. Foi dado destaque para os elementos de R_{ct} , CPE_{filme} e W . Os demais resultados foram reunidos no Anexo 1. A Figura 47 apresenta os valores de R_{ct} em função do potencial aplicado.

Figura 47-Valores de R_{ct} em função do potencial aplicado. Os valores de resistência foram obtidos a partir do ajuste matemático feito sobre modelo de circuito equivalente da **Figura 46**.

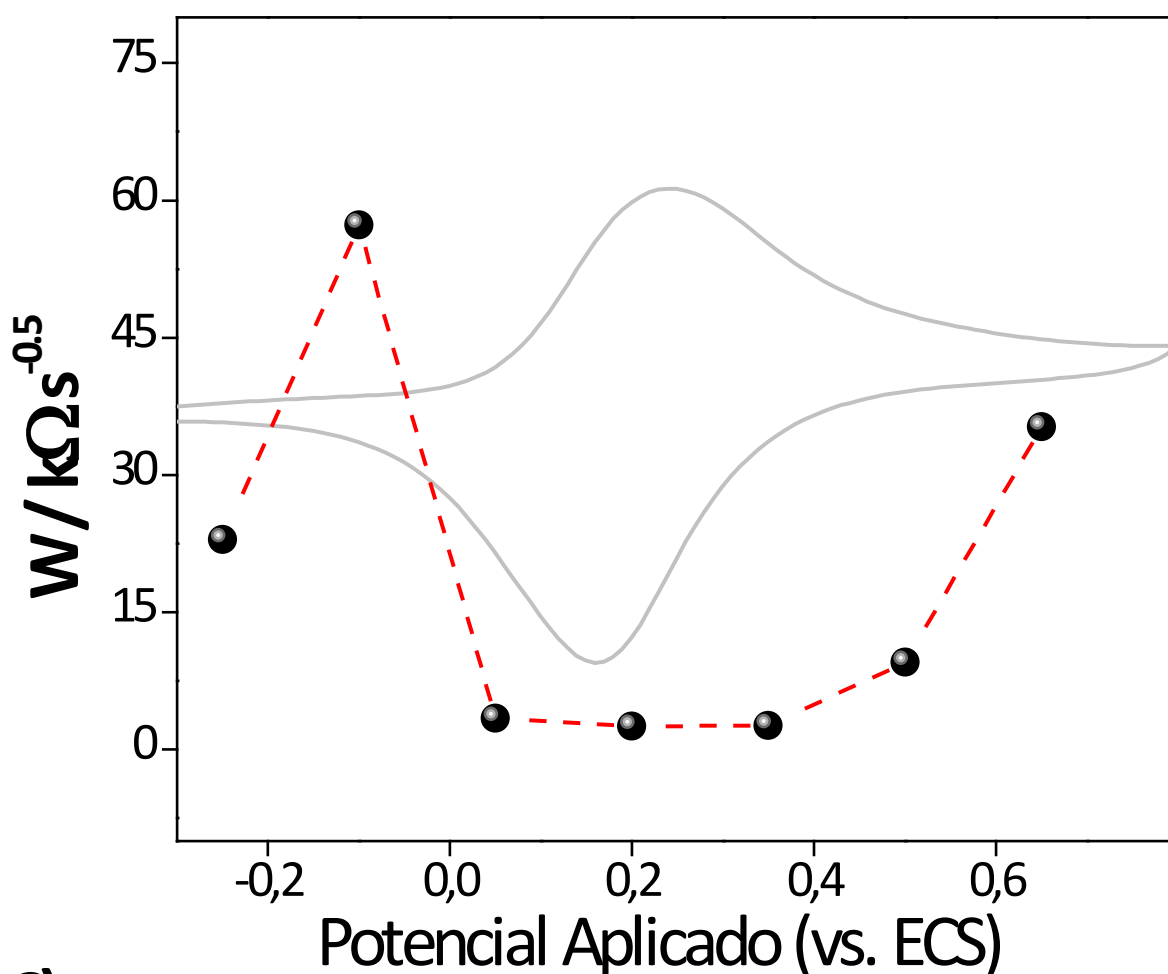


Com base na estrutura do polímero é possível entender o comportamento da condução dividindo o gráfico em duas regiões. A primeira região foi chamada de região de baixa condutividade, compreendendo a faixa de -0,25 a -0,2 V vs. SCE. Nesta região, a poli(TH) está em sua forma totalmente reduzida (TOPÇU; ALANYALIOĞLU, 2014; BARSAN; GHICA; BRETT, 2015). Nesta conformação, a poli(TH) apresentou sua menor capacidade de condução eletrônica (maior resistência), provavelmente devido à interrupção de sua π -conjugação, bem como a extinção da carga positiva deslocalizada. A segunda região, compreendendo a faixa de potencial de -0,10 a +0,50 V, apresentou os menores valores de R_{redox} . A partir do potencial 0,0 V temos o início da oxidação do filme de poli(TH). De forma notável, uma pequena alteração no número de espécies oxidadas no filme polimérico reflete totalmente sobre a condutividade do filme. Na região de 0,20 V, praticamente todo filme se encontra em sua

forma conjugada (BARSAN; GHICA; BRETT, 2015), sendo esse o potencial com menor valor de resistência.

Contudo, a grande mudança no valor da condutividade do polímero, ainda no valor de -0,10 V, demonstra que a condutividade do filme é fortemente influenciada também por outros fenômenos, não apenas pela presença da π -conjugação de sua cadeia polimérica. A análise feita sobre os valores do elemento de Warburg (Figura 48) demonstrou que provavelmente o movimento do contra-íon Cl^- em sua estrutura interfere na sua condutividade, uma vez que ele atua como dopante.

Figura 48-Valores de W em função do potencial aplicado. Os valores do elemento de Warburg foram obtidos a partir do ajuste matemático feito sobre modelo de circuito equivalente da Figura 46.

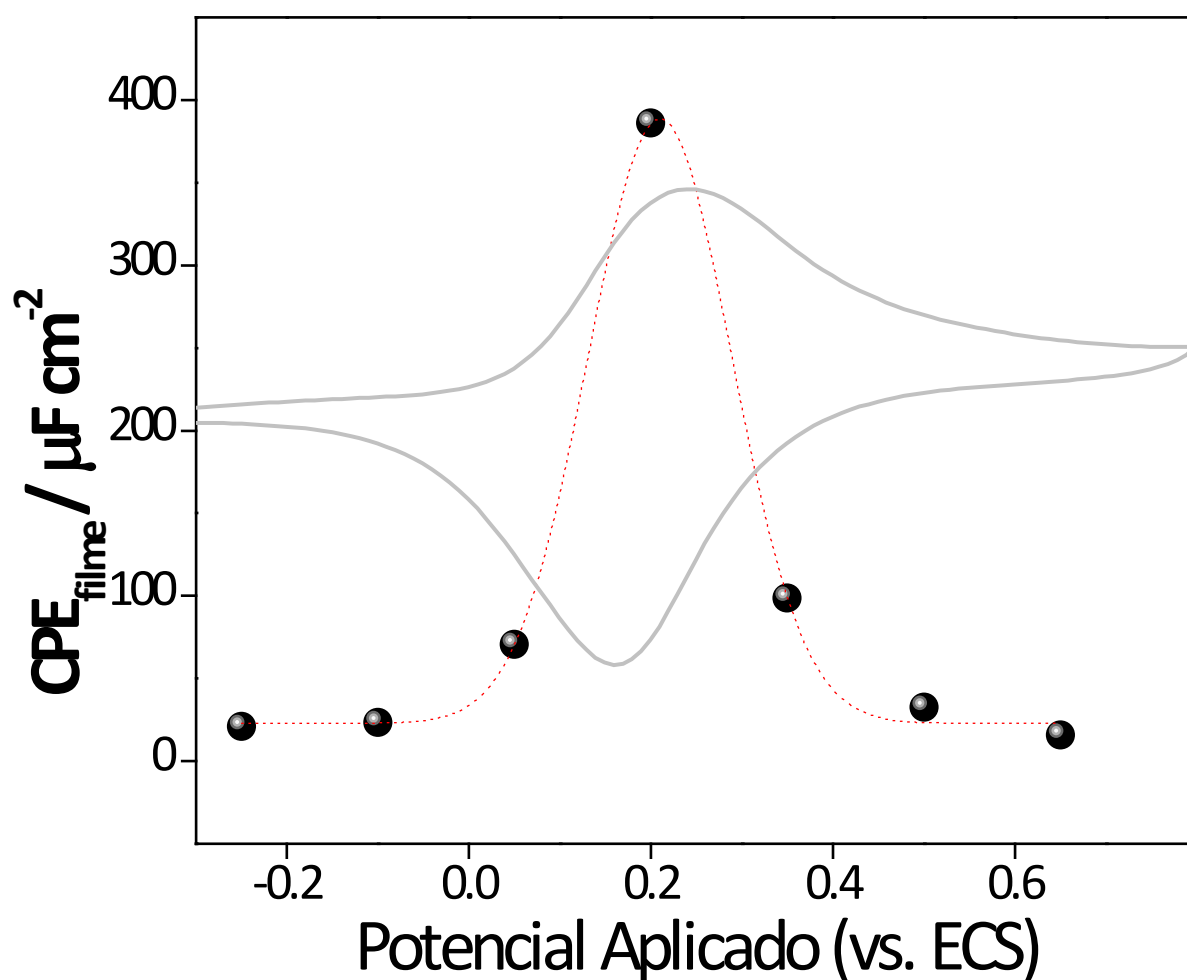


Anterior ao potencial de -0,035 V (potencial de início da reação de oxidação do polímero) há apenas movimento dos íons por atrações eletrostáticas causadas pela variação

do potencial do eletrodo. Após o potencial de início, observa-se a mudança de polaridade do eletrodo e início da oxidação do filme polimérico, alterando o contra-íon responsável pelo balanço de carga na matriz polimérica, resultando na diminuição do valor de W . Avançando para +0,35 V, há um aumento exponencial do valor de Warburg devido à limitação do acesso dos íons Cl^- para os centros redox mais internos do polímero (VELÁZQUEZ-MANZANARES et al., 2019).

Corroborando com os dados anteriores, os valores de $\text{CPE}_{\text{filme}}$ apresentaram um comportamento de aumento e diminuição de seus valores atingindo seu valor máximo exatamente acima do potencial formal de +0,20 V (Figura 49).

Figura 49-Valores de $\text{CPE}_{\text{filme}}$ em função do potencial aplicado. Os valores de capacitância foram obtidos a partir do ajuste matemático feito sobre modelo de circuito equivalente da Figura 46.



Este comportamento é característico de polímeros supercapacitores e foi relatado anteriormente para filmes de polímeros condutores de polipirrol (SUNDFORS; BOBACKA, 2004). O comportamento simétrico do aumento da capacitância sobre o potencial formal é indicativo do controle da condutividade por transporte de íons.

4.2.3. Otimização dos Parâmetros para Eletropolimerização da Poli(TH)

4.2.3.1. Variação do intervalo de potencial aplicado

O intervalo de potencial aplicado tem influência direta na formação do cátion radical iniciador da cadeia polimérica durante o processo de eletropolimerização. Dessa maneira, diferentes filmes de poli(TH) foram construídos com diferentes janelas de potenciais com o objetivo de determinar o melhor intervalo de potencial para eletropolimerização do filme polimérico. Os filmes foram denominados de IP (intervalo de potencial), sendo IP1 para o intervalo de potencial de -0,30 a +0,80 V, IP2 para o intervalo de potencial de -0,30 a +1,0 V, IP3 para o intervalo de potencial de -0,30 a +1,40 V e IP4 para o intervalo de -0,30 a +1,60 V.

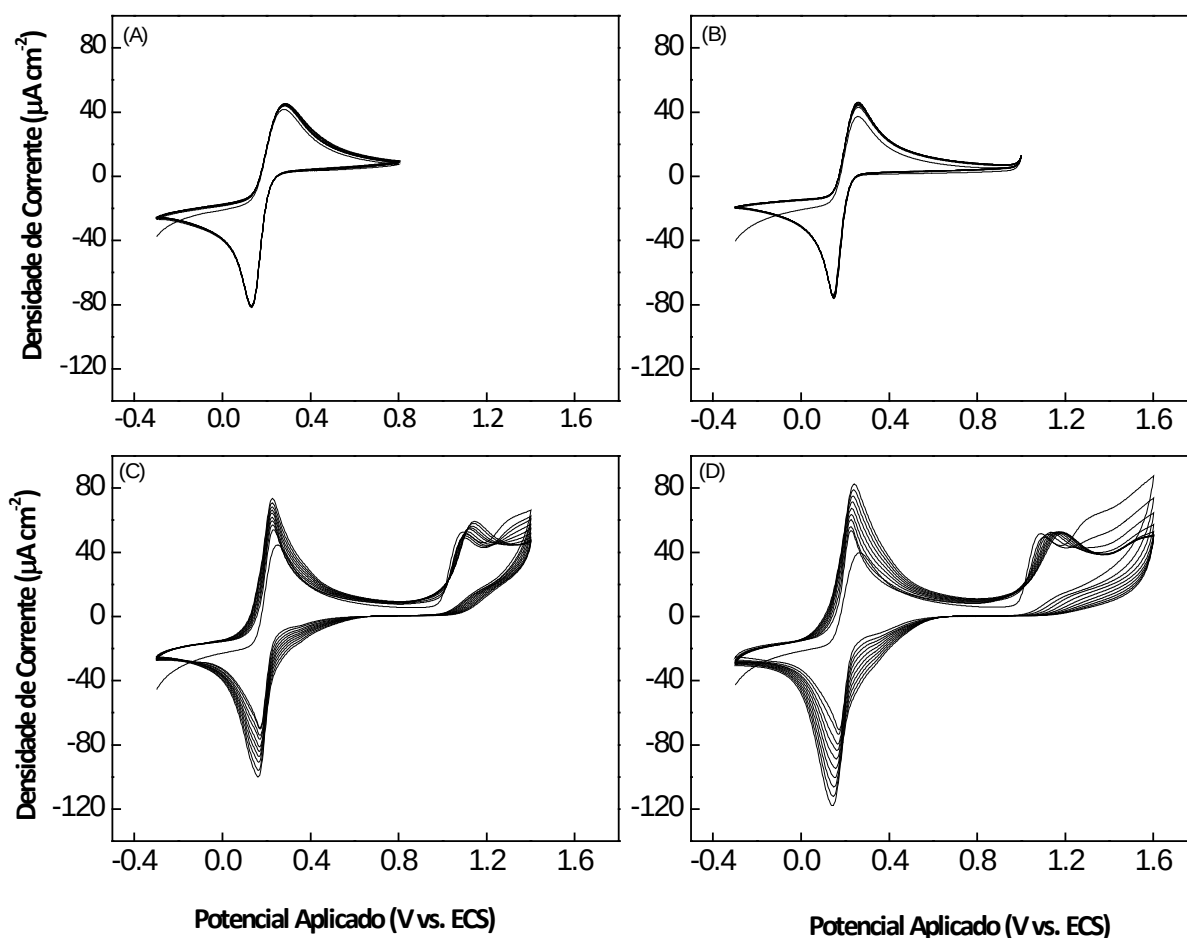
A Figura 50 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos durante a eletropolimerização dos diferentes filmes de poli(TH) aplicando-se diferentes janelas de potenciais. Os filmes IP1 e IP2 (Figura 50A e 50B) apresentaram o par redox característico para a oxidação e redução do monômero de tionina em solução, porém, não foi evidenciado o pico de potencial característico para a formação do cátion radical. Com isso, não há a formação do filme polimérico sobre a superfície do eletrodo e os valores de corrente se mantêm praticamente constante durante todos os 10 ciclos de potenciais.

Por sua vez, os filmes IP 3 e IP 4 formados pela aplicação de intervalos de potenciais com limites superiores a +1,0 V (Figura 50C e 50D), apresentaram o pico de potencial característico da formação do cátion radical do monômero de tionina. Com a formação dos cátions radicais foi verificado um incremento progressivo no valor de corrente do intervalo relacionado ao par redox polimérico, evidenciando a formação do filme polimérico condutor sobre a superfície do eletrodo de FTO.

Para verificar o desempenho dos filmes poliméricos formados, foram realizadas medidas de EIE em solução de KCl 0,50 mol L⁻¹ (pH = 2,0) livre de monômeros. Foi aplicado um potencial DC de -0,10 V (vs. ECS) em uma janela de frequência de 50 kHz a 0,10 Hz. O potencial aplicado foi escolhido em função do filme se comportar de maneira condutora, simplificando

o comparativo dos valores de R_{redox} . Os espectros obtidos foram analisados por meio de modelo de circuito equivalente apresentado na Figura 46.

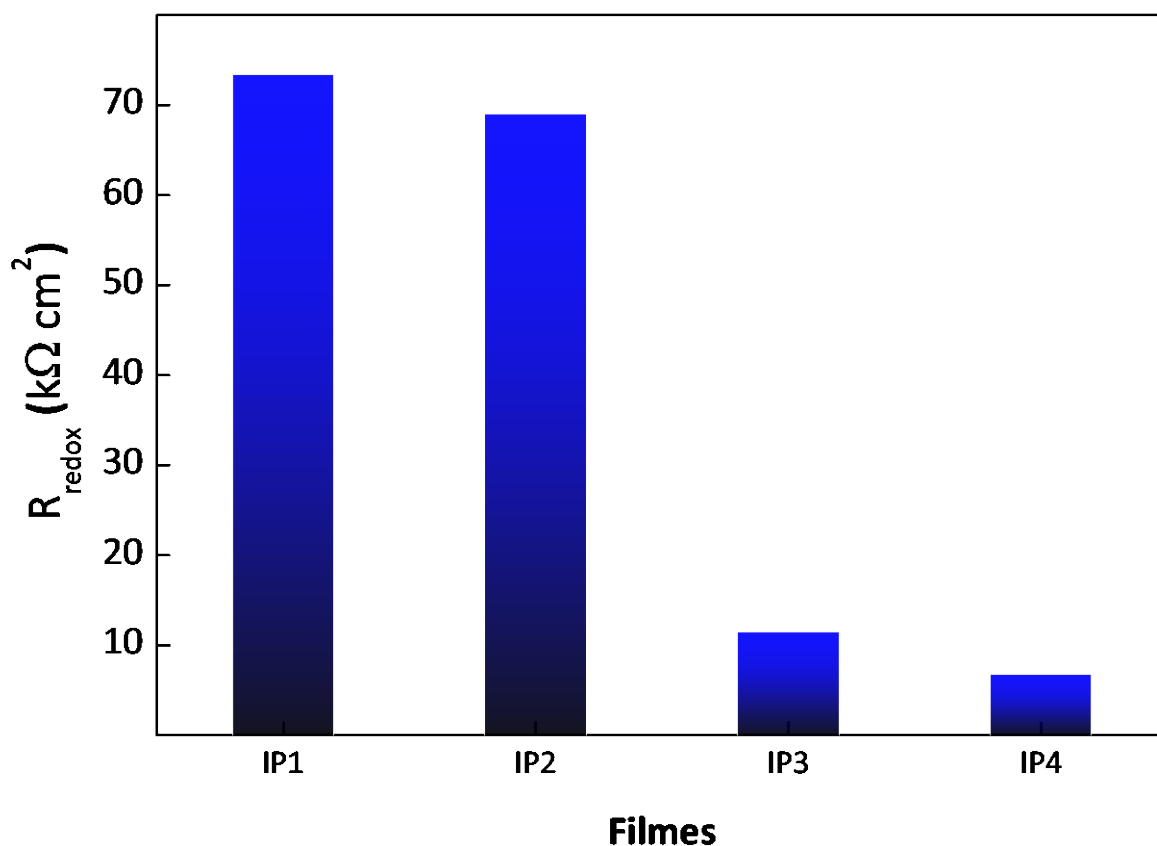
Figura 50-Voltamogramas cíclicos para a eletropolimerização dos filmes de poli(TH) em solução de 10 mmol L⁻¹ de tionina em 0,10 mol L⁻¹ de HCl. Foram aplicados 10 ciclos de potenciais e velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹ com intervalo de potencial de: (A) -0,30 a +0,80 V; (B) -0,30 a +1,0 V; (C) -0,30 a +1,4 V; e (D) -0,30 a +1,60 V (vs. ECS). Atmosfera de N₂ e T = 25°C.



Visando a simplificação do estudo, os espectros não serão exibidos. Na Figura 51 estão reunidos os valores de R_{redox} para cada filme polimérico construído a partir de diferentes intervalos de potenciais. Foi verificado que o filmes JP4 apresentou os menores valores de R_{redox} . Esse resultado revela a necessidade de ampliação do intervalo de potencial até valores suficientemente positivos para geração das espécies de cátion radical responsáveis pela formação do filme polimérico. A comparação com o filme de IP3 demonstra que é possível a construção do filme polimérico com intervalo de potencial de -0,30 a +1,40 V, contudo a geração de dicátions radicais pela ampliação do intervalo até 1,60 V favoreceu a obtenção de

um filme com menor resistência. Assim, o intervalo de potencial de -0,30 a +1,60 V (vs. ECS) foi escolhido para dar andamento nos estudos por apresentar o melhor desempenho eletroquímico.

Figura 51- Valores de R_{redox} obtidos através de ajuste matemático utilizando modelo de circuito equivalente para os espectros dos filmes de poli(TH) construídos com diferentes intervalos de potenciais.



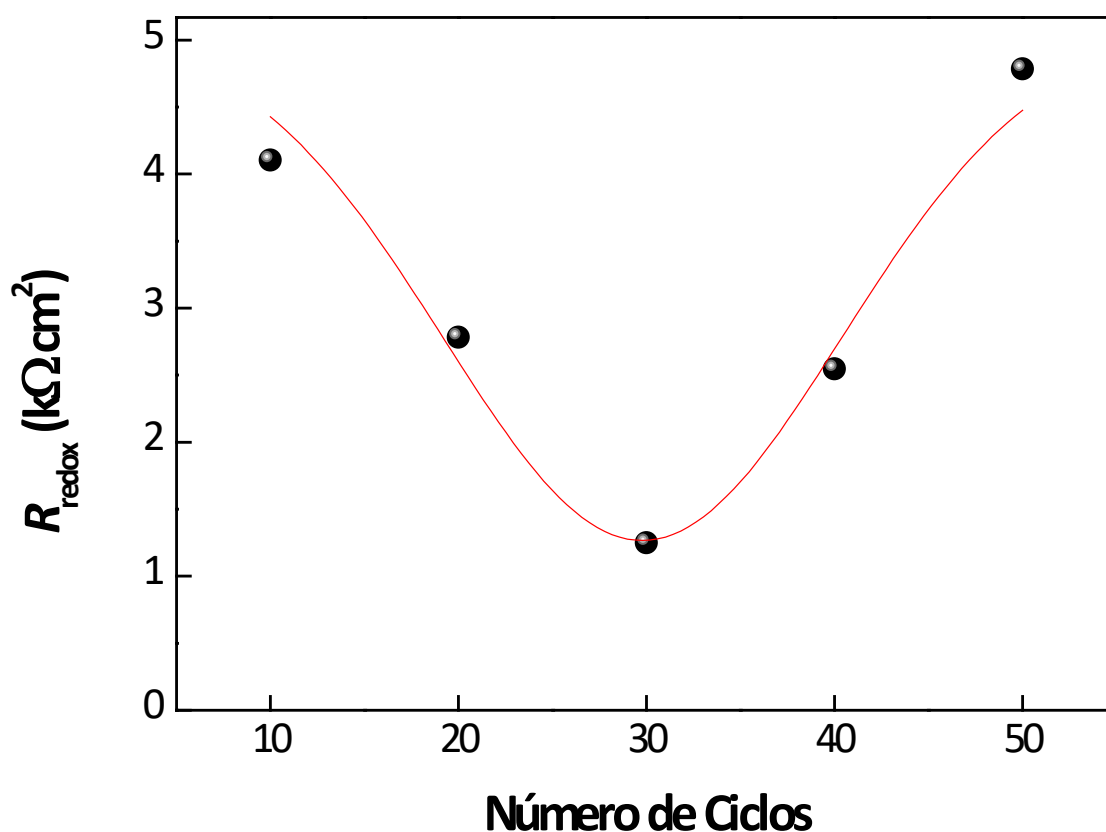
4.2.3.2. Influência do número de ciclos aplicado

O número de ciclos aplicados na eletropolimerização se mostra um importante parâmetro para construção dos filmes poliméricos condutores, uma vez que este controla o tamanho da cadeia polimérica bem como espessura e densidade dos polímeros formados (STILWELL; PARK, 1989; BABAIEE; PAKSHIR; HASHEMI, 2015). Dessa forma, foram construídos cinco filmes com número de ciclos de 10, 20, 30, 40 e 50. Os voltamogramas cíclicos obtidos durante a construção dos filmes foram semelhantes ao da Figura 44, não sendo exibidos para fins de simplicidade. Após a eletropolimerização dos filmes foram realizadas análises por EIE para verificação do desempenho eletroquímico.

Os resultados obtidos por espectroscopia de impedância eletroquímica foram analisados baseados no modelo de circuito equivalente apresentado na Figura 46, observando-se novamente o valor de R_{redox} obtido em potencial de -0,10 V como parâmetro comparativo de desempenho dos filmes eletropolimerizados.

A Figura 52 apresenta os valores de resistência de transferência de carga (R_{redox}) para os diferentes filmes construídos com diferentes números de ciclos aplicados. Foi verificado uma diminuição dos valores de R_{redox} até o 30º ciclo de potencial aplicado, com posterior aumento de seus valores. Esse comportamento demonstra que até o 30º ciclo o polímero acumula material eletroativo favorecendo a condutividade eletrônica na cadeia polimérica (MARYS et al., 1999; WOLFART et al., 2016; OLEAN-OLIVEIRA et al., 2021; TREVIZAN et al., 2021). Após o 30º ciclo há uma deposição excessiva de material, dificultando a transferência eletrônica e consequentemente aumentando a sua resistência. Dessa maneira, o valor de 30 ciclos de potenciais aplicados foi escolhido para dar continuidade aos estudos devido ao seu melhor desempenho eletroquímico.

Figura 52 - Valores de resistência de transferência de carga (R_{redox}) em função do número de ciclos aplicado durante a etapa de eletropolimerização obtidos através de ajuste matemático utilizando modelo de circuito equivalente.



4.2.3.3. Estudo da velocidade de varredura aplicada

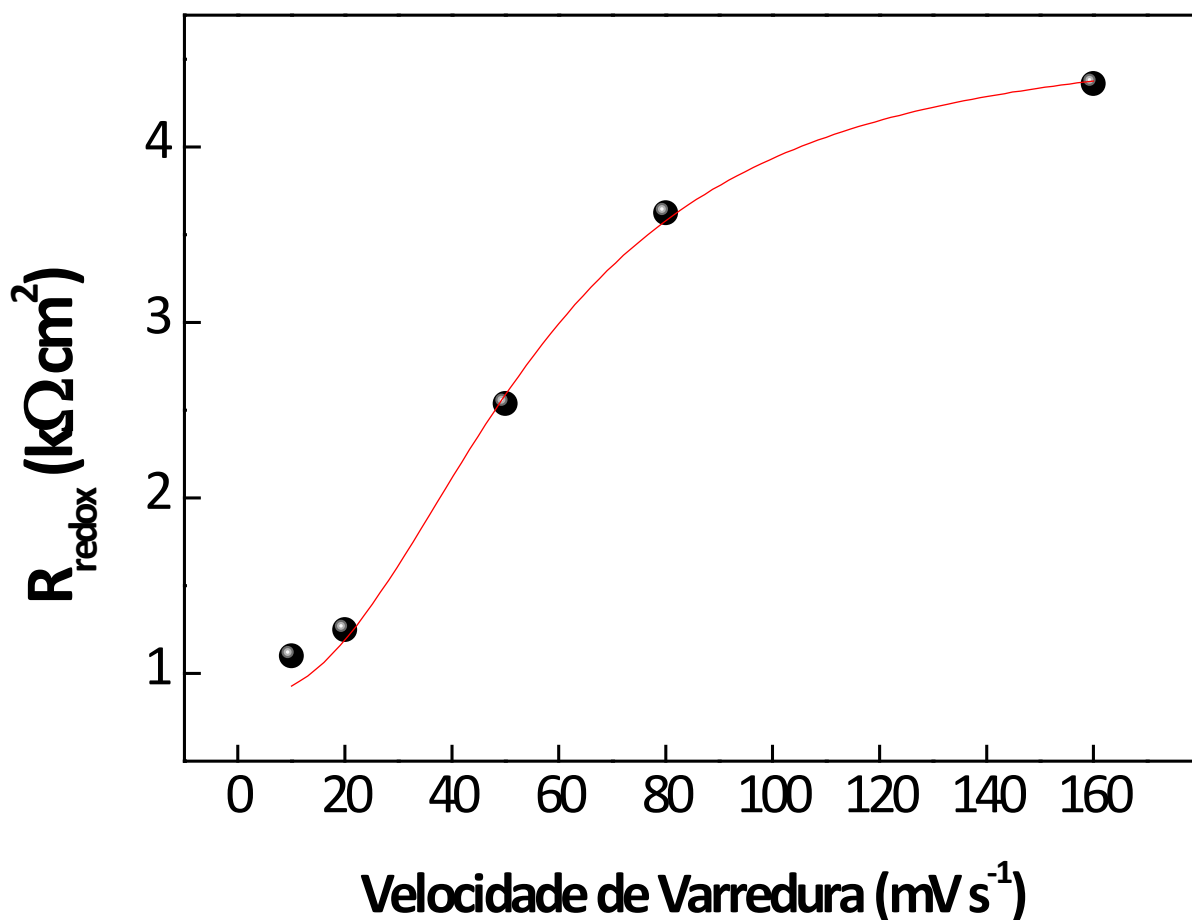
A velocidade de varredura é um importante fator na construção de filmes poliméricos condutores por eletropolimerização (BABAIEE; PAKSHIR; HASHEMI, 2015; OLEAN-OLIVEIRA et al., 2021). Esse parâmetro influencia nos fenômenos de transporte de massa bem como na forma de agregação do filme, podendo ser gerados filmes com maior ou menor densidades bem como filmes com uma maior ou menor porosidade. Assim, buscou-se avaliar a influência da velocidade de varredura na etapa de eletropolimerização por meio do comportamento eletroquímico do filme de poli(TH) comparando seus valores de resistência de transferência de carga (R_{redox}). Assim, foram construídos filmes com velocidades aplicadas de 10, 20, 50, 80 e 160 mV s^{-1} . Após, os filmes foram avaliados em solução aquosa através de espectroscopia de impedância eletroquímica.

A Figura 53 apresenta os resultados de R_{redox} para cada filme construído com diferente velocidade de varredura aplicada durante a eletropolimerização. Verificou-se um aumento dos valores de resistência de transferência de carga com o aumento da velocidade de varredura aplicada até a velocidade de 160 mV s^{-1} . O comportamento da curva indica que valores superiores a 160 mV s^{-1} podem exibir valores semelhantes de R_{redox} , sendo, portanto, independentes da velocidade de varredura aplicada.

Como mencionado anteriormente, a velocidade de varredura aplicada pode influenciar de maneira significativa a forma da cadeia polimérica, favorecendo ou desfavorecendo o desempenho eletroquímico. Para o presente estudo, baixas velocidades de varredura (10 e 20 mV s^{-1}) resultaram em filmes poliméricos com melhores desempenhos, provavelmente em função da obtenção de cadeias poliméricas com melhor organização estrutural. De fato, estudos anteriores conduzidos com polianilina demonstraram que a aplicação de altas velocidades de varreduras ($\sim 100 \text{ mV s}^{-1}$) resultaram em filmes poliméricos com maior número de ramificações em comparação com velocidades menores ($\sim 25 \text{ mV s}^{-1}$), que por sua vez resultavam em estruturas mais fibrosas (STILWELL; PARK, 1989; BABAIEE; PAKSHIR; HASHEMI, 2015).

Apesar do filme de 10 mV s^{-1} ter exibido o menor valor de R_{redox} , optou-se pela velocidade de 20 mV s^{-1} para o prosseguimento dos estudos em razão de apresentar uma relação tempo de construção/desempenho eletroquímico superior. Uma vez que o filme de 10 mV s^{-1} apresenta desempenho apenas 8% superior, mas necessita de um tempo de síntese 2 vezes maior.

Figura 53 - Valores de resistência de transferência de carga (R_{redpx}) em função da velocidade de varredura aplicada durante a etapa de eletropolimerização obtidos através de ajuste matemático utilizando modelo de circuito equivalente dos filmes de poli(TH).

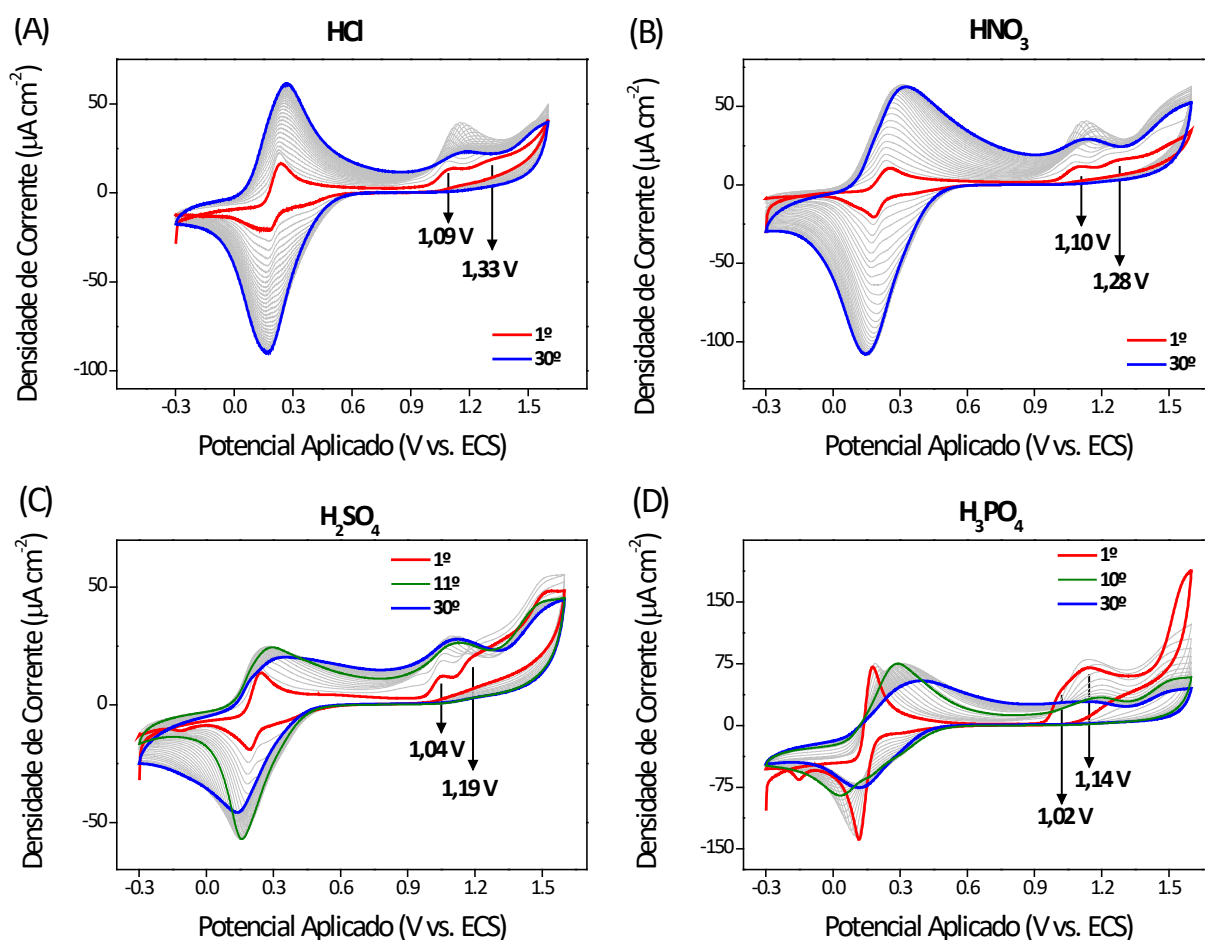


4.2.3.4. Influência do Eletrólito de Suporte Durante a Etapa de Eletropolimerização

O eletrólito de suporte utilizado durante a eletropolimerização desempenha papel fundamental para o desempenho eletroquímico do filme polimérico. Para avaliar a influência do ânion na formação da poli(TH) foram utilizados os ácidos HCl, HNO₃, H₂SO₄ e H₃PO₄ como eletrólitos suporte (denominados de poli(TH)X, onde X = Cl, NO₃, HSO₄ ou H₂PO₄), na concentração de 0,10 mol L⁻¹, para obter os ânions Cl⁻, NO₃⁻, HSO₄⁻ e H₂PO₄⁻ em solução. É importante destacar que embora H₂SO₄ e H₃PO₄ sejam ácidos polipróticos, eles tiveram como espécies químicas predominantes em solução a sua forma monovalente (HSO₄⁻ e H₂PO₄⁻) devido ao pH da solução de eletropolimerização estar entre ~1,0 a 1,6. Assim, foi possível analisar comparativamente a influência do tamanho dos ânions (raio hidratado - d_{hid}) na formação do filme de poli(TH).

A Figura 54 apresenta os voltamogramas cíclicos para a eletropolimerização de filmes com diferentes ácidos inorgânicos. Devido à similaridade do comportamento dos filmes durante a eletropolimerização, a discussão será limitada as diferenças verificadas entre os filmes.

Figura 54-Voltamogramas cíclicos para eletropolimerização dos filmes de poli(TH) com 30 ciclos de potenciais aplicados a uma velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} em $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ do monômero de tionina em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl (A), HNO_3 (B), H_2PO_4 (C) e H_3PO_4 (D) sob atmosfera de N_2 a 25°C .



O mecanismo de formação de poli(TH) tem grande influência do ânion em solução, desempenhando um papel tanto na estabilização quanto na mobilidade do radical e na estabilização do cátion radical formado, influenciando diretamente na formação estrutural da cadeia polimérica bem como em suas características eletroquímicas (BARSAN; PINTO; BRETT, 2008; KUZIN et al., 2021). Os valores dos potenciais de formação de cátions radicais foram semelhantes para poli(TH)Cl (1,09 V) e poli(TH) NO_3 (1,10 V), e valores mais baixos para

poli(TH)HSO₄ (1,04 V) e poli(TH)H₂PO₄ (1,02 V), demonstrando melhor estabilização de espécies radicais por ânions com maiores raios hidratados.

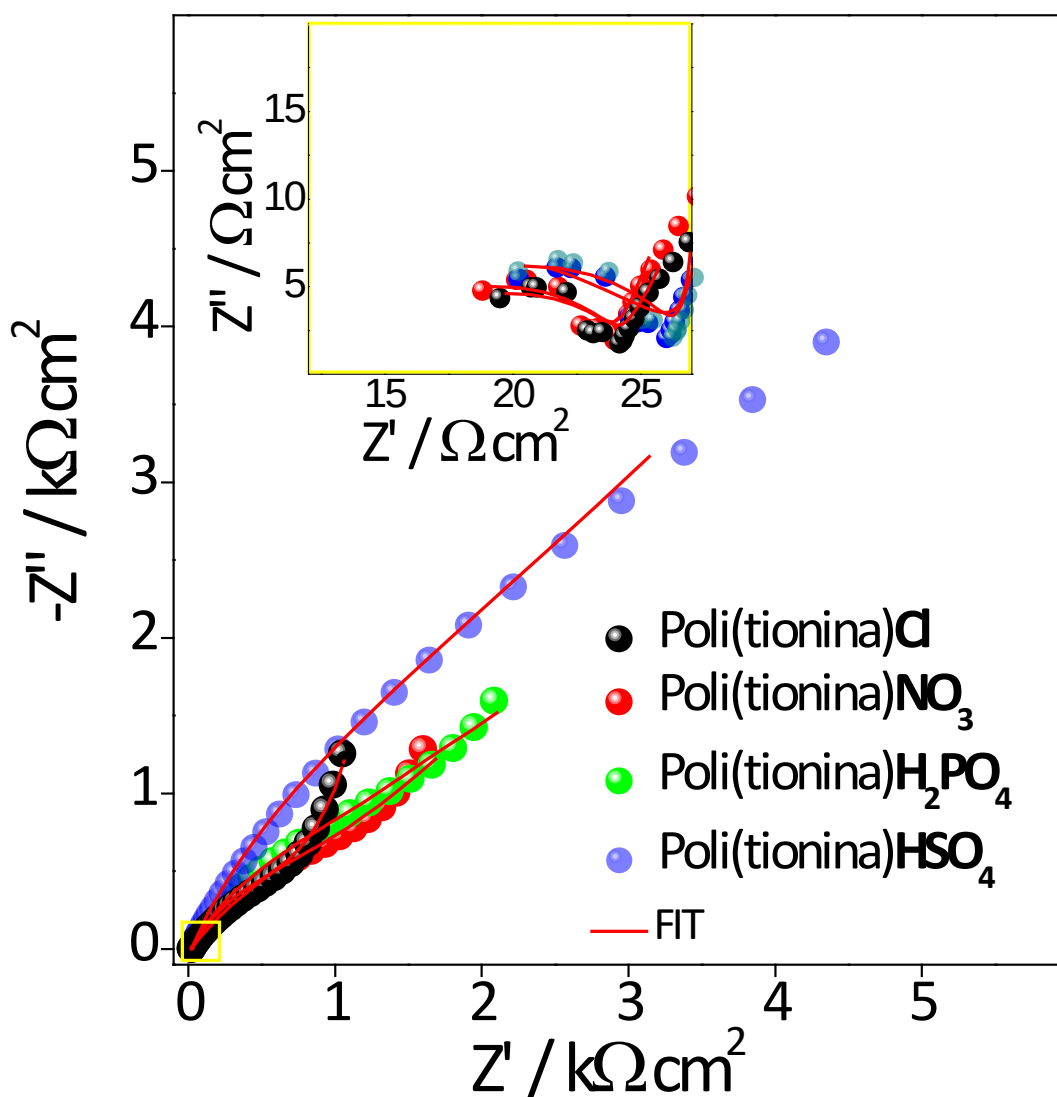
Os filmes preparados em meio de Cl⁻, NO₃⁻ e HSO₄⁻ apresentaram aumento na magnitude da corrente na região de formação dos cátions e dicátions radicais com posterior diminuição, até a sobreposição dos picos. A diminuição da corrente na região de formação do radical catiônico é um comportamento típico do grupo fenotiazina e ocorre devido à diminuição da exposição do monômero tionina à área superficial do eletrodo FTO devido ao seu revestimento pelo polímero poli(TH) (BARSAN; PINTO; BRETT, 2008; HUO; LUO; LI, 2009).

Todos os filmes apresentaram incremento de corrente no intervalo de potencial referente a respoita redox do filme polimérico, sendo indicativo da formação do filme polimérico condutor sobre a superfície do eletrodo de FTO (TOPÇU; ALANYALIOĞLU, 2014; TIAN et al., 2020; OLEAN-OLIVEIRA et al., 2021). Para Cl⁻ e NO₃⁻ o aumento foi acompanhado por um deslocamento insignificante dos valores de potencial de pico. Os filmes preparados por meio de HSO₄⁻ e H₂PO₄⁻ apresentaram um comportamento mais complexo durante a eletropolimerização. Para o filme de poli(TH)HSO₄, houve um aumento na corrente até o 11º ciclo. A partir dele, houve uma diminuição na magnitude de corrente, bem como uma mudança significativa nos potenciais de pico. Para o filme de poli(TH)H₂PO₄, imediatamente após o primeiro ciclo de potencial aplicado houve uma diminuição na corrente. Em seguida, observou-se um deslocamento e um aumento da corrente até o 10º ciclo (com referência à corrente anódica) seguido de uma nova diminuição nos valores de corrente. O comportamento observado para os filmes de poli(TH)HSO₄ e poli(TH)H₂PO₄ foi um indicativo de saturação do sistema devido a uma maior dificuldade no direcionamento da reação, exigindo um maior sobrepotencial (BARD; FAULKNER, 2010; BARROSSE-ANTLE et al., 2010). A explicação para este comportamento pode ser baseada no tamanho dos ânions H₂PO₄⁻ e HSO₄⁻. Estudos recentes indicam que ânions maiores possuem menor mobilidade e são comumente aprisionados na matriz polimérica, reduzindo a capacidade de transporte eletrônico do polímero (LE; KIM; YOON, 2017; HU et al., 2019).

O desempenho eletroquímico de filmes eletropolimerizados foram avaliados por espectroscopia de impedância eletroquímica. Para análise, utilizou-se como ponto de referência para a investigação comparativa o potencial aplicado de +0,20 V, correspondente ao potencial com menor valor de R_{redox} .

A Figura 55 apresenta os espectros para filmes de poli(TH) formados com diferentes eletrólitos. Os diagramas de Nyquist apresentaram um pequeno semicírculo incompleto na região de alta frequência. Esse comportamento é típico para fenômenos interfaciais com tempo de constante de relaxação muito inferiores a 1 s^{-1} [206].

Figura 55-Espectro de Nyquist para filmes construídos com diferentes eletrólitos de suporte. Potencial aplicado de +0,20 V vs. ECS em KCl 0,50 mol L⁻¹ (pH = 2,0). N₂ atm e 25°C.

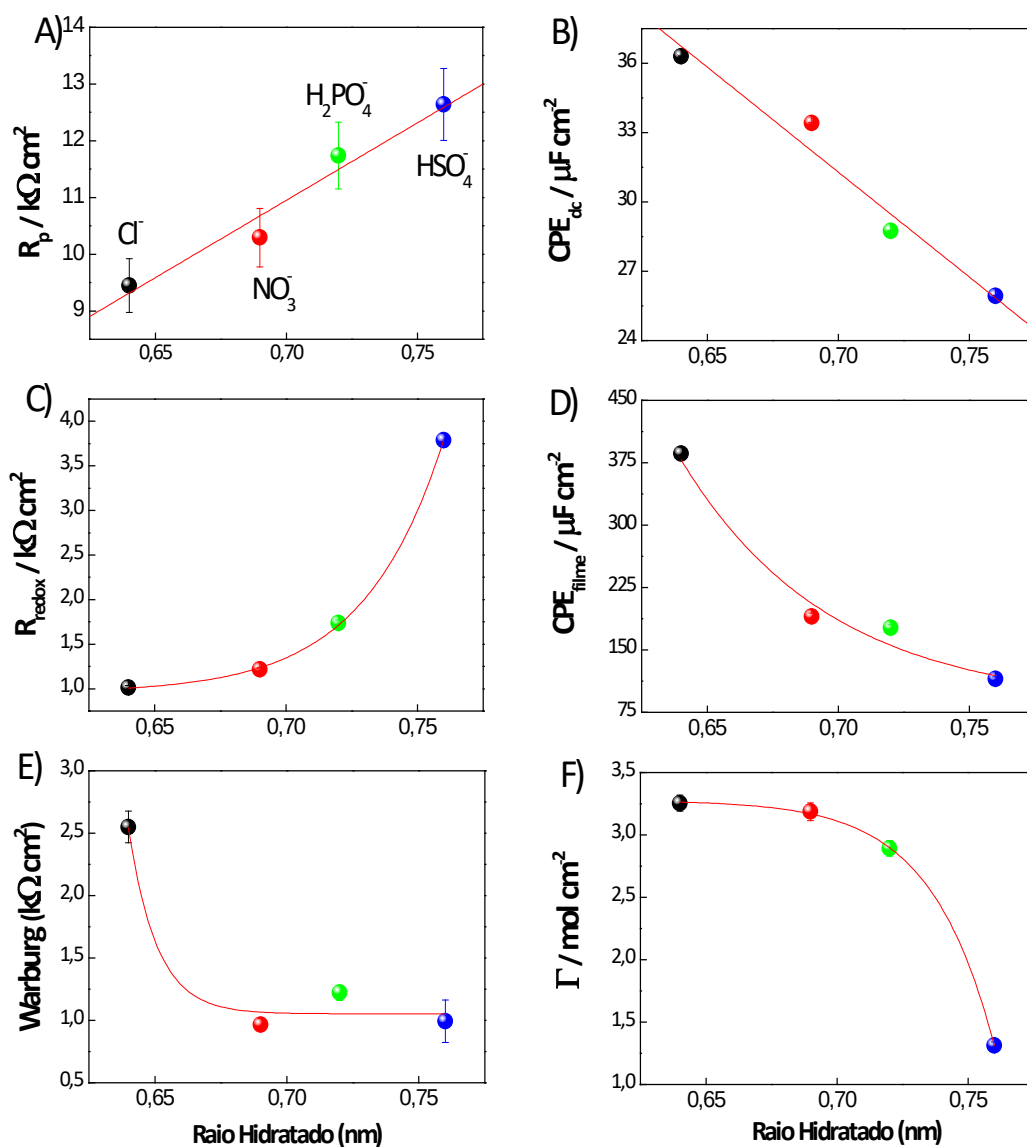


Para a região de média-baixa frequência, foram verificados semicírculos seguidos de linearidade relacionadas ao fenômeno de transporte de massa. Há uma clara mudança no comportamento dos filmes devido à mudança na magnitude do arco capacitivo do espectro, resultando em um aumento da impedância do sistema na sequência $\text{Cl}^- < \text{NO}_3^- < \text{H}_2\text{PO}_4^- < \text{HSO}_4^-$.

Para explorar ainda mais a influência da dimensão do ânion na resposta eletroquímica do filme de poli(TH), os valores dos elementos interfaciais resistivos e capacitivos foram avaliados em função do tamanho do ânion. Eles foram obtidos por ajustes matemáticos dos espectros no modelo de circuito equivalente apresentado na Figura 46.

A Figura 56 apresenta o comportamento dos diferentes elementos interfaciais versus o raio hidratado de cada ânion (HU et al., 2017).

Figura 56-Valores de parâmetros interfaciais versus raio hidratado do ânion utilizados durante a etapa de eletropolimerização. A) Resistência da interface polímero/FTO (R_p), B) capacitância de dupla camada (CPE_{dc}), C) resistência de transferência de carga da interface polímero/solução (R_{redox}), D) capacitância de filme (CPE_{filme}) e E) difusão de íons (W). F) Área de superfície ativa calculada.



A análise dos valores de resistência da interface polímero/FTO (R_p) revelou uma relação linear entre a resistência do filme de poli(TH) em função do raio hidratado do ânion utilizado na formação do filme polimérico. Para a resistência da interface polímero/solução (R_{redox}), também foi verificado um aumento da resistência com o aumento do raio do ânion, porém, esse comportamento foi não-linear. Este aumento na resistência do filme (diminuição na condutividade) é esperado para polímeros condutores dependentes do efeito da migração de íons durante o processo de dopagem e de-dopagem (LE; KIM; YOON, 2017).

Além disso, a capacitância de dupla camada e a pseudo-capacitância do filme polimérico são dependentes do número de espécies ativas, resultando no comportamento decrescente da capacidade de carga do filme em função do aumento do tamanho do ânion (HEIMBÖCKEL; HOFFMANN; FRÖBA, 2019; GE et al., 2020).

Analisando-se a Figura 56E para o filme de poli(TH), verificou-se uma diminuição da resistência à difusão com o aumento da dimensão do ânion. Este resultado concorda com o “efeito memória de tamanho”, onde a porosidade do polímero é dependente do tamanho do ânion (ABD-ELWAHED; HOLZE, 2002). Ânions de grandes dimensões formam porosidades maiores na matriz polimérica, que podem ser acessados por outros ânions de tamanho pequeno, mas não por ânions de tamanho grande. Assim, o cloreto utilizado neste estudo como eletrólito suporte em solução aquosa pode acessar o interior da poli(TH)HSO₄ com menor dificuldade em comparação a poli(TH)Cl.

4.2.3.5. Avaliação do Comportamento Semicondutor dos Filmes Eletropolimerizados: Análise por Mott-Schottky

Polímeros condutores redox são semicondutores orgânicos que podem ser caracterizados de acordo com o modelo de Mott-Schottky. O modelo de Mott-Schottky é amplamente utilizado como ferramenta na investigação da condutividade e no entendimento dos processos de transferência de íons e elétrons na interface eletrodo-eletrólito (PAULSEN; FRISBIE, 2012; ADÁN-MÁS et al., 2018; MARTIN; OLEAN-OLIVEIRA; TEIXEIRA, 2020). Isso é feito variando o potencial aplicado à célula eletroquímica, tornando possível medir a capacitância do espaço de carga (REN; ZHOU, 2017; ADÁN-MÁS et al., 2018; PACHECO; OLEAN-OLIVEIRA; TEIXEIRA, 2020).

A Figura 57 apresenta o gráfico de Mott-Schottky para os diferentes filmes de poli(TH). O comportamento linear com inclinação negativa revela que os filmes poliméricos

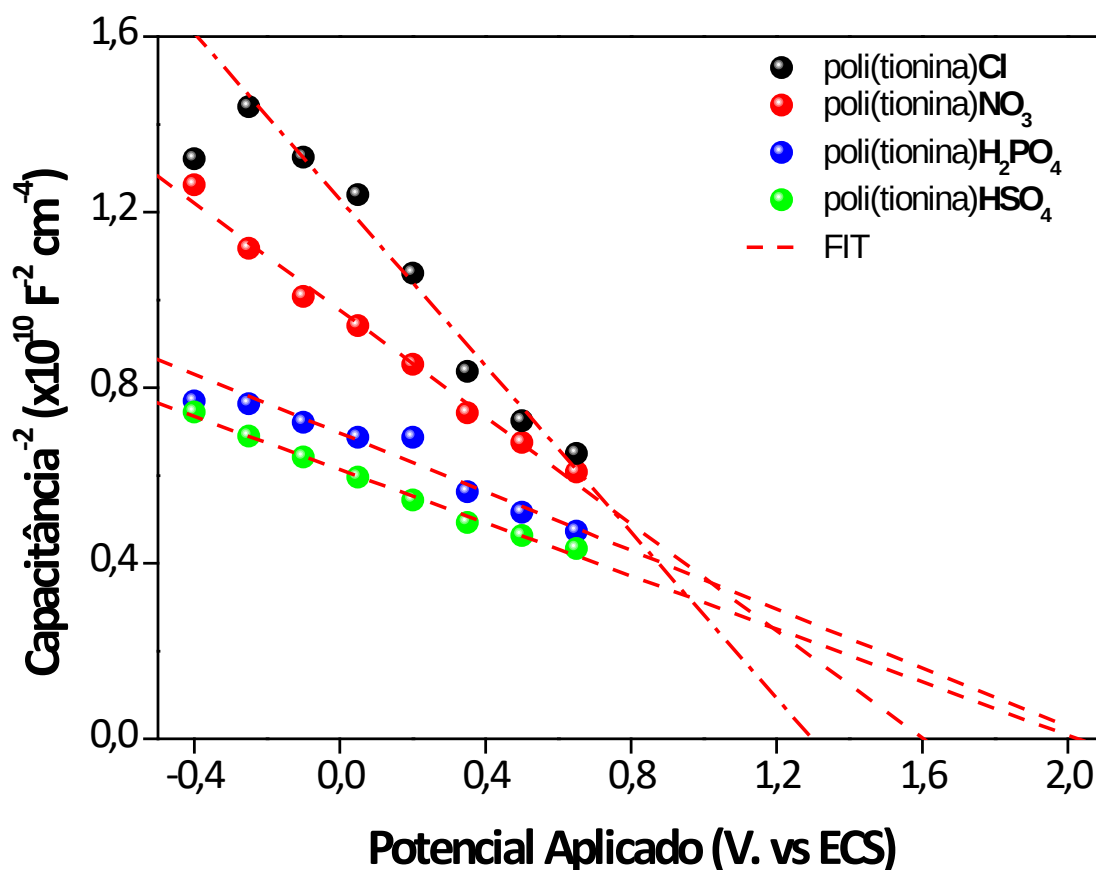
semicondutores de poli(TH) são do tipo-p (ADÁN-MÁS et al., 2018; HANKIN et al., 2019). As regiões lineares no gráfico de Mott-Schottky podem ser usadas para determinar a concentração do portador de carga (N_D) fornecido pela Eq. (29):

$$\frac{1}{C^2} = \frac{2}{(e \epsilon_0 \epsilon_r N_D)} (V_{app} - V_{FB} - RT/F) \quad (29)$$

Onde C é a capacitância ($F \text{ cm}^{-2}$), e é a carga do elétron ($1,602 \times 10^{-19} \text{ C}$), ϵ_0 é a permissividade do vácuo ($8,854 \times 10^{-14} \text{ C V}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), ϵ_r é a constante dielétrica do material, RT/F é o termo dependente da temperatura ($0,026 \text{ V}$ a 298 K), e V_{app} é o potencial aplicado. Assim, os valores de N_D aparente ($N_D \times \epsilon_r$) podem ser obtidos a partir da inclinação (Eq. 30):

$$\frac{d(C^{-2})}{dV_{app}} = \frac{2}{(e \epsilon_0 \epsilon_p N_A)} \quad (30)$$

Figura 57-Gráfico de Mott-Schottky dos filmes de poli(TH) em frequência fixa aplicada de 10 kHz.



Comumente, materiais semicondutores que apresentam melhores desempenhos de condutividade eletrônica possuem uma maior concentração de aceitadores de carga (ou doadores no caso de semicondutores do tipo n). No entanto, para o polímero de tionina, o filme com a menor concentração de portadores de carga foi o filme com melhor desempenho de condutividade. Esse fenômeno é resultado do avanço da concentração de carregadores além do valor ideal. Paulsen e colaboradores (PAULSEN; FRISBIE, 2012), verificaram, em estudo com poli(3-hexiltiofeno), que os polímeros condutores apresentam um pico máximo no comportamento do ganho de condutividade proporcional ao aumento da concentração de portadores de carga. Após atingir o valor ótimo, os polímeros condutores tendem a diminuir em condutividade com o aumento da concentração de portadores de carga. Isso se deve (no caso de semicondutores do tipo-p) ao esvaziamento total do orbital HOMO do polímero, não tendo um número adequado de estados vazios para atender aos mecanismos de transporte eletrônico. Assim, para a poli(TH), o ácido utilizado durante a síntese do filme polimérico exerce não apenas o efeito de dopagem no sentido da dimensão da cavidade ou capacidade de difusão do ânion através da estrutura polimérica, mas também na taxa de preenchimento do polímero dos orbitais HOMO, o que acaba por interferir no mecanismo de transporte eletrônico.

Após essa extensa investigação, foi escolhido como eletrólito de suporte o ácido clorídrico para as demais investigações, uma vez que ele apresentou melhor desempenho eletroquímico frente aos demais eletrólitos investigados.

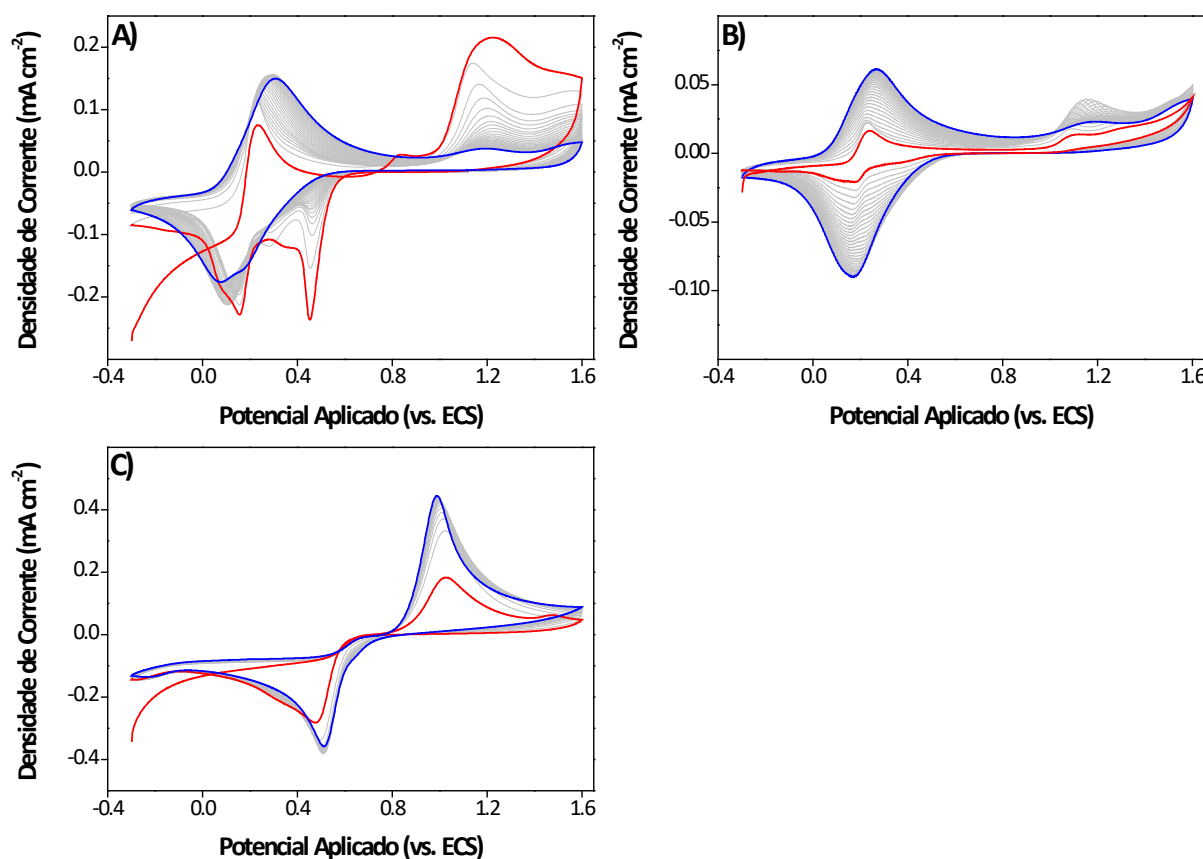
4.2.4. Construção do filme nanocompósito

Após otimizados e avaliados os parâmetros para construção do filme de poli(TH), buscou-se obter o filme nanocompósito de poli(TH) e nanopartículas de ouro (poli(TH)-AuNP). Nesse sentido, adicionou-se sal de ouro a solução de eletropolimerização e realizou-se a eletropolimerização utilizando os mesmos parâmetros eletroquímicos do filme de poli(TH) otimizados (Figura 58). Para fins de comparação do comportamento eletroquímico das espécies eletroativas presentes em solução durante o processo de eletropolimerização, o processo foi repetido em solução contendo apenas o sal de ouro (Figura 58C).

A Figura 58A apresenta o voltamograma cíclico referente a eletropolimerização do filme nanocompósito de poli(TH)@AuNP. Foi notável que o voltamograma do filme nanocompósito apresentou claramente um comportamento híbrido pela presença do

monômero de tionina e do sal HAuCl_4 . Durante a primeira varredura, não foi verificado o pico referente a formação do dicátion radical, sendo um primeiro indicativo da influência da espécie de ouro em solução. Ademais, a magnitude de corrente nessa região foi superior àquela verificada para a síntese contendo apenas o monômero, podendo ser resultado da somatória dos fenômenos de oxidação do ouro e formação das espécies radicalares, uma vez que elas ocorrem em um valor de potencial próximo (Figura 58C).

Figura 58-Voltamogramas ciclicos para a eletropolimerização dos filmes de poli(azo-BBY)@AuNP (A), poli(azo-BBY) (B) e eletrodeposição de nanopartículas de ouro (C) aplicado 30 ciclos de potenciais com velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} . $T=25^\circ$ e atmosfera de N_2 .



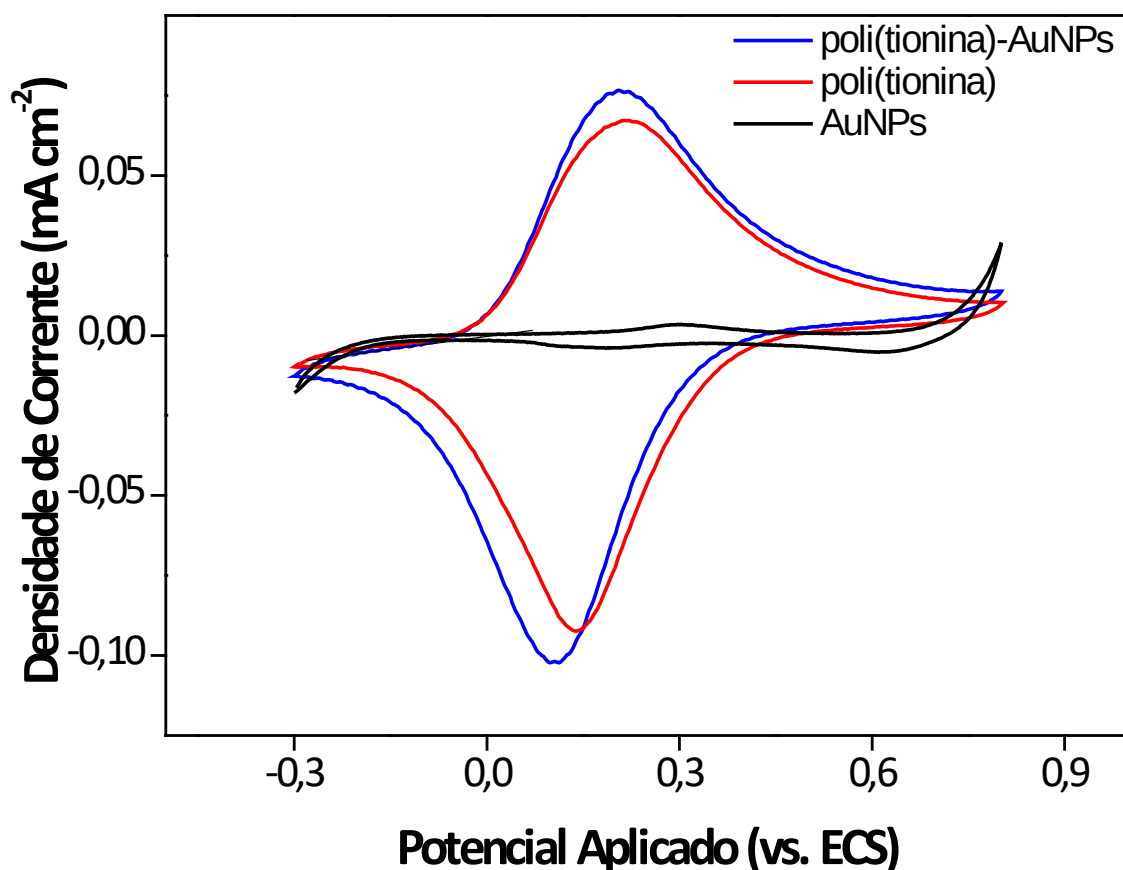
Durante a varredura catódica, foi verificado um primeiro pico de redução ($E_{\text{pc-Au}}$) associado a redução irreversível dos íons de ouro em solução para ouro metálico (KOMSIYSKA; STAIKOV, 2008), formando os primeiros núcleos de nanopartículas. Com o desenvolvimento da eletropolimerização, foi verificado o comportamento característico de diminuição da corrente no pico de potencial relacionado a formação de cátion radical. Também, acompanhou-se uma ampliação da magnitude de corrente no intervalo de potencial associado

a resposta redox da poli(TH), sendo claro indicativo da formação do filme sobre a superfície do eletrodo de FTO (TOPÇU; ALANYALIOĞLU, 2014).

Destacou-se o desaparecimento do pico de potencial catódico associado a redução do ouro ao final dos 30 ciclos de potenciais aplicado. Esse comportamento pode indicar uma deposição gradativa das camadas de polímero sobre as nanopartículas de ouro, diminuindo a exposição do ouro para a solução a cada ciclo de potencial aplicado.

Os filmes eletrodepositados foram investigados através de voltametria cíclica. Na Figura 59 estão os voltamogramas cíclicos para a resposta dos eletrodos de FTO modificados com o filme de poli(TH)-AuNP, poli(TH) e AuNP.

Figura 59-Voltamogramas cíclico para os eletrodos modificados de poli(TH), poli(TH)-AuNPS e AuNPs em solução de KCl 0,50 mol L⁻¹ aplicando-se velocidade de varredura de 25 mV S⁻¹. Atmosfera de N₂.

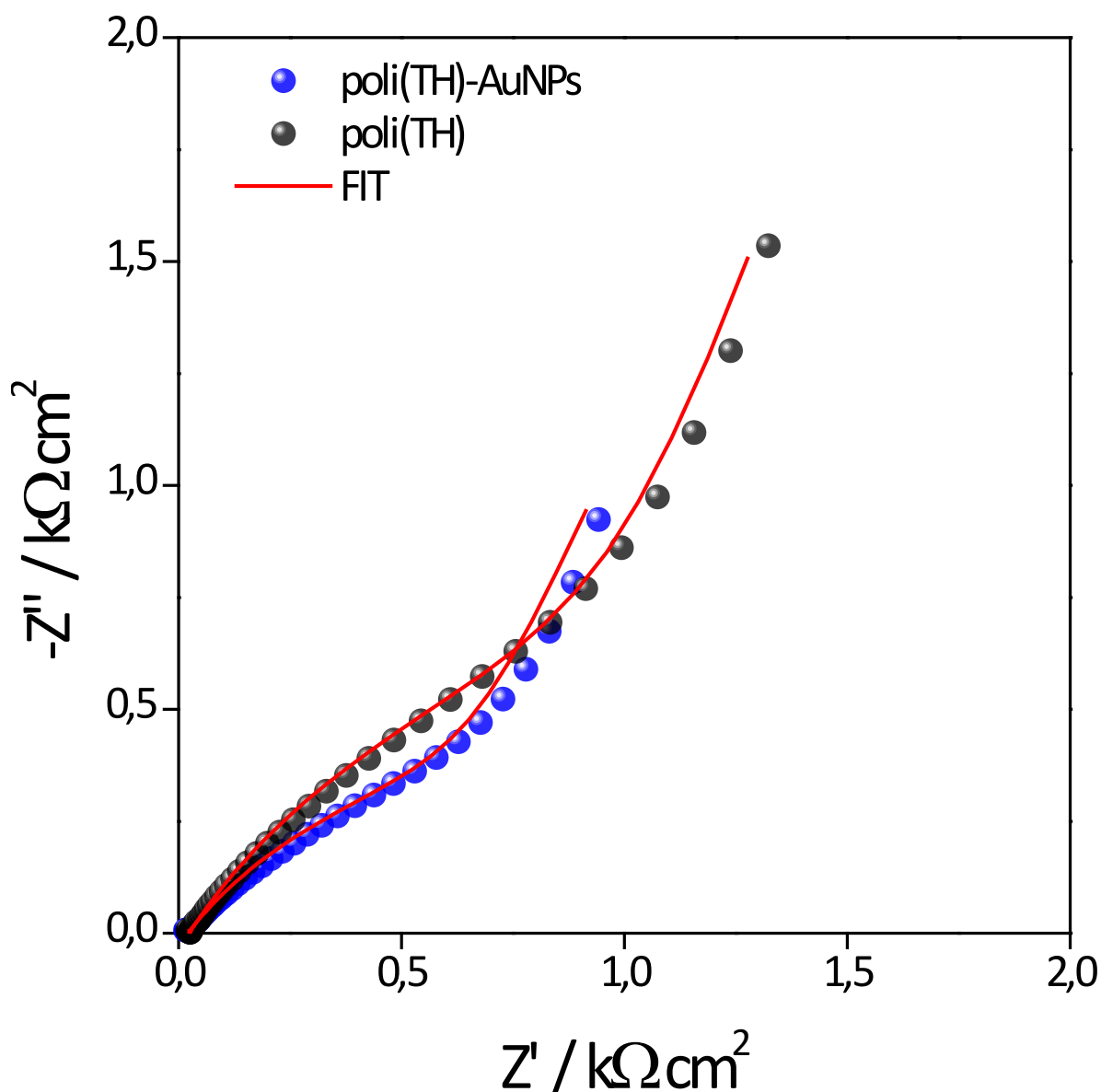


O eletrodo de FTO contendo somente a nanopartícula apresentou um par redox associado a formação de uma camada de óxido sobre a superfície das nanoestruturas de ouro (KOMSIYSKA; STAIKOV, 2008). Por sua vez, os filmes de poli(TH) e poli(TH)-AuNPs

apresentaram o par redox característico para a oxidação e redução da poli(TH) (Eq. 28) (TOPÇU; ALANYALIOĞLU, 2014; MAHBUBUR RAHMAN; LEE, 2021). O comparativo entre os valores de corrente demonstrou um aumento de cerca de 20% na magnitude de seu sinal, demonstrando que a presença das nanopartículas de ouro na matriz polimérica atua de forma positiva, ampliando o desempenho eletroquímico do sistema.

Os filmes de poli(TH) e poli(TH)-AuNPs também foram avaliados por espectroscopia de impedância eletroquímica. Aplicando-se um potencial de +0,20 V (vs. ECS) foram obtidos os espectros que estão sendo apresentados na Figura 60.

Figura 60-Espectros de Nyquist para os filmes de poli(TH) e poli(TH)-AuNPs em solução de KCl 0,50 mol L⁻¹ com potencial aplicado de +0,20 V (vs. ECS). 25°C e atmosfera de N₂.



Verificou-se que os espectros apresentaram comportamento semelhante quanto a sua forma com um valor inferior de impedância do sistema para o filme nanocompósito. A análise dos espectros por ajuste matemático sobre modelo de circuito equivalente possibilitou a obtenção dos valores dos elementos interfaciais. Para a análise, foi utilizado o modelo de circuito equivalente da Figura 46 por atender satisfatoriamente os critérios de erros. Vale destacar que o filme nanocompósito possui uma nova interface polímero/AuNP. Contudo, durante o processo de *fitting* não foi possível distinguir-la da interface filme/solução em decorrência da constante de relaxação desses fenômenos serem equivalentes. Os resultados obtidos foram sumarizados na Tabela 9.

Pela análise dos elementos interfaciais, verificou-se um menor valor de R_{redox} para o filme nanocompósito. A ampliação da resposta eletroquímica teve influência do aumento da área eletroativa provocada pela presença das nanopartículas de ouro na matriz polimérica. Esse incremento pode ser verificado pela ampliação dos valores de elementos capacitivos. Uma vez que tanto a capacitância da dupla camada (CPE_{dc}) quanto a capacitância redox (CPE_{filme}) são dependentes do número de espécies eletroativas presentes sobre a superfície do eletrodo (OLEAN-OLIVEIRA; MONTEIRO SERAPHIM; TEIXEIRA, 2022).

Tabela 9-Parametros impedimétricos determinados a partir de ajustes matemáticos sobre modelo de circuito equivalente. Os erros foram inferiores a 4%.

Eletrodo	R_{Ω}	R_{ct}	R_{redox}	CPE_{dc}	CPE_{filme}	α_{dc}	α_{filme}	W
	(k Ω cm ²)			(μF cm ⁻² s ^{α-1})				
Poli(TH)	0,010	0,010	1,38	2,74	244	0,98	0,89	1,14
Poli(TH)-AuNPs	0,011	0,014	0,58	3,08	311	0,92	0,81	0,78

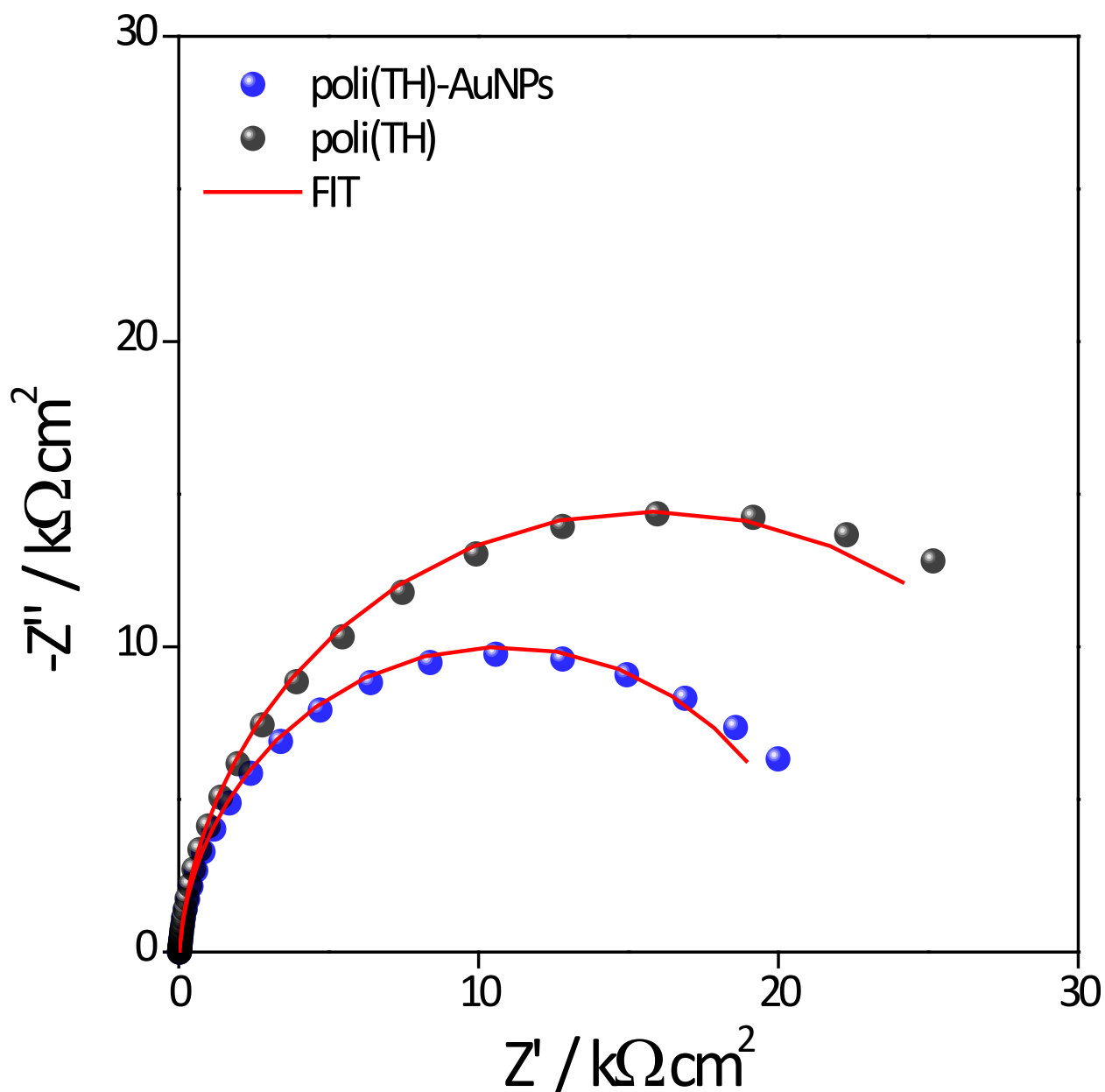
4.2.4.1. Resposta Frente ao Oxigênio Dissolvido

Tendo como objetivo o uso da molécula de oxigênio dissolvido como mediador redox para o imunoensaio eletroquímico para o biomarcador Glut-4, buscou-se avaliar o desempenho eletroquímico do filme nanocompósito frente a reação de redução de oxigênio.

A Figura 61 apresenta o espectro obtido para os filmes de poli(TH)@AuNP e poli(TH) em solução de PBS 0,05 mol L⁻¹ saturado com o gás O₂ no potencial aplicado de -0,30 V (vs.

ECS). Novamente, foi verificada uma menor impedância do sistema para o filme nanocompósito comparado ao filme contendo apenas o polímero de poli(TH).

Figura 61-Espectros de Nyquist para os filmes de poli(TH) e poli(TH)-AuNPs em solução de KCl 0,50 mol L⁻¹ saturada com o gás O₂ aplicando-se potencial de -0,30 V (vs. ECS). 25°C e atmosfera de N₂.



Pela análise do espectro de BODE pode-se observar uma diminuição dos valores de impedância do sistema justamente na região de frequência relacionada à resistência de transferência da interface eletrodo/solução (R_{redox}). Do ponto de vista físico, a diminuição dos valores de ângulo de fase no sentido negativo do eixo-y representa o aumento da tendência

de a corrente atravessar elementos resistivos (resistor $\theta = 0^\circ$) em contraponto com elementos capacitivos (capacitor $\theta = 90^\circ$) (JORCIN et al., 2006). Dessa forma, a presença das nanopartículas de ouro na matriz polimérica ampliou a capacidade do filme de poli(TH) para a reação de redução de oxigênio.

Os espectros também foram analisados aplicando-se os ajustes matemáticos por modelo de circuito equivalente. O modelo utilizado foi o mesmo proposto para o filme na ausência da molécula de oxigênio em solução. Os valores obtidos foram listados na Tabela 10. Novamente, verificou-se um menor valor de R_{redox} para o filme de poli(TH)-AuNPs frente ao eletrodo modificado apenas com o polímero, demonstrando um desempenho superior para a reação de redução de oxigênio.

Tabela 10-Parâmetros impedimétricos determinados a partir de ajustes matemáticos sobre modelo de circuito equivalente. Os erros foram inferiores a 4%.

Eletrodo	R_Ω	R_{ct}	R_{redox}	CPE_{dc}	CPE_{filme}	α_{dc}	α_{filme}
	$(k\Omega\text{ cm}^2)$			$(\mu F\text{ cm}^{-2}\text{ s}^{\alpha-1})$			
Poli(TH)	0,010	0,014	30,6	2,69	25,8	0,95	0,97
Poli(TH)-AuNPs	0,011	0,010	21,1	6,06	24,3	0,96	0,83

Utilizando os valores dos elementos da Tabela 10, buscou-se determinar alguns parâmetros físico-químicos para análise completa do desempenho dos filmes frente a reação de redução de oxigênio. O primeiro parâmetro verificado foi a taxa de transferência eletrônica (k_e). Os valores foram calculados a partir R_{redox} pela relação (Eq. 16) resultando em 0,98 e 0,63 s^{-1} para o filme de poli(TH)-AuNPs e poli(TH), respectivamente. Uma vez que a constante representa a velocidade de processamento da reação (CREAGER; WOOSTER, 1998; ARMSTRONG; WILSON, 2000; BARD; FAULKNER, 2010), ficou evidenciado que a presença das nanopartículas de ouro na matriz polimérica aumenta a taxa de velocidade da reação frente a molécula de oxigênio.

Como discutido anteriormente, os valores de capacitância refletem o incremento da superfície eletroativa do material pela presença das nanopartículas. Para alcançar um resultado quantitativo, calculou-se o valor de superfície de espécie ativa baseando-se nos valores de CPE_{dc} pela relação (Eq. 17-18). Os valores calculados de Γ foram $1,22 \times 10^{-11}$ e 2,85

$\times 10^{-11}$ mol cm^{-2} para os filmes de poli(TH) e poli(TH)-AuNPs, respectivamente. O número de centros redox para reação com oxigênio dissolvido foi superior para o filme nanocompósito.

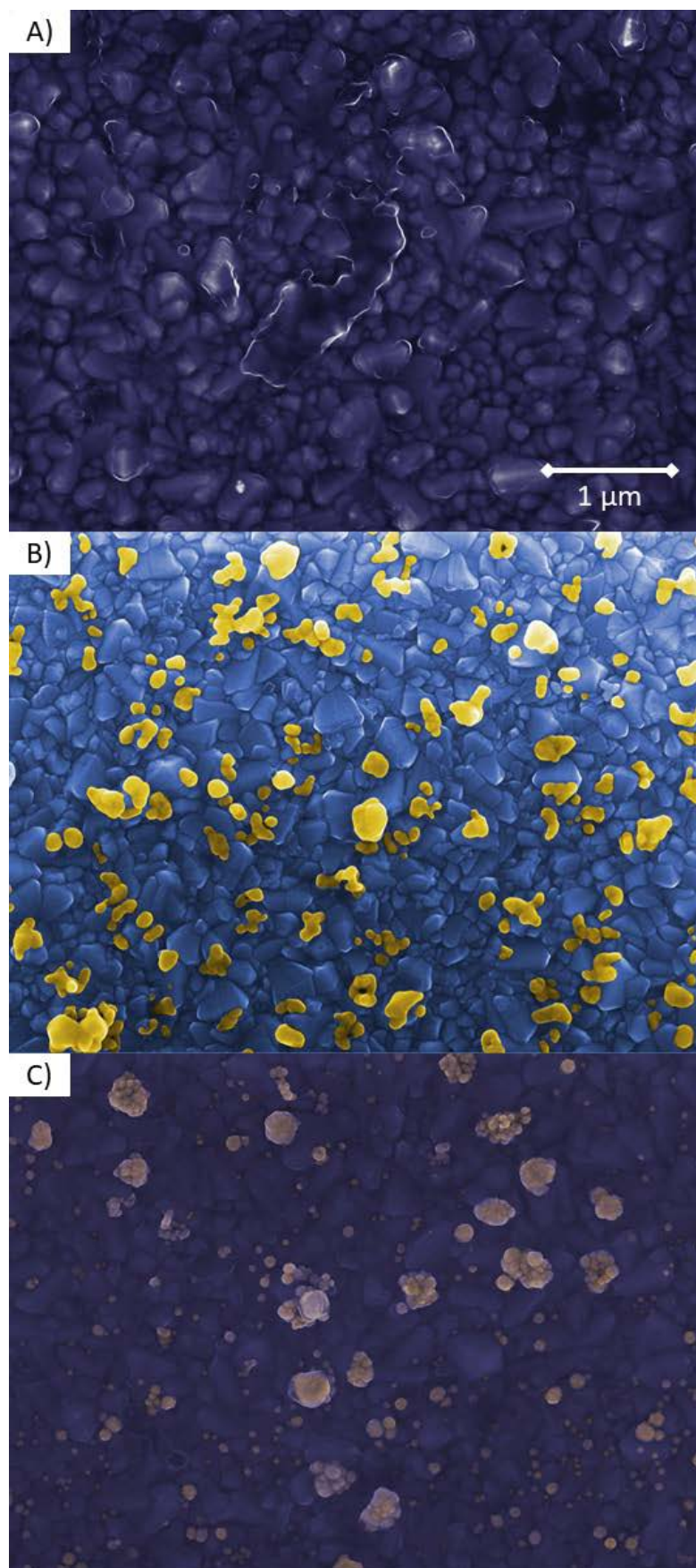
4.2.5. Caracterização morfológica

Para avaliação da estrutura morfológica dos filmes construídos foram realizadas análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para obtenção de imagens para caracterização superficial (Figura 62). Durante a caracterização morfológica buscou-se realizar o comparativo da formação da estrutura de ouro na presença (poli(azo-BBY)-AuNP) e ausência do monômero (AuNP/FTO) na etapa de eletropolimerização.

Durante a análise da Figura 62A foi possível identificar claramente a formação de um filme polimérico fino de poli(TH) recobrindo totalmente a superfície do eletrodo de FTO. O filme polimérico se mostrou fino o suficiente tal que foi possível observar a estrutura cristalina do FTO. Na Figura 62B observou-se a formação de algumas nanoestruturas de ouro dispersas sobre a superfície do eletrodo de FTO sem forma definida.

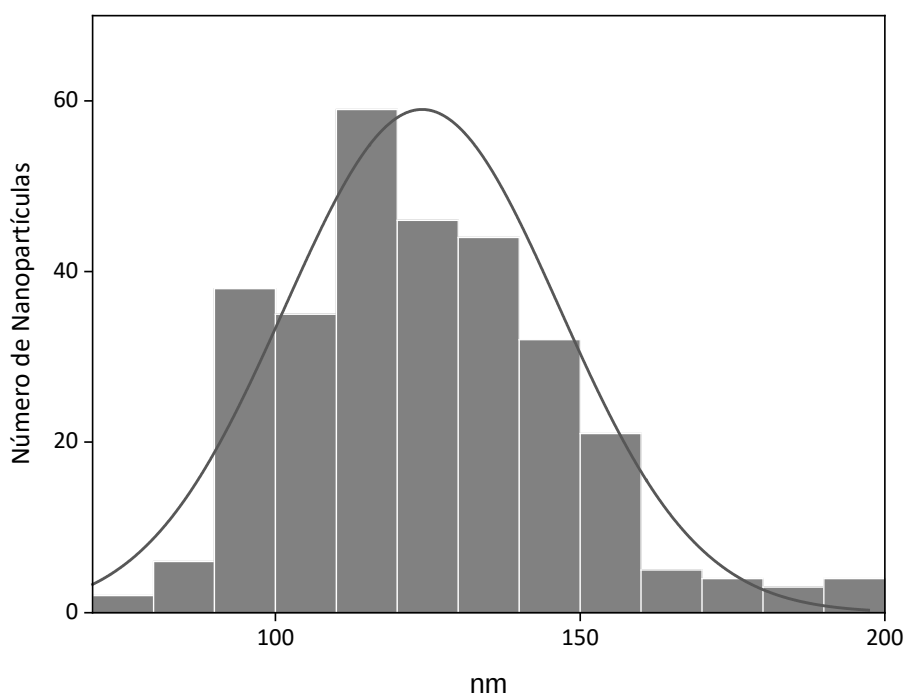
Pela Figura 62C ficou evidente a influência do filme polímero sobre a forma estrutural das nanopartículas. A partir dela foi evidente a presença de nanopartículas de ouro. Algumas maiores, assumindo formas de nanoclusters, enquanto outras de menores dimensões com formas esféricas. Isso foi claro indicativo da presença do filme polimérico para conduzir a estabilização do ouro para sua formação na forma de nanopartículas.

Figura 62-Imagens obtidas através de MEV-FEG para os eletrodos de FTO modificados com o filme de poli(TH) (A), AuNPs (B) e poli(TH)-AuNPs (C).



Baseado na Figura 62C, foram coletados os tamanhos médios das nanopartículas formadas para construção do histograma da Figura 63. A dimensão média das nanopartículas estimada foi de 123 nm.

Figura 63-Histograma para os valores de tamanho médio das nanopartículas presentes na Figura 62C.

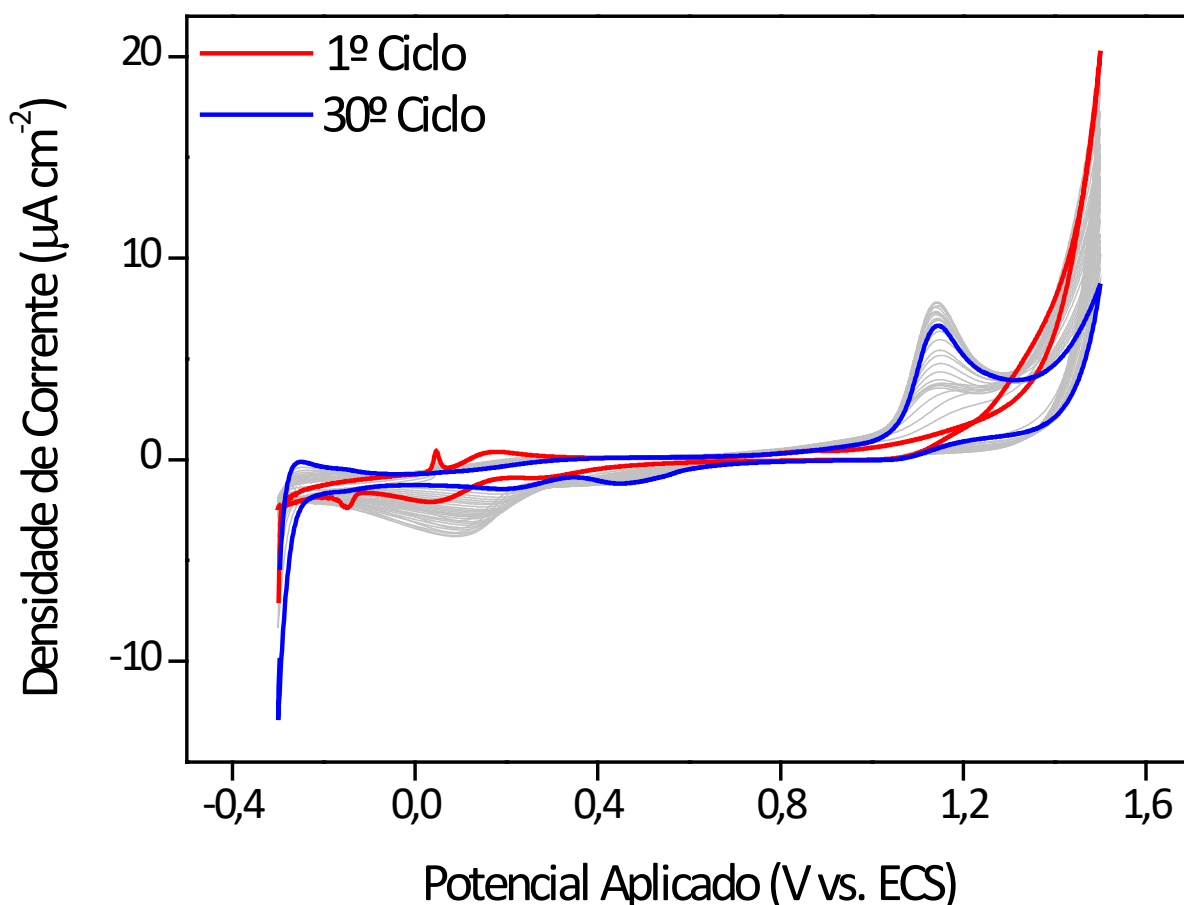


4.2.6. Eletropolimerização sobre eletrodo impresso

Objetivando a realização das análises imunossensoriais, buscou-se avaliar a viabilidade de modificação de um eletrodo impresso com o filme nanocompósito de poli(TH)-AuNP sintetizado. O eletrodo impresso é amplamente utilizado para medidas com volumes em escala de microlitros, sendo esses os volumes ideais de operação em imunoensaios. Apesar de comercialmente existirem eletrodos impressos com o eletrodo de trabalho sendo de FTO, optou-se por utilização de eletrodos impressos onde o eletrodo de trabalho era composto por platina. Essa escolha se deu pela simples disponibilidade desse material em nosso laboratório. Assim, analisou-se a formação do filme nanocompósito sobre substrato de platina, uma vez que a estrutura e composição do substrato pode influenciar de maneira significativa a formação do filme por eletropolimerização (SANTOS et al., 2019; OLEAN-OLIVEIRA et al., 2021).

A Figura 64 apresenta o voltamograma cíclico para a eletropolimerização do filme nanocompósito de poli(TH)-AuNP sobre substrato de platina. Foi verificado uma alteração na forma do voltamograma cíclico, porém, algumas características se mantiveram.

Figura 64-Voltamograma cíclico referente a eletropolimerização do filme de poli(TH)-AuNPs sobre eletrodo impresso (SPE) com eletrodo de trabalho de platina. 25°C e atmosfera de N₂.



Durante o primeiro ciclo foi verificado um primeiro pico anódico característico para a desorção de H da superfície da platina (BARD et al., 2000) seguido do pico anódico referente a oxidação redox do monômero de tionina em solução. Ao contrário do observado em FTO, não foi verificado o pico característico da formação do cátion radical do monômero de tionina ($\text{TH}^{\bullet+}$). Durante a varredura catódica, outra mudança no comportamento foi verificada no potencial de 1,25 V, onde ocorreu o cruzamento das linhas do voltamograma. Esse comportamento é característico para eletropolimerizações de polímeros condutores em superfícies condutoras com taxa de nucleação do polímero lenta (HEINZE et al., 2007). Ou seja,

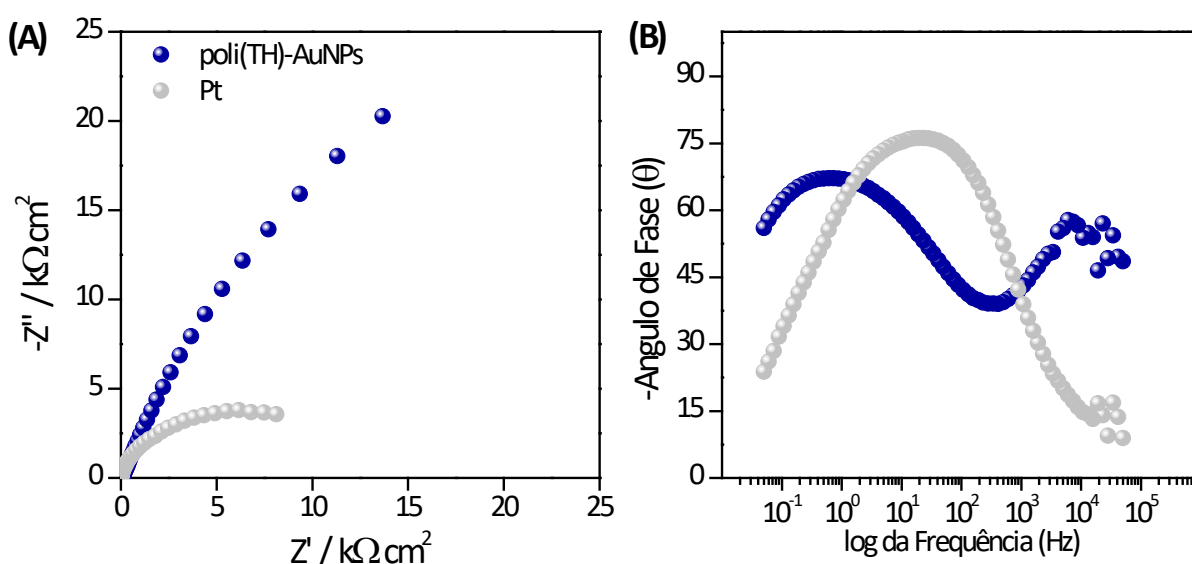
cineticamente a formação do polímero em substrato de platina é desfavorável em relação ao eletrodo de FTO.

Avançando no sentido catódico foi verificado dois picos catódicos sendo o primeiro deles associado a resposta redox do filme de poli(TH), como reportado anteriormente, e o segundo para a adsorção dos átomos de hidrogênio, uma vez que grande parte da superfície da platina ainda se encontrava exposta.

Nos ciclos subsequentes foi verificado a presença do pico anódico referente a formação dos cátions radicais bem como o pico referente para a oxidação das espécies de Au(III) para Au⁰ (KOMSIYSKA; STAIKOV, 2008). A partir desse momento, houve um incremento dos valores de corrente no intervalo de potencial característico da resposta redox da poli(TH), sendo um indicativo da formação do filme nanocompósito sobre o substrato condutor de platina.

A modificação da superfície do eletrodo de platina pelo filme nanocompósito foi confirmada por análise de EIE. A Figura 65 apresenta o espectro de Nyquist e BODE para o eletrodo SPE de platina antes e após a eletropolimerização.

Figura 65-Espectro de Nyquist (A) e BODE (B) obtidos pela resposta do eletrodo de platina antes e após a modificação com o filme nanocompósito de poli(TH)-AuNPs. Solução de PBS 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,4) em atmosfera de N₂ e potencial aplicado de -0,30 V vs. ECS.



Foi verificado um aumento da impedância do sistema pela presença do filme nanocompósito bem como a alteração do comportamento do espectro de BODE, revelando a

presença de uma segunda interface (nanocompósito/eletrodo). Assim, verificou-se que a modificação da superfície de platina com o filme nanocompósito é viável e não afeta significativamente a resposta eletroquímica da plataforma.

4.2.7. Construção e avaliação eletroquímica do immunossensor

Para a construção do imunossensor para Glut-4, optou-se primeiramente pela estratégia de imobilização por adsorção física. Essa estratégia apresenta a vantagem de simplicidade, pois apenas uma etapa é necessária para imobilização dos anticorpos sobre a superfície do eletrodo modificado com o filme nanocompósito.

A Figura 66 apresenta os espectros obtidos antes e após imobilização dos anticorpos sobre a superfície do eletrodo modificado com o filme nanocompósito de poli(TH)-AuNP por adsorção física. O potencial de -0,10 V aplicado foi baseado na resposta eletroquímica do filme nanocompósito frente a molécula de oxigênio dissolvido. Para comprovação da efetiva imobilização dos anticorpos, a superfície do eletrodo modificado foi copiosamente lavada com solução de PBS e uma série de 10 espectros foram realizadas para comprovação da estabilidade do sinal.

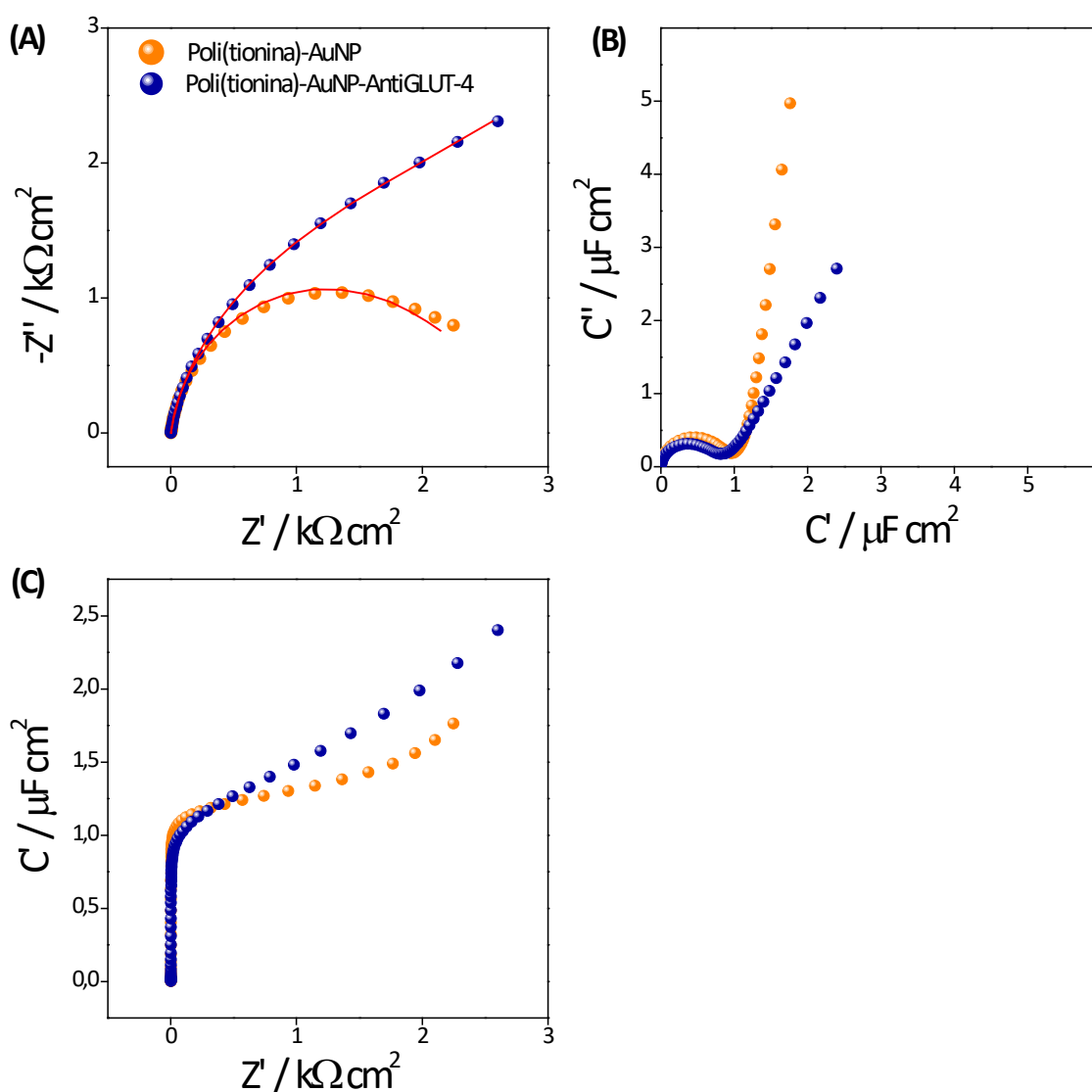
Verificou-se pelo espectro de Nyquist (Figura 66A) um aumento da impedância do sistema caracterizado pelo aumento da dimensão da semicirculo. A análise por modelo de circuito equivalente (Figura 46) permitiu a obtenção dos valores de resistência redox, bem como dos demais elementos que compõe o sistema (Tabela 11). Os valores de R_{redox} apresentaram um aumento de 2,29 para 2,74 $k\Omega\text{ cm}^2$, demonstrando que a superfície foi ocupada parcialmente pelos anticorpos que resultaram na dificuldade de acesso da molécula de oxigênio dissolvido para reação com os sítios do filme de poli(TH).

Tabela 11-Parâmetros impedimétricos determinados a partir de ajustes matemáticos sobre modelo de circuito equivalente para os espectros antes e após modificação com o anticorpo Ab-GLUT-4. Os erros foram inferiores a 4%.

	R_{Ω}	R_{ct}	R_{redox}	CPE_{dc}	CPE_{filme}	α_{dc}	α_{filme}
	(k $\Omega\text{ cm}^2$)			($\mu\text{F cm}^{-2}\text{ s}^{\alpha-1}$)			
Poli(TH)-AuNPs	0,010	0,010	2,29	2,74	179	0,96	0,82
Poli(TH)-AuNPs-Ab-GLUT-4	0,011	0,014	2,74	1,68	155	0,92	0,85

A análise por espectroscopia de capacitância complexa (Figura 66B) apresenta uma diminuição da semicirculo relacionada a capacitância redox. A diminuição da capacitância redox corrobora com os dados verificados por espectro de Nyquist de um recobrimento parcial da superfície do eletrodo modificado após adsorção física do anticorpo de anti-Glut-4.

Figura 66-Espectros obidos para a modificação do filme de poli(TH)-AuNPs antes e após incubação com o anticorpo de GLUT-4. A) Espectro de Nyquist, B) espectro de capacitância complexa e C) gráfico de capacitância versus impedância imaginária.



Por fim, avaliou-se o sistema através do gráfico de impedância real versus capacitância real (Z' versus C'). Essa abordagem permite uma análise qualitativa do comportamento do sistema em função da frequência aplicada (TREVIZAN et al., 2021). Com a diminuição dos valores de frequência é possível acompanhar detalhes da propagação do oxigênio para

camadas mais internas do polímero, revelando detalhes como porosidade e densidade polimérica.

Dessa forma, o filme nanocompósito antes da modificação exibiu três regiões de linearidade. A primeira região é atribuída para o carregamento da capacitância da dupla camada, onde tem-se um aumento da capacitância do filme, mas uma variação quase imperceptível da impedância do sistema. As duas regiões seguintes foram atribuídas a duas regiões contendo diferentes densidades de recobrimento do polímero, destacadas na Figura 66C como região 2 e região 3. Na segunda região verificou-se uma maior contribuição da impedância em comparação a região 3, possivelmente atribuída para uma maior densidade de recobrimento de polímero em comparação com a região 3.

Após a imobilização do anticorpo por adsorção física, verificou-se uma alteração significativa no comportamento do espectro, agora apresentando apenas duas regiões de linearidade. Essa mudança no comportamento do espectro foi correlacionada a presença do anticorpo ancorado sobre a superfície do eletrodo modificado com o filme nanopolimérico, dificuldade de acesso do oxigênio dissolvido para os sítios ativos aumentando a impedância do sistema. Assim, os dados de impedância demonstraram que a modificação da superfície do filme de poli(TH)-AuNP pela estratégia de adsorção física foi efetiva.

4.2.8. Curva analítica

O desempenho do sensor de poli(TH)-AuNP foi analisado frente a diferentes concentrações da molécula de Glut-4 (Figura 67). Para essa etapa foi utilizado como padrão para as adições uma solução de PBS contendo $0,30 \text{ ng ml}^{-1}$ de Glut-4. As medidas de EIE foram conduzidas também em solução de PBS $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 7,40 (25°C) contendo oxigênio saturado em equilíbrio atmosférico.

Como verificado pelo espectro de Nyquist na Figura 67, houve aumento do arco capacitivo do sistema com o aumento da concentração de Glut-4, em decorrência do aumento do bloqueio da superfície após a efetivação da ligação entre o Glut-4 e o sítio de reconhecimento do Ab-Glut-4. A efetividade da ligação altera a superfície por meio do aumento do bloqueio superficial pela presença da molécula de Glut-4, aumentando a dificuldade de acesso das moléculas de oxigênio para os centros redox da poli(TH).

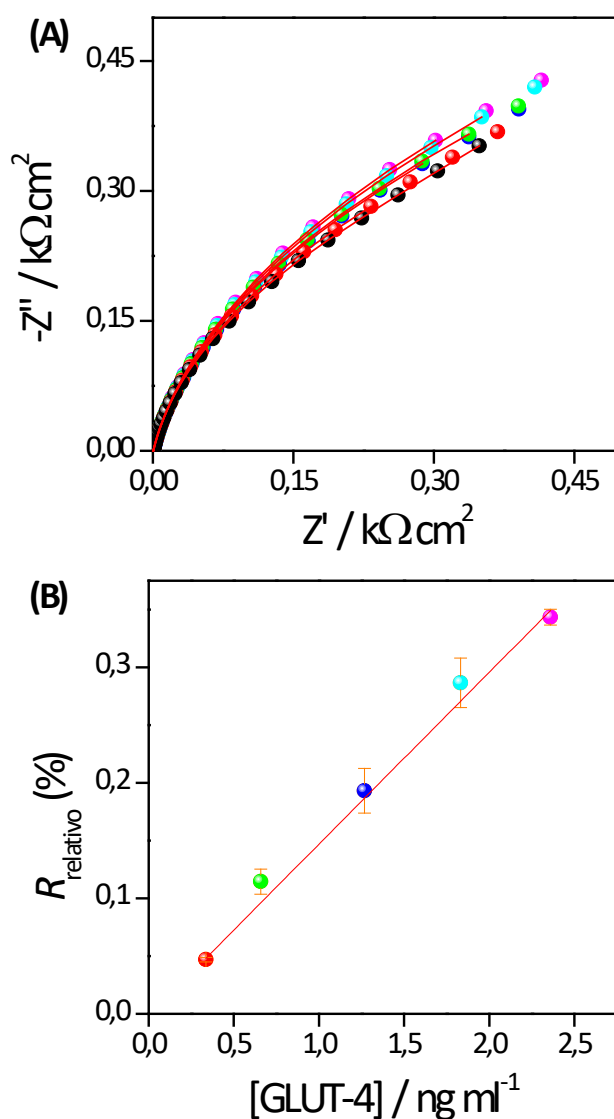
Os espectros foram analisados por modelagem matemática sobre o modelo de circuito equivalente da Figura 67 e a resposta relativa da variação de R_{redox} foi utilizada para construção

da curva analítica apresentado na Figura 67B. A aplicação do logaritmo da concentração de Glut-4 permitiu a obtenção de uma linearidade descrita pela Eq. 31. O valor calculado do limite de detecção de $38,0 \text{ pg mL}^{-1}$

$$R_{\text{relativo}} (\%) = 0,10 + 15,0 \log[\text{GLUT-4} (\text{ng mL}^{-1})] \quad (n = 5; r^2 = 0.9960) \quad (31)$$

Esse resultado demonstra que o imunossensor eletroquímico apresenta potencial para ser aplicado na quantificação do biomarcador de GLUT-4 em amostras reais.

Figura 67-A) Espectros de Nyquist (A) e a respectiva curva analítica (B) para a resposta do imunossensor frente a diferentes concentrações de GLUT-4 em solução de PBS $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,40) em diferentes concentrações contendo O_2 saturado em equilíbrio atmosférico. A barra de erro representa o desvio padrão para o mesmo eletrodo em três diferentes experimentos.



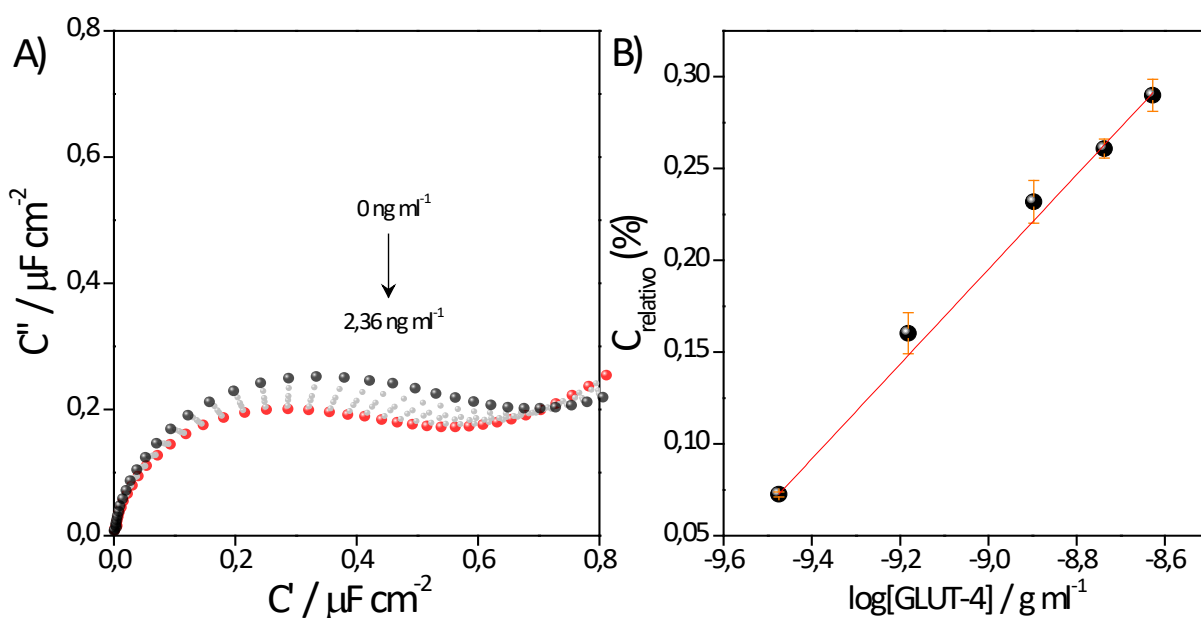
Uma segunda abordagem, baseado nos valores de capacitância redox do sistema (C_{redox}), foi utilizada para construção da curva analítica (Figura 68). Essa abordagem permitiu a visualização mais clara das variações de sinal em função da variação de concentração de GLUT-4. Para obtenção dos valores de C_{relativo} foram normalizados a partir da relação (Eq. 32):

$$C_{\text{relativo}}(\%) = \frac{C_r - C_{r_0}}{C_{r_0}} \times 100 \quad (32)$$

A curva analítica obtida (Figura 68B) apresentou comportamento linear do sinal de C_{relativo} em função do logaritmo da concentração de GLUT-4, de acordo com a equação da reta (Eq. 33):

$$C_{\text{relativo}}(\%) = 2,0 + 25,0 \log[\text{GLUT-4} (\text{g mL}^{-1})] \quad (n = 5; r^2 = 0.9985) \quad (33)$$

Figura 68-A) Espectros de capacitância complexa (A) e sua respectiva curva analítica (B) para a resposta do imunossensor frente a diferentes concentrações de GLUT-4 em solução de PBS 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,40) contendo O₂ saturado em equilíbrio atmosférico. A barra de erro representa o desvio padrão para o mesmo eletrodo em três diferentes experimentos.

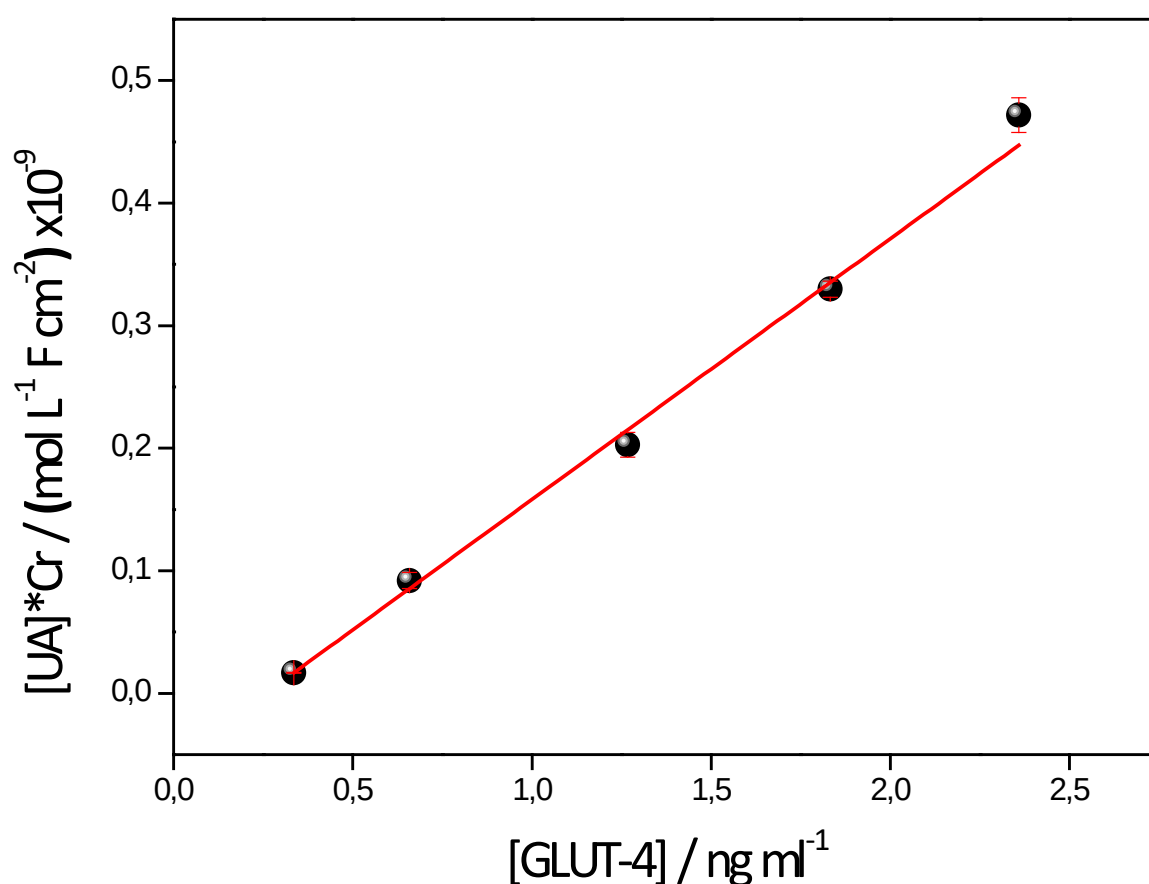


O valor de limite de detecção para o imunossensor de poli(TH)-AuNPs para o GLUT-4 foi de 22,8 pg mL⁻¹. O valor foi calculado segundo recomendação da IUPAC por meio da relação

$3s/\sigma$, onde s é o desvio padrão do branco e σ o valor de coeficiente angular obtido através da curva analítica.

Para verificação da integridade e capacidade de reconhecimento do anticorpo após a sua imobilização sobre o filme nanocompósito, buscou-se avaliar o valor de constante de afinidade (k_d) do imunossensor de poli(TH)-AuNPs (XIA et al., 2013; LANDRY et al., 2015). A **Figura 42** apresenta a isoterma de Langmuir para o imunossensor de poli(TH)-AuNPs baseado nos dados de capacitância redox para cada adição do antígeno.

Figura 69-Relação Linear de [GLUT-4]xCr versus [GLUT-4]. Forma de isoterma de Langmuir usada para o complexo GLUT-4/Ab-GLUT-4.



O valor de constante de afinidade pode ser obtido através modelo de adsorção de Langmuir pela Eq. 34 (KOR; ZAREI, 2016; NISHITANI; SAKATA, 2018).

$$\frac{[\text{GLUT-4}]}{\Delta R} = \frac{[\text{GLUT-4}]}{R_m} + \frac{1}{K_d R_m} \quad (34)$$

ΔR corresponde ao inverso da variação da capacitância redox do sistema ($1/C_R$), R_m é o máximo de sinal e [GLUT-4] a concentração de 5-metilcitosina. Dessa forma, a partir do coeficiente linear do gráfico foi obtido o valor de $(K_d R_m)^{-1}$, e pelo coeficiente angular o valor de R_m^{-1} . O valor calculado de k_d para o presente imunossensor foi de 3,58 L ng⁻¹.

5. Conclusão

5.1. Conclusões Imunossensor para DNA metilado

O presente trabalho apresentou o desenvolvimento de uma nova plataforma imunossensorial baseada em filme nanocompósito composto por polímero condutor redox de Bismarck Brown Y e nanopartículas de ouro. Através da técnica de eletropolimerização, em etapa única, foi obtida uma estrutura molecular tridimensional de nanopartículas de ouro em estrutura de *clusters* de dimensões aproximadas de 250 nm encapsuladas por uma fina camada do azo-polímero.

A análise por técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica permitiu caracterizar os fenômenos interfaciais e comparar o desempenho eletroquímico com o eletrodo composto apenas com o filme de poli(azo-BBY). De fato, a presença das nanopartículas de ouro resultou em aumento do desempenho eletroquímico. Foi alcançado aumento significativo do valor de área eletroativa pela presença das nanopartículas, bem como aumento da constante de transferência eletrônica frente a molécula de oxigênio dissolvido.

Em relação ao desempenho frente a molécula de oxigênio, o filme nanocompósito demonstrou aumento do valor de corrente em uma magnitude de aproximadamente 10 vezes. Foi percebido também uma diminuição do sobrepotencial necessário para a reação. Análise por EIE através de modelo de circuito equivalente também demonstrou diminuição significativa dos valores de resistência de transferência de carga bem como aumento da superfície de área ativa pelos valores de capacitância do sistema.

As características do polímero permitiram a imobilização do anticorpo por meio de formação de ligação covalente utilizando um reagente de ligação cruzada (glutaraldeído). A efetividade da formação da ligação foi comprovada por medidas eletroquímicas, assim como a caracterização de cada etapa da construção do imunossensor.

Com o imunossensor caracterizado, foi realizada a análise de seu desempenho a um padrão de citosina metilada para construção da curva analítica. O imunossensor apresentou

resposta em um intervalo linear de 0,005 a 0,12 ng ml⁻¹ e um limite de detecção de 0,64 pg ml⁻¹. Os resultados foram satisfatórios e superior ao verificado para o kit comercial de referência usados para o presente estudo, uma vez que amostra com menor concentração pode ser utilizadas para a análise.

A constante de ligação também foi avaliada. Por meio da isoterma de Langmuir calculou-se o valor de $K_d = 1,20 \text{ L } \mu\text{mol}^{-1}$, sendo próximo ao valor verificado para o conjunto antígeno-anticorpo 5-mC em solução, demonstrando que a estratégia de imobilização por meio de agente de ligação cruzada não afetou a capacidade de reconhecimento do anticorpo.

Por fim, avaliou-se o imunossensor através da análise de uma amostra real de DNA. O valor de concentração de DNA metilado encontrada teve desvio de apenas 3% em comparação ao determinado pelo Kit comercial. Dessa forma, pode-se concluir que as estratégias e metodologias empregadas na presente tese para o desenvolvimento de um imunossensor para DNA metilado foram satisfatórias, sendo uma alternativa promissora para análise de DNA metilado.

5.2. Conclusões Imunossensor para GLUT-4

O presente trabalho de tese apresentou os resultados do desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico baseado em filme nanocompósito de nanopartículas de ouro recobertas por polimérico condutor redox de tionina para determinação de GLUT-4.

O filme polimérico foi sintetizado por técnica de eletropolimerização utilizando voltametria cíclica. Os parâmetros eletroquímicos para otimização da síntese, como intervalo de potencial aplicado, número de ciclos, velocidade de varredura e eletrólito de suporte foram analisados por meio de espectroscopia de impedância eletroquímica buscando os menores valores de resistência de transferência de carga da interface polímero/solução. Por meio desses estudos, importantes parâmetros foram investigados de forma a contribuir com o estudo de síntese eletroquímica de polímeros condutores.

Após otimização dos parâmetros do filme de poli(TH), foi investigado a construção do material nanocompósito pela introdução da nanopartícula de ouro na matriz polimérica. A síntese do material nanocompósito foi realizada também por eletropolimerização em etapa única. Utilizando MEV-FEG foram obtidas imagens que permitiram verificar que houve o crescimento de nanopartículas na matriz polimérica com dimensões médias de 123 nm.

Por EIE, foi realizado uma análise sistemática comparativa entre os filmes de poli(TH) e poli(TH)-AuNPs, tanto na presença quanto na ausência da molécula de oxigênio dissolvido. Esse estudo permitiu concluir que a presença das nanopartículas na matriz polimérica melhorou o desempenho eletroquímico do filme de poli(TH), aumentando a concentração de centros redox ativos bem como ampliando o sinal eletroquímico para a resposta do polímero frente a molécula de oxigênio dissolvido. A importância da ampliação do sinal eletroquímico frente a molécula de oxigênio teve base na prerrogativa de seu uso como mediador redox substituindo espécies altamente carregadas como ferricianeto.

Modificou-se a superfície do filme nanocompósito desenvolvido com o anticorpo de GLUT-4 pela estratégia de adsorção física. A resposta eletroquímica demonstrou estabilidade e permitiu a construção de uma curva analítica. Por meio da equação da reta obtida através da curva analítica foi possível calcular o valor de limite de detecção de $38,0 \text{ pg ml}^{-1}$. Esse resultado foi satisfatório e demonstra a potencialidade da estratégia desenvolvida para análises quantitativas de amostras contendo GLUT-4.

6. Algumas Perspectivas de Trabalhos Futuros

Algumas análises ainda podem ser realizadas para complementar os estudos do desenvolvimento das plataformas de imunossensoriamento eletroquímico apresentadas na presente tese. Medidas como análise de possíveis interferentes, robustez e possibilidade de reutilização são essenciais, uma vez que se pretende aplicar a tecnologia desenvolvida para análise de amostras reais.

Poderia também ser empregadas mais técnicas de caracterização sobre o nanomaterial desenvolvido. Técnicas como espectroscopia de Raman, microscopia eletrônica de transmissão, microscopia de força atômica, dentre outras, poderiam auxiliar na ampliação do entendimento estrutural dos nanomateriais compósitos sintetizados.

Os interessantes resultados obtidos para os imunossensores poderiam ser estendidos outros imunosistemas visando a identificação de outros marcadores biológicos. Uma vez que os anticorpos apresentam estrutura semelhante, as presentes plataformas poderiam facilmente receber esses novos anticorpos de acordo com a necessidade do pesquisador. Um protocolo geral poderia ser desenvolvido visando o uso em uma variedade de analitos.

REFERÊNCIAS

- A., J. P.; DAIYA, T. The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics. *Science*, v. 293, n. 5532, p. 1068–1070, 10 ago. 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1126/science.1063852>>.
- ABAY, A. et al. *Glutaraldehyde – A Subtle Tool in the Investigation of Healthy and Pathologic Red Blood Cells* *Frontiers in Physiology*, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2019.00514>>.
- ABD-ELWAHED, A.; HOLZE, R. Ion size and size memory effects with electropolymerized polyaniline. *Synthetic Metals*, v. 131, n. 1, p. 61–70, 2002. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379677902001534>>.
- ADÁN-MÁS, A. et al. Application of the Mott-Schottky model to select potentials for EIS studies on electrodes for electrochemical charge storage. *Electrochimica Acta*, v. 289, p. 47–55, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468618319613>>.
- ADEKOLA, K.; ROSEN, S. T.; SHANMUGAM, M. Glucose Transporters in Cancer Metabolism. *Current opinion in oncology*, v. 24, n. 6, p. 650–654, nov. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22913968>>.
- ALEXANDER, C. L.; TRIBOLLET, B.; ORAZEM, M. E. Contribution of Surface Distributions to Constant-Phase-Element (CPE) Behavior: 2. Capacitance. *Electrochimica Acta*, 2016.
- ANDERSON, J. E.; SAWTELLE, S. M. In situ generation and characterization of gold(I) complexes from K[AuCl₄] in aqueous solutions. *Inorganica Chimica Acta*, v. 194, n. 2, p. 171–177, 1992. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020169300826596>>.
- APITZ, D. et al. Conductivity of oriented bis-azo polymer films. *ChemPhysChem*, v. 7, n. 2, p. 468–474, 2006.
- ARMSTRONG, F. A.; WILSON, G. S. Recent developments in faradaic bioelectrochemistry. *Electrochimica Acta*, v. 45, n. 15, p. 2623–2645, 2000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001346860000342X>>.
- ASADI, S. et al. Laser-induced optothermal response of gold nanoparticles: From a physical viewpoint to cancer treatment application. *Journal of Biophotonics*, v. 14, n. 2, p. e202000161, 1 fev. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jbio.202000161>>.

ATANASOV, S. E. et al. Highly Conductive and Conformal Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) Thin Films via Oxidative Molecular Layer Deposition. *Chemistry of Materials*, v. 26, n. 11, p. 3471–3478, 10 jun. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/cm500825b>>.

AUGUSTIN, R. The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life*, v. 62, n. 5, p. 315–333, 1 maio 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/iub.315>>.

AZRI, F. A. et al. *Electrochemical Immunosensor for Detection of Aflatoxin B1 Based on Indirect Competitive ELISA* *Toxins*, 2018. .

BABAIEE, M.; PAKSHIR, M.; HASHEMI, B. Effects of potentiodynamic electropolymerization parameters on electrochemical properties and morphology of fabricated PANI nanofiber/graphite electrode. *Synthetic Metals*, v. 199, p. 110–120, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037967791400397X>>.

BARADOKE, A. et al. Reagentless Redox Capacitive Assaying of C-Reactive Protein at a Polyaniline Interface. *Analytical Chemistry*, v. 92, n. 5, p. 3508–3511, 3 mar. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05633>>.

BARD, A. J. et al. *ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications*. 2ed. ed. [s.l: s.n.]

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. *ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications*. [s.l: s.n.]v. 2

BARRON, C. C. et al. Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis and treatment. *Metabolism*, v. 65, n. 2, p. 124–139, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026049515002991>>.

BARROSSE-ANTLE, L. E. et al. Voltammetry in Room Temperature Ionic Liquids: Comparisons and Contrasts with Conventional Electrochemical Solvents. *Chemistry – An Asian Journal*, v. 5, n. 2, p. 202–230, 1 fev. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/asia.200900191>>.

BARSAN, M. M.; GHICA, M. E.; BRETT, C. M. A. Electrochemical sensors and biosensors based on redox polymer/carbon nanotube modified electrodes: A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 881, p. 1–23, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000326701500238X>>.

BARSAN, M. M.; PINTO, E. M.; BRETT, C. M. A. Electrosynthesis and electrochemical characterisation of phenazine polymers for application in biosensors. *Electrochimica Acta*, v. 53, n. 11, p. 3973–3982, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468607012479>>.

BATZILL, M.; DIEBOLD, U. The surface and materials science of tin oxide. *Progress in Surface Science*, v. 79, n. 2, p. 47–154, 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S007968160500050X>>.

BEN ISHAY, R. et al. Multiple functionalization of tungsten disulfide inorganic nanotubes by covalently grafted conductive polythiophenes. *RSC Advances*, v. 6, n. 92, p. 89585–89598, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C6RA19628D>>.

BINDER, C. et al. Deregulated Simultaneous Expression of Multiple Glucose Transporter Isoforms in Malignant Cells and Tissues. *Anticancer research*, v. 17, n. 6D, p. 4299–4304, 1997. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/9494524>>.

BONANNI, A.; VALLE, M. Analytica Chimica Acta Use of nanomaterials for impedimetric DNA sensors : A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 678, n. 1, p. 7–17, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2010.08.022>>.

BREDAS, J. L.; STREET, G. B. Polarons, bipolarons, and solitons in conducting polymers. *Accounts of Chemical Research*, v. 18, n. 10, p. 309–315, 1 out. 1985. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ar00118a005>>.

BÜTTIKER, M.; THOMAS, H.; PRÊTRE, A. Mesoscopic capacitors. *Physics Letters A*, v. 180, n. 4, p. 364–369, 1993. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0375960193911939>>.

BYERLY, T. C. *Handbook of Biological Data*. [s.l: s.n.]v. 118

BYZOVA, N. A. et al. Less is More: A Comparison of Antibody–Gold Nanoparticle Conjugates of Different Ratios. *Bioconjugate Chemistry*, v. 28, n. 11, p. 2737–2746, 15 nov. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00489>>.

CALVO, M. B. et al. Potential Role of Sugar Transporters in Cancer and Their Relationship with Anticancer Therapy. *International Journal of Endocrinology*, v. 2010, p. 205357, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2010/205357>>.

CAMPUZANO, S. et al. Opportunities, Challenges, and Prospects in Electrochemical Biosensing of Circulating Tumor DNA and Its Specific Features. *Sensors (Basel, Switzerland)*, v. 19, n. 17, p. 3762, 30 ago. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31480367>>.

CAO, Y.; DONG, Y. Electrochemical aptasensor for multi-antibiotics detection based on endonuclease and exonuclease assisted dual recycling amplification strategy. *Talanta*, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.10.016>>.

CHAKRABORTY, A. et al. Electrochemical estimation of active site density on a metal-free carbon-based catalyst. *RSC Advances*, v. 9, n. 1, p. 466–475, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C8RA08906J>>.

CHEN, A. X. et al. Beyond Stretchability: Strength, Toughness, and Elastic Range in Semiconducting Polymers. *Chemistry of Materials*, v. 32, n. 18, p. 7582–7601, 22 set. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.0c03019>>.

CHEN, F. et al. Gold nanoparticles to enhance ophthalmic imaging. *Biomaterials Science*, v. 9, n. 2, p. 367–390, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/D0BM01063D>>.

CHEUNG, D. T.; NIMNI, M. E. Mechanism of Crosslinking of Proteins by Glutaraldehyde I: Reaction with Model Compounds. *Connective Tissue Research*, v. 10, n. 2, p. 187–199, 1 jan. 1982. Disponível em: <<https://doi.org/10.3109/03008208209034418>>.

CHINNADAYYALA, S. R.; CHO, S. *Electrochemical Immunosensor for the Early Detection of Rheumatoid Arthritis Biomarker: Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibody in Human Serum Based on Avidin-Biotin System* *Sensors*, 2021. .

CHIU, M. L. et al. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies (Basel, Switzerland)*, v. 8, n. 4, p. 55, 3 dez. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31816964>>.

CHO, I.-H. et al. *Current Technologies of Electrochemical Immunosensors: Perspective on Signal Amplification* *Sensors*, 2018. .

CINCOTTO, F. H. et al. A new disposable microfluidic electrochemical paper-based device for the simultaneous determination of clinical biomarkers. *Talanta*, v. 195, p. 62–68, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914018311731>>.

CONGUR, G.; EKSIN, E.; ERDEM, A. Electrochimica Acta Impedimetric Detection of microRNA

at Graphene Oxide Modified Sensors. *Electrochimica Acta*, v. 172, p. 20–27, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2015.03.210>>.

CREAGER, S. E.; WOOSTER, T. T. A New Way of Using ac Voltammetry To Study Redox Kinetics in Electroactive Monolayers. *Analytical Chemistry*, v. 70, n. 20, p. 4257–4263, 1 out. 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ac980482l>>.

DAVIES, C. Chapter 1.3 - Immunoassay Performance Measures. In: WILD, D. B. T.-T. I. H. (FOURTH E. (Ed.). Oxford: Elsevier, 2013a. p. 11–26.

DAVIES, C. Chapter 2.1 - Principles of Competitive and Immunometric Assays (Including ELISA)1. In: WILD, D. B. T.-T. I. H. (FOURTH E. (Ed.). Oxford: Elsevier, 2013b. p. 29–59.

DE PAULI, M. et al. Capacitance spectra extracted from EIS by a model-free generalized phase element analysis. *Electrochimica Acta*, 2019.

DENG, H. et al. A new strategy for label-free electrochemical immunoassay based on “gate-effect” of β -cyclodextrin modified electrode. *Analytica Chimica Acta*, v. 926, p. 48–54, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267016304937>>.

DESHPANDE, M. V.; AMALNERKAR, D. P. Biosensors prepared from electrochemically-synthesized conducting polymers. *Prog. Polym. Sci.*, v. 18, p. 623–649, 1993.

DUDIN, P. V; UNWIN, P. R.; MACPHERSON, J. V. Electrochemical Nucleation and Growth of Gold Nanoparticles on Single-Walled Carbon Nanotubes: New Mechanistic Insights. *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 114, n. 31, p. 13241–13248, 12 ago. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jp1043706>>.

ĐUROVIĆ, M. D. et al. Studies on the reactions of $[\text{AuCl}_4]^-$ with different nucleophiles in aqueous solution. *Dalton Transactions*, v. 43, n. 23, p. 8620–8632, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C4DT00247D>>.

ESSOUSI, H. et al. An Electrochemical Sensor Based on Reduced Graphene Oxide, Gold Nanoparticles and Molecular Imprinted Over-oxidized Polypyrrole for Amoxicillin Determination. *Electroanalysis*, v. 32, n. 7, p. 1546–1558, 1 jul. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/elan.201900751>>.

FAN, Y. et al. A paper-based electrochemical immunosensor with reduced graphene oxide/thionine/gold nanoparticles nanocomposites modification for the detection of cancer

antigen 125. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 135, p. 1–7, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566319302787>>.

FEIL, R. Environmental and nutritional effects on the epigenetic regulation of genes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 600, n. 1, p. 46–57, 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510706001722>>.

FEIL, R.; FRAGA, M. F. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nature Reviews Genetics*, v. 13, n. 2, p. 97–109, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrg3142>>.

FERGUSON, M. A.; VAIDYA, V. S. *Biomarkers: An Evolutionary Perspective* Biomarkers: Wiley Online Books., 20 set. 2010. . Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/9780470918562.ch1>>.

FERNANDES, F. C. B. et al. Label free redox capacitive biosensing. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013.

FREGER, V. Diffusion impedance and equivalent circuit of a multilayer film. *Electrochemistry Communications*, v. 7, n. 9, p. 957–961, 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388248105001992>>.

FREITAS DE FREITAS, L. et al. An Overview of the Synthesis of Gold Nanoparticles Using Radiation Technologies. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, v. 8, n. 11, p. 939, 15 nov. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30445694>>.

GAO, S.; GUIÁN, J. M.; ROCHA-MARTIN, J. Oriented immobilization of antibodies onto sensing platforms - A critical review. *Analytica Chimica Acta*, v. 1189, p. 338907, 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267021007339>>.

GE, Y. et al. How to measure and report the capacity of electrochemical double layers, supercapacitors, and their electrode materials. *Journal of Solid State Electrochemistry*, v. 24, n. 11, p. 3215–3230, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10008-020-04804-x>>.

GILLESPIE, P.; LADAME, S.; O'HARE, D. Molecular methods in electrochemical microRNA detection. *Analyst*, v. 144, n. 1, p. 114–129, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C8AN01572D>>.

GUALDESI, M. S. et al. Thionine in the design of new photosensitizers: Bromination and

vehiculization in polymeric nanoparticles. *Journal of Molecular Liquids*, v. 310, p. 113247, 2020. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167732219371314>>.

GUO, S.; WANG, E. Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, v. 598, n. 2, p. 181–192, 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000326700701238X>>.

GUTIÉRREZ PINEDA, E. et al. Electrochemical Preparation and Characterization of Polypyrrole/Stainless Steel Electrodes Decorated with Gold Nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 7, n. 4, p. 2677–2687, 4 fev. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/am507733b>>.

HAN, J. et al. Conducting polymer-noble metal nanoparticle hybrids: Synthesis mechanism application. *Progress in Polymer Science*, v. 70, p. 52–91, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670017300837>>.

HANKIN, A. et al. Flat band potential determination: Avoiding the pitfalls. *Journal of Materials Chemistry A*, 2019.

HASSANPOUR, S.; HASANZADEH, M. Label-free electrochemical-immunoassay of cancer biomarkers: Recent progress and challenges in the efficient diagnosis of cancer employing electroanalysis and based on point of care (POC). *Microchemical Journal*, v. 168, p. 106424, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X21005087>>.

HEIMBÖCKEL, R.; HOFFMANN, F.; FRÖBA, M. Insights into the influence of the pore size and surface area of activated carbons on the energy storage of electric double layer capacitors with a new potentially universally applicable capacitor model. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 21, n. 6, p. 3122–3133, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C8CP06443A>>.

HEINZE, J. et al. On the origin of the so-called nucleation loop during electropolymerization of conducting polymers. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 111, n. 5, p. 989–997, 2007.

HOSSAIN, T. et al. Biosensors and Bioelectronics Electrochemical biosensing strategies for DNA methylation analysis. *Biosensors and Bioelectronic*, v. 94, n. November 2016, p. 63–73, 2017.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2017.02.026>>.

HOU, C. et al. Potentiostatic electrodeposition of gold nanoparticles: variation of electrocatalytic activity toward four targets. *Journal of Applied Electrochemistry*, v. 51, n. 12, p. 1721–1730, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10800-021-01604-7>>.

HU, F. et al. *PEDOT-Based Conducting Polymer Actuators* *Frontiers in Robotics and AI*, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/frobt.2019.00114>>.

HU, Q. et al. Anion Layering and Steric Hydration Repulsion on Positively Charged Surfaces in Aqueous Electrolytes. *ChemPhysChem*, v. 18, n. 21, p. 3056–3065, 3 nov. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/cphc.201700865>>.

HUANG, J. et al. Graphical analysis of electrochemical impedance spectroscopy data in Bode and Nyquist representations. *Journal of Power Sources*, v. 309, p. 82–98, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpowsour.2016.01.073>>.

HUANG, Q. et al. A dual enzymatic-biosensor for simultaneous determination of glucose and cholesterol in serum and peritoneal macrophages of diabetic mice: Evaluation of the diabetes-accelerated atherosclerosis risk. *Analytica Chimica Acta*, v. 707, n. 1–2, p. 135–141, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.09.003>>.

HUNTER, D. J. Gene–environment interactions in human diseases. *Nature Reviews Genetics*, v. 6, n. 4, p. 287–298, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrg1578>>.

HUO, H. Y.; LUO, H. Q.; LI, N. B. Electrochemical sensor for heparin based on a poly(thionine) modified glassy carbon electrode. *Microchimica Acta*, v. 167, n. 3, p. 195, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00604-009-0240-5>>.

INAGAKI, C. S.; OLIVEIRA, M. M.; ZARBIN, A. J. G. Direct and one-step synthesis of polythiophene/gold nanoparticles thin films through liquid/liquid interfacial polymerization. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 516, p. 498–510, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979718300924>>.

ISLAM, N. et al. Biosensors and Bioelectronics Optical biosensing strategies for DNA methylation analysis. *Biosensors and Bioelectronic*, v. 92, n. August 2016, p. 668–678, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.10.034>>.

IZQUIERDO, J.; KRANZ, C. Electrochemical techniques for investigating redox active

macromolecules. *European Polymer Journal*, v. 83, p. 428–449, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305716304384>>.

JARRETT, K. et al. "Sickle Cell Anemia: Tracking down a Mutation": An Interactive Learning Laboratory That Communicates Basic Principles of Genetics and Cellular Biology. *Advances in physiology education*, v. 40, n. 1, p. 110–115, mar. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26873898>>.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics*, v. 3, n. 6, p. 415–428, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrg816>>.

JORCIN, J.-B. et al. CPE analysis by local electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta*, v. 51, n. 8, p. 1473–1479, 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468605008285>>.

K, N.; ROUT, C. S. Conducting polymers: a comprehensive review on recent advances in synthesis, properties and applications. *RSC Advances*, v. 11, n. 10, p. 5659–5697, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/D0RA07800J>>.

KARIMI-MALEH, H. et al. A critical review on the use of potentiometric based biosensors for biomarkers detection. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 184, p. 113252, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095656632100289X>>.

KARUNANITHY, R.; HOLLAND, T.; SIVAKUMAR, P. Influence of Glutaraldehyde's Molecular Transformations on Spectroscopic Investigations of Its Conjugation with Amine-Modified Fe₃O₄ Microparticles in the Reaction Medium. *Langmuir*, v. 37, n. 17, p. 5242–5251, 4 maio 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c00182>>.

KIM, J.; PARK, M. *Recent Progress in Electrochemical Immunosensors Biosensors*, 2021. .

KIZLING, M. et al. Gold nanoparticles in bioelectrocatalysis – The role of nanoparticle size. *Current Opinion in Electrochemistry*, v. 12, p. 113–120, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2451910318300826>>.

KOMSIYSKA, L.; STAIKOV, G. Electrocrystallization of Au nanoparticles on glassy carbon from HClO₄ solution containing [AuCl₄][−]. *Electrochimica Acta*, v. 54, n. 2, p. 168–172, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468608010177>>.

KONDZIOR, M.; GRABOWSKA, I. *Antibody-Electroactive Probe Conjugates Based Electrochemical Immunosensors*, 2020. .

KOR, K.; ZAREI, K. Development and characterization of an electrochemical sensor for furosemide detection based on electropolymerized molecularly imprinted polymer. *Talanta*, v. 146, p. 181–187, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.08.042>>.

KOSTJUKOVA, L. O.; LEONTIEVA, S. V; KOSTJUKOV, V. V. TD-DFT/DFT study of thionine in aqueous solution: Vibronic absorption spectrum and electronic properties. *Optik*, v. 242, p. 167156, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003040262100824X>>.

KOZUCH, S.; MARTIN, J. M. L. “Turning Over” Definitions in Catalytic Cycles. *ACS Catalysis*, v. 2, n. 12, p. 2787–2794, 7 dez. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/cs3005264>>.

KRAMER, H.; WINDRUM, G. M. THE METACHROMATIC STAINING REACTION. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 3, n. 3, p. 227–237, 1 maio 1955. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/3.3.227>>.

KREJCOVA, L. et al. Biosensors and Bioelectronics Current trends in electrochemical sensing and biosensing of DNA methylation. *Biosensors and Bioelectronic*, v. 97, n. May, p. 384–399, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2017.06.004>>.

KUNTAMUNG, K.; JAKMUNEE, J.; OUNNUNKAD, K. A label-free multiplex electrochemical biosensor for the detection of three breast cancer biomarker proteins employing dye/metal ion-loaded and antibody-conjugated polyethyleneimine-gold nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 9, n. 33, p. 6576–6585, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/D1TB00940K>>.

KUZIN, Y. I. et al. Electrochemistry of new derivatives of phenothiazine: Electrode kinetics and electropolymerization conditions. *Electrochimica Acta*, v. 375, p. 137985, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468621002759>>.

LACH, P. et al. “gate Effect” in p-Syneprine Electrochemical Sensing with a Molecularly Imprinted Polymer and Redox Probes. *Analytical Chemistry*, v. 91, n. 12, p. 7546–7553, 2019.

LANDRY, J. P. et al. Measuring Affinity Constants of 1450 Monoclonal Antibodies to Peptide Targets with a Microarray-Based Label-Free Assay Platform. *Journal of immunological*

methods, v. 417, p. 86–96, fev. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25536073>>.

LANGE, U.; MIRSKY, V. M. Chemiresistors based on conducting polymers: A review on measurement techniques. *Analytica Chimica Acta*, v. 687, n. 2, p. 105–113, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2010.11.030>>.

LARSSON, L.; CASTILHO, R. M.; GIANNOBILE, W. V. Epigenetics and Its Role in Periodontal Diseases: A State-of-the-Art Review. *Journal of Periodontology*, v. 86, n. 4, p. 556–568, 1 abr. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1902/jop.2014.140559>>.

LASIA, A. Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications. In: CONWAY, B. E.; BOCKRIS, J. O.; WHITE, R. E. (Ed.). *Modern Aspects of Electrochemistry*. Boston, MA: Springer US, 2002. p. 143–248.

LASIA, A. *Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications*. 1. ed. New York: Springer-Verlag New York, 2014.

LE, H. T. N.; PARK, J.; CHO, S. A Probeless Capacitive Biosensor for Direct Detection of Amyloid Beta 1-42 in Human Serum Based on an Interdigitated Chain-Shaped Electrode *Micromachines*, 2020. .

LE, T.-H.; KIM, Y.; YOON, H. *Electrical and Electrochemical Properties of Conducting Polymers* *Polymers*, 2017. .

LEE, J. W.; CHOI, S.-R.; HEO, J. H. Simultaneous Stabilization and Functionalization of Gold Nanoparticles via Biomolecule Conjugation: Progress and Perspectives. *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 13, n. 36, p. 42311–42328, 15 set. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acsami.1c10436>>.

LEONARD, N. D. et al. Deconvolution of Utilization, Site Density, and Turnover Frequency of Fe–Nitrogen–Carbon Oxygen Reduction Reaction Catalysts Prepared with Secondary N-Precursors. *ACS Catalysis*, v. 8, n. 3, p. 1640–1647, 2 mar. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acscatal.7b02897>>.

LILLYCROP, K. A.; BURDGE, G. C. Maternal diet as a modifier of offspring epigenetics. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, v. 6, n. 2, p. 88–95, 2015. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/article/maternal-diet-as-a-modifier-of-offspring>>.

epigenetics/FE72FFF08204EBEE05F047A53B498696>.

LOEWE, L.; HILL, W. G. The population genetics of mutations: good, bad and indifferent. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 365, n. 1544, p. 1153–1167, 27 abr. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0317>>.

LOHSE, S. E.; MURPHY, C. J. The Quest for Shape Control: A History of Gold Nanorod Synthesis. *Chemistry of Materials*, v. 25, n. 8, p. 1250–1261, 23 abr. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/cm303708p>>.

LU, Z. et al. One pot synthesis of dandelion-like polyaniline coated gold nanoparticles composites for electrochemical sensing applications. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 525, p. 86–96, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979718304508>>.

LUO, H. et al. Nanoarchitected Porous Conducting Polymers: From Controlled Synthesis to Advanced Applications. *Advanced Materials*, v. 33, n. 29, p. 2007318, 1 jul. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/adma.202007318>>.

MAHBUBUR RAHMAN, M.; LEE, J.-J. Sensitivity control of dopamine detection by conducting poly(thionine). *Electrochemistry Communications*, v. 125, p. 107005, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388248121000898>>.

MAKARAVICIUTE, A.; RAMANAVICIENE, A. Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 50, p. 460–471, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566313004570>>.

MARTIN, C. S.; OLEAN-OLIVEIRA, A.; TEIXEIRA, M. F. S. A new polymeric thin film by using electropolymerization: thin film of poly(phenazine-salen) obtained from 2,2'-[1,2-ethanediylbis(nitrilomethylidyne)]-bis[4-amino-phenol]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 873, p. 114404, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572665720306317>>.

MARYS, N. et al. Formation Of Thin Film Electropolymerized Phenothiazine Material e Métodos Resultados e Discussão The polymerization occurs through the. v. 395, n. 1c, p. 1999, 1999.

MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H. N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin.

Toxicology and Applied Pharmacology, v. 195, n. 3, p. 298–308, 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X03004952>>.

MAYET, N. et al. *Probing the Surface of Noble Metals Electrochemically by Underpotential Deposition of Transition Metals Surfaces*, 2019. .

MCBRAYER, S. K. et al. Multiple myeloma exhibits novel dependence on GLUT4, GLUT8, and GLUT11: implications for glucose transporter-directed therapy. *Blood*, v. 119, n. 20, p. 4686–4697, 17 maio 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-377846>>.

MERA, K. et al. Glutaraldehyde is an effective cross-linker for production of antibodies against advanced glycation end-products. *Journal of Immunological Methods*, v. 334, n. 1, p. 82–90, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022175908000550>>.

MERINO, E.; RIBAGORDA, M. Control over molecular motion using the cis-trans photoisomerization of the azo group. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, v. 8, p. 1071–1090, 2012.

MIGNEAULT, I. et al. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, v. 37, n. 5, p. 790–802, 1 nov. 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.2144/04375RV01>>.

MOHD RADZUAN, N. A.; SULONG, A. B.; SAHARI, J. A review of electrical conductivity models for conductive polymer composite. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 42, n. 14, p. 9262–9273, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.045>>.

MONTERO-CALLE, A. et al. Versatile Electroanalytical Bioplatforms for Simultaneous Determination of Cancer-Related DNA 5 - Methyl- and 5 - Hydroxymethyl-Cytosines at Global and Gene-Specific Levels in Human Serum and Tissues. 2019.

MUHAMAD, N. B.; KHAIRUL, W. M.; YUSOFF, F. Synthesis and characterization of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) functionalized graphene with gold nanoparticles as a potential oxygen reduction electrocatalyst. *Journal of Solid State Chemistry*, v. 275, p. 30–37, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022459619301719>>.

NAKAYAMA, M. et al. Electrochemical synthesis of a nanohybrid film consisting of stacked graphene sheets and manganese oxide as oxygen evolution reaction catalyst. *RSC Advances*,

2016.

NARESH, V.; LEE, N. *A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors*, 2021. .

NAVALE, A. M.; PARANJAPÉ, A. N. Glucose Transporters: Physiological and Pathological Roles. *Biophysical reviews*, v. 8, n. 1, p. 5–9, mar. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28510148>>.

NEUMANN, M. G.; RODRIGUES, M. R. The mechanism of the photoinitiation of the polymerization of MMA by the thionine-triethanolamine system. *Polymer*, v. 39, n. 8, p. 1657–1661, 1998. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386197004606>>.

NISHITANI, S.; SAKATA, T. Potentiometric Adsorption Isotherm Analysis of a Molecularly Imprinted Polymer Interface for Small-Biomolecule Recognition. *ACS Omega*, v. 3, n. 5, p. 5382–5389, 31 maio 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00627>>.

NOGUCHI, Y. et al. Expression of Facilitative Glucose Transporters in Gastric Tumors. *Hepato-gastroenterology*, v. 46, n. 28, p. 2683–2689, 1999. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/10522065>>.

OHSAKA, T.; TANAKA, K.; TOKUDA, K. Electrocatalysis of poly(thionine)-modified electrodes for oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, n. 3, p. 222–224, 1993. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C39930000222>>.

OLDE DAMINK, L. H. H. et al. Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 6, n. 8, p. 460–472, 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF00123371>>.

OLEAN-OLIVEIRA, A. et al. A Chemiresistor Sensor Based on Azo-Polymer and Graphene for Real-Time Monitoring of Mitochondrial Oxygen Consumption. *ACS Sensors*, v. 4, n. 1, 2019a.

OLEAN-OLIVEIRA, A. et al. Synergistic effect of reduced graphene oxide/azo-polymer layers on electrochemical performance and application as nonenzymatic chemiresistor sensors for detecting superoxide anion radicals. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 852, 2019b.

OLEAN-OLIVEIRA, A. et al. A Chemiresistor Sensor Based on Azo-Polymer and Graphene for

Real-Time Monitoring of Mitochondrial Oxygen Consumption. *ACS Sensors*, v. 4, n. 1, p. 118–125, 25 jan. 2019c. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acssensors.8b01013>>.

OLEAN-OLIVEIRA, A. et al. *Nanocomposite Materials Based on Electrochemically Synthesized Graphene Polymers: Molecular Architecture Strategies for Sensor Applications* *Chemosensors*, 2021. .

OLEAN-OLIVEIRA, A.; MONTEIRO SERAPHIM, P.; TEIXEIRA, M. F. S. Methylated DNA impedimetric immunosensor based on azo-polymer-AuNPs dots and 5-methylcytosine antibody using dissolved oxygen as a redox probe. *Electrochemistry Communications*, v. 136, p. 107242, 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388248122000443>>.

OLEAN-OLIVEIRA, A.; OLIVEIRA BRITO, G. A.; TEIXEIRA, M. F. S. Mechanism of Nanocomposite Formation in the Layer-by-Layer Single-Step Electropolymerization of π -Conjugated Azopolymers and Reduced Graphene Oxide: An Electrochemical Impedance Spectroscopy Study. *ACS Omega*, 2020.

OLEAN-OLIVEIRA, A.; OLIVEIRA BRITO, G.; TEIXEIRA, M. Mechanism of Nanocomposite Formation in the Layer-by-Layer Single-Step Electropolymerization of π -Conjugated Azopolymers and Reduced Graphene Oxide: An Electrochemical Impedance Spectroscopy Study. *ACS Omega*, v. 5, n. 40, p. 25954–25967, [s.d.]

OLEAN-OLIVEIRA, A.; TEIXEIRA, M. F. S. Development of a nanocomposite chemiresistor sensor based on π -conjugated azo polymer and graphene blend for detection of dissolved oxygen. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 271, n. March, p. 353–357, 2018a. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400518310372>>.

OLEAN-OLIVEIRA, A.; TEIXEIRA, M. F. S. Development of a nanocomposite chemiresistor sensor based on Π -conjugated azo polymer and graphene blend for detection of dissolved oxygen. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 271, 2018b.

ORAZEM, M. E.; PÉBÈRE, N.; TRIBOLLET, B. Enhanced Graphical Representation of Electrochemical Impedance Data. *Journal of The Electrochemical Society*, v. 153, n. 4, p. B129, 2006. Disponível em: <<http://jes.ecsdl.org/cgi/doi/10.1149/1.2168377>>.

ORAZEM, M. E.; TRIBOLLET, B. A tutorial on electrochemical impedance spectroscopy.

ChemTexts, v. 6, n. 2, p. 12, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40828-020-0110-7>>.

PACHECO, J. C.; OLEAN-OLIVEIRA, A.; TEIXEIRA, M. F. S. Understanding the Performance of a Nanocomposite Based on a Conjugated Azo-Polymer and Reduced Graphene Oxide with Photoelectrically Switchable Properties by Analyzing the Potential Profile during Photocurrent Generation. *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 221, n. 18, p. 2000225, 1 set. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/macp.202000225>>.

PAL, A. et al. Development of an impedimetric immunosensor for machine learning-based detection of endometriosis: A proof of concept. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 346, p. 130460, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400521010285>>.

PARK, C. et al. Stress, epigenetics and depression: A systematic review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 102, p. 139–152, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763418309576>>.

PAULIUKAITE, R. et al. Phenazines and Polyphenazines in Electrochemical Sensors and Biosensors. *Analytical Letters*, v. 43, n. 10–11, p. 1588–1608, 6 jul. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00032711003653791>>.

PAULSEN, B. D.; FRISBIE, C. D. Dependence of Conductivity on Charge Density and Electrochemical Potential in Polymer Semiconductors Gated with Ionic Liquids. *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 116, n. 4, p. 3132–3141, 2 fev. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jp2093934>>.

PEARSON, C. E.; EDAMURA, K. N.; CLEARY, J. D. Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nature Reviews Genetics*, v. 6, n. 10, p. 729–742, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrg1689>>.

POTTS, J. R. et al. Graphene-based polymer nanocomposites. *Polymer*, 2011.

POVEDANO, E. et al. Electrochemical affinity biosensors for fast detection of gene-specific methylations with no need for bisulfite and amplification treatments. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 6418, 2018a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-018-24902-1>>.

POVEDANO, E. et al. Rapid Electrochemical Assessment of Tumor Suppressor Gene

Methylations in Raw Human Serum and Tumor Cells and Tissues Using Immunomagnetic Beads and Selective DNA Hybridization. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 57, n. 27, p. 8194–8198, 2 jul. 2018b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/anie.201804339>>.

POVEDANO, E. et al. Amperometric Bioplatforms To Detect Regional DNA Methylation with Single-Base Sensitivity. *Analytical Chemistry*, v. 92, n. 7, p. 5604–5612, 7 abr. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00628>>.

QIAO, J.; QI, L. Recent progress in plant-gold nanoparticles fabrication methods and bio-applications. *Talanta*, v. 223, p. 121396, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914020306871>>.

QIN, L. et al. “Gold rush” in modern science: Fabrication strategies and typical advanced applications of gold nanoparticles in sensing. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 359, p. 1–31, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854517305118>>.

QIU, L. et al. Polypyrrole nanotube-supported gold nanoparticles: An efficient electrocatalyst for oxygen reduction and catalytic reduction of 4-nitrophenol. *Applied Catalysis A: General*, v. 413–414, p. 230–237, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926860X11006740>>.

RAHMATI, Z. et al. An electrochemical immunosensor using SARS-CoV-2 spike protein-nickel hydroxide nanoparticles bio-conjugate modified SPCE for ultrasensitive detection of SARS-CoV-2 antibodies. *Microchemical Journal*, v. 170, p. 106718, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X21008043>>.

RAJAKUMARA, E. et al. Mechanistic insights into the recognition of 5-methylcytosine oxidation derivatives by the SUVH5 SRA domain. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 20161, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/srep20161>>.

RAMANAVICIUS, S.; RAMANAVICIUS, A. *Conducting Polymers in the Design of Biosensors and Biofuel Cells* Polymers , 2021. .

RANDRIAMAHAZAKA, H.; ASAKA, K. Electromechanical analysis by means of complex capacitance of bucky-gel actuators based on single-walled carbon nanotubes and an ionic liquid. *Journal of Physical Chemistry C*, 2010.

RANDVIIR, E. P.; BANKS, C. E. Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications. *Analytical Methods*, v. 5, n. 5, p. 1098–1115, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C3AY26476A>>.

REN, Y.; ZHOU, G. Rediscovering Mott-Schottky plots: A knee-point in the plot for passive films on chromium. *Journal of the Electrochemical Society*, 2017.

REVERBERI, R.; REVERBERI, L. Factors Affecting the Antigen-Antibody Reaction. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*, v. 5, n. 4, p. 227–240, nov. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19204779>>.

ROY, R. et al. *Biomarkers in Cancer* Biomarkers: Wiley Online Books., 20 set. 2010. . Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/9780470918562.ch14>>.

RUDOLPH, M.; RATCLIFF, E. L. Normal and inverted regimes of charge transfer controlled by density of states at polymer electrodes. *Nature Communications*, v. 8, n. 1, p. 1048, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41467-017-01264-2>>.

RUSSO, M. J. et al. Antifouling Strategies for Electrochemical Biosensing: Mechanisms and Performance toward Point of Care Based Diagnostic Applications. *ACS Sensors*, v. 6, n. 4, p. 1482–1507, 23 abr. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acssensors.1c00390>>.

SABATÉ DEL RÍO, J. et al. An antifouling coating that enables affinity-based electrochemical biosensing in complex biological fluids. *Nature Nanotechnology*, v. 14, n. 12, p. 1143–1149, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41565-019-0566-z>>.

SAHALIANOV, I. et al. The intrinsic volumetric capacitance of conducting polymers: pseudo-capacitors or double-layer supercapacitors? *RSC Advances*, v. 9, n. 72, p. 42498–42508, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C9RA10250G>>.

SAMADI PAKCHIN, P. et al. Electrochemical immunosensor based on chitosan-gold nanoparticle/carbon nanotube as a platform and lactate oxidase as a label for detection of CA125 oncomarker. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 122, p. 68–74, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566318307012>>.

SANTOS, C. da C. et al. Electropolymerization of phenol and aniline derivatives: Synthesis, characterization and application as electrochemical transducers. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2019.

SCHAGDARSURENGIN, U.; STEGER, K. Epigenetics in male reproduction: effect of paternal diet on sperm quality and offspring health. *Nature Reviews Urology*, v. 13, n. 10, p. 584–595, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrurol.2016.157>>.

SHAMSPUR, T. et al. An Electrochemical Immunosensor Based on Poly(Thionine)-Modified Carbon Paste Electrode for the Determination of Prostate Specific Antigen. *IEEE Sensors Journal*, v. 18, n. 12, p. 4861–4868, 2018.

SHAO, B.; XIAO, Z. Recent achievements in exosomal biomarkers detection by nanomaterials-based optical biosensors - A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 1114, p. 74–84, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267020302336>>.

SHEN, Q. et al. Electrochemical DNA sensor-based strategy for sensitive detection of DNA demethylation and DNA demethylase activity. *Analytica Chimica Acta*, v. 934, p. 66–71, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267016308005>>.

SINDEN, R. R.; WELLS, R. D. DNA structure, mutations, and human genetic disease. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 3, n. 6, p. 612–622, 1992. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0958166992900054>>.

SINGH, R. K. et al. Electrochemical Impedance Spectroscopy of Oxygen Reduction Reaction (ORR) in a Rotating Disk Electrode Configuration: Effect of Ionomer Content and Carbon-Support. *Journal of the Electrochemical Society*, v. 162, n. 6, p. F489–F498, 2015. Disponível em: <<http://jes.ecsdl.org/cgi/doi/10.1149/2.0141506jes>>.

SKINNER, M. K.; GUERRERO-BOSAGNA, C.; HAQUE, M. M. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of sperm epimutations promote genetic mutations. *Epigenetics*, v. 10, n. 8, p. 762–771, 3 ago. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1062207>>.

STILWELL, D. E.; PARK, S. Electrochemistry of Conductive Polymers: V. In Situ Spectroelectrochemical Studies of Polyaniline Films. *Journal of The Electrochemical Society*, v. 136, n. 2, p. 427–433, 1989. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1149/1.2096649>>.

STRIMBU, K.; TAVEL, J. A. What Are Biomarkers? *Current opinion in HIV and AIDS*, v. 5, n. 6, p. 463–466, nov. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20978388>>.

STRONG, M. E. et al. Faradaic electrochemical impedance spectroscopy for enhanced analyte

detection in diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 177, p. 112949, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566320309349>>.

SUNDFORS, F.; BOBACKA, J. EIS study of the redox reaction of Fe(CN)₆^{3-/4-} at poly(3,4-ethylenedioxythiophene) electrodes: influence of dc potential and cOx:cRed ratio. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 572, n. 2, p. 309–316, 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022072803007939>>.

SUTHERLAND, J. E.; COSTA, M. A. X. Epigenetics and the Environment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 983, n. 1, p. 151–160, 1 mar. 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb05970.x>>.

TALEAT, Z. et al. Trends in Analytical Chemistry Detection strategies for methylated and hypermethylated DNA. v. 66, p. 80–89, 2015.

TAYLOR 6TH, J. G. et al. Mutations and Polymorphisms in Hemoglobin Genes and the Risk of Pulmonary Hypertension and Death in Sickle Cell Disease. *American journal of hematology*, v. 83, n. 1, p. 6–14, jan. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17724704>>.

TEIXEIRA, M. F. S.; BARSAN, M. M.; BRETT, C. M. A. Molecular engineering of a π -conjugated polymer film of the azo dye Bismarck Brown Y. *RSC Adv.*, v. 6, n. 103, p. 101318–101322, 2016a. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C6RA20335C>>.

TEIXEIRA, M. F. S.; BARSAN, M. M.; BRETT, C. M. A. Molecular engineering of a π -conjugated polymer film of the azo dye Bismarck Brown Y. *RSC Adv.*, v. 6, n. 103, p. 101318, 2016b.

TEPALE, N. et al. *Nanoengineering of Gold Nanoparticles: Green Synthesis, Characterization, and Applications Crystals*, 2019. .

THORENS, B.; MUECKLER, M. Glucose transporters in the 21st Century. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 298, n. 2, p. E141–E145, 15 dez. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00712.2009>>.

TIAN, B. et al. Ultrasensitive determination of mercury ions using a glassy carbon electrode modified with nanocomposites consisting of conductive polymer and amino-functionalized graphene quantum dots. *Microchimica Acta*, v. 187, n. 4, p. 210, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00604-020-4191-1>>.

TOPÇU, E.; ALANYALIOĞLU, M. Electrochemical formation of poly(thionine) thin films: The

effect of amine group on the polymeric film formation of phenothiazine dyes. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 131, n. 1, 5 jan. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/app.39686>>.

TOPÇU, E.; ALANYALIOĞLU, M. Electrochemical formation of poly(thionine) thin films: The effect of amine group on the polymeric film formation of phenothiazine dyes. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 131, n. 1, p. 1–9, 2014.

TREVIZAN, H. F. et al. Development of a Molecularly Imprinted Polymer for Uric Acid Sensing Based on a Conductive Azopolymer: Unusual Approaches Using Electrochemical Impedance/Capacitance Spectroscopy Without a Soluble Redox Probe. *Sensors and Actuators B: Chemical*, p. 130141, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400521007103>>.

TRILLING, A. K.; ZUILHOF, H. Antibody orientation on biosensor surfaces : a minireview. p. 1619–1627, 2013.

UNNIKRISHNAN, A. et al. The role of DNA methylation in epigenetics of aging. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 195, p. 172–185, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725818301980>>.

UYGUN, Z. O.; ERTUĞRUL UYGUN, H. D. A short footnote: Circuit design for faradaic impedimetric sensors and biosensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 2014.

VANOYE, L. et al. Insights in the aerobic oxidation of aldehydes. *RSC Advances*, v. 3, n. 41, p. 18931–18937, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C3RA42385A>>.

VASHIST, S. K.; LUONG, J. H. T. Chapter 1 - Immunoassays: An Overview. In: VASHIST, S. K.; LUONG, J. H. T. B. T.-H. OF I. T. (Ed.). [s.l.] Academic Press, 2018. p. 1–18.

VELÁZQUEZ-MANZANARES, M. et al. Electrochemical Behavior of Simetryn Herbicide at Water|1,2-Dichloroethane Interface. *Journal of The Electrochemical Society*, v. 166, n. 8, p. H286–H290, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1149/2.0481908jes>>.

VON HAUFF, E. Impedance Spectroscopy for Emerging Photovoltaics. *Journal of Physical Chemistry C*, 2019.

WANG, J.-G. et al. In-situ plasmonic tracking oxygen evolution reveals multistage oxygen diffusion and accumulating inhibition. *Nature Communications*, v. 12, n. 1, p. 2164, 2021.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41467-021-22434-3>>.

WANG, J. et al. Electrochemical Oxidation and Determination of Glucose in Alkaline Media Based on Au (111)-Like Nanoparticle Array on Indium Tin Oxide Electrode. *Electrochimica Acta*, v. 138, p. 174–186, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468614013164>>.

WEI, F.; LILLEHOJ, P. B.; HO, C.-M. DNA Diagnostics: Nanotechnology-Enhanced Electrochemical Detection of Nucleic Acids. *Pediatric Research*, v. 67, n. 5, p. 458–468, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181d361c3>>.

WELCH, N. G. et al. Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays (Review). *Biointerphases*, v. 12, n. 2, p. 02D301, 16 mar. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1116/1.4978435>>.

WILD, D.; DAVIES, C. Chapter 1.2 - Immunoassay for Beginners. In: WILD, D. B. T.-T. I. H. (FOURTH E. (Ed.)). Oxford: Elsevier, 2013. p. 7–10.

WOLFART, F. et al. Electrochemical supercapacitive properties of polypyrrole thin films: influence of the electropolymerization methods. *Journal of Solid State Electrochemistry*, v. 20, n. 4, p. 901–910, 2016.

WU, A. H. B. A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, v. 369, n. 2, p. 119–124, 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898106002075>>.

WU, Y.; ZHANG, B.; GUO, L. Label-Free and Selective Photoelectrochemical Detection of Chemical DNA Methylation Damage Using DNA Repair Enzymes. 2013.

XIA, N.; HAO, Y. Recent Progress in Electrochemical Biosensors for Detection of DNA Methylation and Methyltransferase Activity. v. 14, p. 1843–1854, 2019.

XIA, Y. et al. The Constant Region Affects Antigen Binding of Antibodies to DNA by Altering Secondary Structure. *Molecular immunology*, v. 56, n. 1–2, p. 28–37, nov. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23665381>>.

YIN, H. et al. Electrochemical biosensor for DNA demethylase detection based on demethylation triggered endonuclease BstUI and Exonuclease III digestion. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 66, p. 266–270, 2015. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566314009154>>.

ZAIDI, S. A.; SHAHZAD, F.; BATOOL, S. Progress in cancer biomarkers monitoring strategies using graphene modified support materials. *Talanta*, v. 210, p. 120669, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914019313025>>.

ZHANG, C. et al. An oriented antibody immobilization based electrochemical platform for detection of leptin in human with different body mass index. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 353, p. 131074, 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400521016427>>.

ZHANG, M. et al. Recent advances in the synthesis and applications of graphene–polymer nanocomposites. *Polym. Chem.*, v. 6, n. 34, p. 6107–6124, 2015. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C5PY00777A>>.

ZHAO, M. et al. Electrochemical polymerization: an emerging approach for fabricating high-quality luminescent films and super-resolution OLEDs. *Journal of Materials Chemistry C*, v. 8, n. 16, p. 5310–5320, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C9TC07028A>>.

ZHOU, Y. et al. Enzyme-based electrochemical biosensor for sensitive detection of DNA demethylation and the activity of DNA demethylase. *Analytica Chimica Acta*, v. 840, p. 28–32, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267014007533>>.

ZHU, B. et al. Biosensors and Bioelectronics Distinguishing cytosine methylation using electrochemical , label-free detection of DNA hybridization and ds-targets. v. 64, p. 74–80, 2015.

ZHU, B.; TRAVAS-SEJDIC, J. PNA versus DNA in electrochemical gene sensing based on conducting polymers : study of charge and surface blocking effects on the sensor signal †. p. 687–694, 2018.

ZOZOULENKO, I. et al. Polarons, Bipolarons, And Absorption Spectroscopy of PEDOT. *ACS Applied Polymer Materials*, v. 1, n. 1, p. 83–94, 11 jan. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acsapm.8b00061>>.