

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CURSO DE DOUTORADO EM QUÍMICA – ASSOCIAÇÃO AMPLA

UEL/UEPG/UNICENTRO

CLEVERSON SIQUEIRA SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE DIFERENTES DISPOSITIVOS ELETROQUÍMICOS A
BASE DE OURO APLICADOS COMO SENSORES E BIOSSENSORES**

PONTA GROSSA

2016

CLEVERSON SIQUEIRA SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE DIFERENTES DISPOSITIVOS ELETROQUÍMICOS A
BASE DE OURO APLICADOS COMO SENSORES E BIOSSENSORES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química – Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, da Universidade Estadual de Ponta Grossa para a obtenção do título de Doutor em Química Inorgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Christiana Andrade Pessôa

Ponta Grossa

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

S237 Santos, Cleverson Siqueira
Desenvolvimento de diferentes
dispositivos eletroquímicos a base de ouro
aplicados como sensores e biossensores/
Cleverson Siqueira Santos. Ponta Grossa,
2016.
138f.

Tese (Doutorado em Química - Área de
Concentração: Química Inorgânica),
Universidade Estadual de Ponta Grossa,
Universidade Estadual de Londrina e
Universidade Estadual do Centro-Oeste.
Orientadora: Prof^a Dr^a Christiana
Andrade Pessoa.

1.PAMAM-G4. 2.3-MPA. 3.Biossensor.
4.Carbaril. 5.Imunossensor. I.Pessoa,
Christiana Andrade. II. Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Universidade
Estadual de Londrina. Universidade
Estadual do Centro-Oeste. Doutorado em
Química. III. T.

CDD: 543

TERMO DE APROVAÇÃO

CLEVERSON SIQUEIRA SANTOS

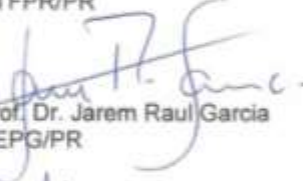
"DESENVOLVIMENTO DE DIFERENTES DISPOSITIVOS ELETROQUÍMICOS A
BASE DE OURO APLICADOS COMO SENSORES E BIOSSENSORES."

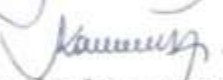
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientador:


Prof.^a Dr.^a Christiana Andrade Pessoa
UEPG/PR


Prof. Dr. Luis Fernando Marchesi
UTFPR/PR


Prof. Dr. Jarem Raul Garcia
UEPG/PR


Prof.^a Dr.^a Karen Wohnrath
UEPG/PR


Prof. Dr. Marcio Fernando Bergamini
UFRR/PR

Ponta Grossa, 6 de maio de 2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado o privilégio e a oportunidade de aprender e aprender a ensinar.

A Prof^a. Dr^a. Christiana Andrade Pessoa, pela orientação, confiança, autonomia, apoio e incentivo a minha formação profissional. Com certeza, a sua metodologia de ensino e orientação é um exemplo a ser repassado adiante.

Aos professores Dr^a. Karen Wohnrath, Dr. Jarem Raul Garcia, Dr. Sergio Toshio Fujiwara, Dr. Luís Fernando Q. P. Marchesi por apoiar e colaborar com as pesquisas desenvolvidas em nosso grupo e estarem prontamente dispostos a ajudar.

A aluna de iniciação científica Valéria Pawlak pelo árduo trabalho e contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os meus amigos e colegas de trabalho que fazem parte do grupo de pesquisa GDEM em especial a Gisele, Dhésmon e Ellen.

Aos professores membros da banca examinadora Dr^a. Karen Wohnrath, Dr. Jarem Raul Garcia, Dr. Luís Fernando Q. P. Marchesi e Dr. Marcio Fernando Bergamini pela aceitação e valiosa contribuição para o aprimoramento deste trabalho.

A minha querida esposa Francine pelo carinho, compreensão, apoio e incentivo.

A CAPES pela bolsa e todo apoio financeiro concedido.

Aos demais que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho e tornaram esses anos de doutorado mais felizes.

SE EU MORRER ANTES DE VOCÊ

“Se eu morrer antes de você, faça-me um favor:

Chore o quanto quiser, mas não brigue com Deus por ele ter me levado

Se não quiser chorar, não chore;

Se não conseguir chorar, não se preocupe;

Se tiver vontade de rir, ria;

Se alguns amigos contarem algum fato a meu respeito, ouça e acrescente sua versão;

Se me elogiarem demais, corrija o exagero.

Se me criticarem demais, defenda-me;

Se me quiserem fazer um santo, só porque morri, mostre que eu tinha um pouco de santo, mas estava muito longe de ser o santo que me pintam;

Se me quiserem fazer um demônio, mostre que eu talvez tivesse um pouco de demônio, mas que eu tentei ser bom e amigo...

E se tiver vontade de escrever alguma coisa sobre mim, diga apenas uma frase: -"Foi um bom amigo!" Aí, então derrame uma lágrima.

Eu não estarei presente para enxugá-la, mas não faz mal. Outros amigos farão isso no meu lugar. Gostaria de dizer que viva como quem sabe que vai morrer um dia, e que morra como quem soube viver direito...”

José Fernandes de Oliveira

Texto adaptado.

RESUMO

Esta tese descreve a preparação, caracterização e aplicação de sensores e biossensores eletroquímicos, utilizando diferentes técnicas de modificação baseadas no Au como transdutor. O biossensor enzimático aplicado na detecção do pesticida carbaril foi construído sobre um eletrodo de ouro funcionalizado com uma monocamada do dendrímero poliamidoamina de quarta geração com núcleo de cistamina (PAMAM-G4), sobre o qual foi imobilizada com o auxílio de glutaraldeído a enzima acetilcolinesterase (AChE). Após avaliar e determinar as melhores condições de imobilização da enzima AChE (concentração de GLUT 1% (v/v) e concentração de unidades enzimáticas 496 U. mL⁻¹) sobre a monocamada de PAMAM, a atividade catalítica da enzima AChE imobilizada foi avaliada por cronoamperometria na presença do substrato enzimático (AChI) obtendo-se o $K_M^{app} = 2,9 \text{ mmol. L}^{-1}$. A resposta do biossensor na detecção de carbaril foi baseada na inibição da atividade enzimática causada pelo pesticida. Foi constatado que 5 min de imersão na solução do pesticida foram suficientes para que os sítios ativos da enzima fossem bloqueados. Após determinar as melhores condições de construção do biossensor, este foi aplicado na detecção de carbaril na faixa de 1,0 a 9,0 $\mu\text{mol. L}^{-1}$. Os limites de detecção e quantificação encontrados foram de 0,0108 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ e 0,032 $\mu\text{mol. L}^{-1}$, respectivamente. No segundo capítulo é relatado o desenvolvimento de um imunossensor aplicado na detecção qualitativa de anticorpos (AB) *T. cruzi*. O sensor foi construído sobre eletrodo de ouro modificado com o tiol ácido 3-mercaptopropiônico (MPA) e sobre esta superfície foram imobilizados covalentemente pela reação com EDC e NHS, os antígenos (AG) *T. cruzi*. A influência da concentração da solução de AG e do tempo de imersão nesta solução para a construção do imunossensor foram avaliadas utilizando as técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ e os resultados demonstraram que as melhores condições foram: tempo de 15 min e concentração de 0,5 g. L⁻¹. Os possíveis sítios de ligações não específicas foram bloqueados com albumina de soro bovino (BSA). O tempo de imersão na solução de AB também foi avaliado. Os resultados mostraram que 30 min são suficientes para que todos os sítios de ligações específicos fossem ocupados pelos AB *T. cruzi*. Testes de seletividade na ausência de AB, apenas em amostra de soro e também na presença de AB de *Toxoplasma* foram realizados. Os resultados demonstraram que o imunossensor é seletivo, pois este apresentou valores de resistência de transferência de carga (Rct) na detecção de AB *T. cruzi* 70% maiores do que na detecção dos possíveis interferentes. Portanto, o imunossensor apresenta-se como uma alternativa no diagnóstico qualitativo de tripanossomíase americana. No terceiro capítulo é descrito a modificação de eletrodos de carbono grafite (CG) obtidos de pilhas secas de zinco/carbono com micropartículas de Au obtidas pela eletrodeposição potencioestática. As variáveis envolvidas no processo de eletrodeposição, tais como concentração do sal de ouro, potencial e tempo de deposição foram avaliadas e otimizadas utilizando a técnica de voltametria cíclica na presença do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. As melhores condições foram: tempo de 700 s, potencial de +0,3 V e concentração de 10,0 mmol. L⁻¹. Nestas condições, foram obtidas partículas de Au esféricas com tamanho médio de 420 nm, as quais se apresentaram homoganeamente dispersas sobre toda a superfície do eletrodo de CG e promoveram o aumento da área eletroativa, (o eletrodo CG apresentou uma área de 0,12 cm² e o eletrodo CG/Au uma área 0,25 cm²). O desempenho do eletrodo CG/Au foi avaliado na separação e quantificação de dopamina e ácido úrico presentes em uma mistura. Os resultados voltamétricos demonstraram que o sensor CG/Au é seletivo, pois apresentou separação de potencial pico de 370 mV entre as duas espécies. Os limites de detecção e quantificação encontrados foram de 1,86 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ e 6,09 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ para dopamina, e 17,5 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ e 58,5 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ para ácido úrico, respectivamente. A partir dos resultados obtidos para os três dispositivos eletroquímicos desenvolvidos pode-se concluir que a elevada condutividade elétrica, estabilidade química, biocompatibilidade, possibilidade de miniaturização na forma de microestruturas e a facilidade de funcionalização dos eletrodos de Au fazem destes matrizes condutoras apropriadas para construção de sensores e particularmente biossensores eletroquímicos.

Palavras chaves: PAMAM-G4, 3-MPA, biossensor, carbaril, imunossensor, tripanossomíase americana, carbono grafite, eletrodeposição, ouro, dopamina, ácido úrico.

ABSTRACT

This thesis describes the preparation, characterization and application of electrochemical sensors and biosensors, using different modification techniques, based on Au as transducer. The enzymatic biosensor applied on the detection of pesticide carbaryl was built on a gold electrode functionalized with a monolayer of polyamidoamine dendrimer of fourth generation with a cystamine core (PAMAM-G4) on which it was immobilized the acetylcholinesterase enzyme (AChE), with the aid of glutaraldehyde. After evaluate and determine the best conditions for immobilization of the AChE enzyme (glutaraldehyde concentration of 1% (v/v) and the concentration of enzyme units 496 U. mL⁻¹) on the monolayer of PAMAM, the catalytic activity of the enzyme was evaluated by chronoamperometry in presence of enzymatic substrate AChI obtaining $K_M^{app} = 2.9 \text{ mmol. L}^{-1}$. The biosensor response for carbaryl detection was based on the inhibition of the enzymatic activity caused by the pesticide. It was verified that 5 min in the pesticide solution is sufficient to block the enzyme active sites. After determining the best conditions for the construction of the biosensor, it was applied for carbaryl detection in the concentration range from 1.0 to 9.0 $\mu\text{mol. L}^{-1}$. The detection and quantification limits were found to be 0.0108 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ and 0.032 $\mu\text{mol. L}^{-1}$, respectively. In the second chapter, it is reported the development of an immunosensor applied to qualitative detection of antibodies (AB) *T. cruzi*. The sensor was built on gold electrode modified with the thiol 3-mercaptopropionic acid (MPA) and the antigens (AG) *T. cruzi* were covalently immobilized on this surface by the reaction with EDC and NHS. The influence of concentration and of immersion time in the AG solution were evaluated using the techniques of cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy in presence of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ and the results showed that the best conditions were immersion time of 15 minutes and AG concentration of 0.5 g. L⁻¹. The possible sites of non-specific binding were blocked with bovine serum albumin (BSA). The immersion time in the solution (AB) was also evaluated and the results showed that 30 minutes are sufficient for all specific bonds sites were occupied by AB *T. cruzi*. Selectivity tests in the absence of AB, only in the serum sample, and in the presence of AB *Toxoplasma* were performed. The results demonstrated that the immunosensor is selective, since it presented charge transfer resistance (R_{ct}) values in the presence of AB *T. cruzi* 70% higher than the R_{ct} values in presence of possible interferences. Therefore, the immunosensor presents itself as an alternative to qualitative diagnosis of american trypanosomiasis. In the third chapter, it is reported the modification of carbon graphite electrodes (CG) obtained from dry batteries zinc/carbon with Au microparticles obtained by potentiostatic electrodeposition. The variables involved in the electrodeposition process, such as the gold salt concentration, time and deposition potential were evaluated and optimized using cyclic voltammetry technique in the presence of redox couple $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. The best conditions for the Au deposition were electrodeposition time of 700 s, potential of +0.3 V and concentration of 10.0 mmol. L⁻¹. In these conditions, Au spherical particles were obtained with an average size of 420 nm, which were homogeneously deposited on the surface of GC electrode and promoted the increase of the electroactive area (GC electrode showed an area of 0.12 cm² and GC/Au electrode presented an area of 0.25 cm²). The GC/Au electrode was applied for the separation and quantification of dopamine and uric acid present in a mixture. The voltammetric results showed that the GC/Au sensor is selective, once the potential peak separation between the DA and UA species was 370 mV. The detection and quantification limits were found to be 1.86 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ and 6.09 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ for dopamine and uric acid 17.5 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ and 58.5 $\mu\text{mol. L}^{-1}$, respectively. In the development of the three electrochemical devices gold electrodes were used. From the results obtained for the three developed electrochemical devices it can be concluded that high electric conductivity, chemical stability, biocompatibility, ability to miniaturization in the form of microstructures and ease of functionalization of Au electrodes make them suitable conductive matrixes for construction of electrochemical sensors and particularly biosensors.

Keywords: PAMAM-G4, 3-MPA, SAM, carbaryl, immunosensor, american trypanosomiasis, carbon graphite, electrodeposition, gold, dopamine, uric acid.

Lista de Figuras

Figura 1 Esquema ilustrativo da estrutura dos dendrímeros, e suas gerações.	22
Figura 2 Esquema idealizado do biossensor Au/PAMAM/AChE.	29
Figura 3 Voltamograma cíclico referente ao eletrodo de ouro, eletrólito suporte H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, $\nu = 50 \text{ mV. s}^{-1}$	32
Figura 4 (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol. L}^{-1}$, $\nu = 50 \text{ mV. s}^{-1}$ do eletrodo Au/PAMAM obtido com diferentes tempos de imersão na solução de PAMAM 50 mmol. L^{-1} no intervalo de tempo de 3 a 48 h.	34
Figura 5 Voltamogramas lineares com correção de linha base obtidos em solução de NaOH $0,5 \text{ mol. L}^{-1}$, $\nu = 20 \text{ mV. s}^{-1}$, provenientes da dessorção redutiva dos eletrodos Au/PAMAM obtidos com diferentes tempos de imersão no intervalo de 3 a 48 h.	36
Figura 6 (A) Voltamogramas cíclicos obtidos dos eletrodos Au e Au/PAMAM/AChE obtidos pelos diferentes métodos (<i>dip coating</i> e <i>drop coating</i>) na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol. L}^{-1}$, $\nu = 50 \text{ mV. s}^{-1}$. (B) Diagrama de Nyquist das diferentes superfícies eletródicas na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, $5,0 \text{ mmol. L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,5$	38
Figura 7 Esquema da reação de hidrólise da molécula de AChI no centro ativo da AChE.	39
Figura 8 Voltamogramas cíclicos obtidos na presença de AChI $5,0 \text{ mmol. L}^{-1}$, em PBS $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,5$, $\nu = 10 \text{ mV. s}^{-1}$, utilizando-se diferentes configurações de eletrodos.	40
Figura 9 Voltamogramas cíclicos obtidos dos eletrodos Au na presença de KI $0,5 \text{ mmol. L}^{-1}$ e Au/PAMAM/AChE na presença de AChI $0,5 \text{ mmol. L}^{-1}$, em solução PBS $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,5$, $\nu = 30 \text{ mV. s}^{-1}$	42
Figura 10 Correlação entre a corrente anódica e a concentração de glutaraldeído na faixa de $0,1$ a 10% , para o eletrodo (Au/PAMAM/AChE_dip), na presença de AChI $1,0 \text{ mmol. L}^{-1}$, em PBS $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,5$, potencial fixo em $+0,28 \text{ V}$ e tempo de 300 s	43
Figura 11 Correlação entre a intensidade de corrente e a concentração de unidades enzimáticas, dados obtidos do eletrodo (Au/PAMAM/GLUT/AChE) preparados com diferentes concentrações da enzima, na faixa de 62 a 496 U. mL^{-1} , e GLUT 1% na presença de AChI $1,0 \text{ mmol. L}^{-1}$, em PBS $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,5$. Potencial fixo em $+0,28 \text{ V}$ e tempo de 300 s	44
Figura 12 (A) Correlação entre a intensidade de corrente e a variação de concentração de AChI na faixa de $99,0$ a $2.000 \mu\text{mol. L}^{-1}$, em PBS $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,5$, no potencial de $+0,28 \text{ V}$. (B) Correlação de Lineweaver-Burk.	45
Figura 13 Respostas amperométricas do biossensor Au/PAMAM/AChE obtidas em PBS $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,5$, na presença de $1,0 \text{ mmol. L}^{-1}$ de AChI, potencial aplicado de $+0,28 \text{ V}$, com diferentes tempos de imersão ($0,3$ a 10 min) na solução de carbaril $5,0 \mu\text{mol. L}^{-1}$	46

Figura 14 (A) Cronoamperogramas obtidos com diferentes concentrações da solução do pesticida carbaril na faixa de 1,0 a 9,0 $\mu\text{mol. L}^{-1}$, com concentração fixa de AChI de 1,0 mmol. L^{-1} em PBS 0,1 mol. L^{-1} pH = 7,5, potencial aplicado de 0,28 V (B) Correlação entre a % inibição e a concentração de carbaril. (n = 3)	48
Figura 15 Esquema idealizado da estrutura de anticorpos.	53
Figura 16 Esquema idealizado da construção do sensor Au/MPA/AG/BSA.	59
Figura 17 (A) Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado com 3-MPA em diferentes concentrações do 3-MPA na faixa de 1,0 mmol. L^{-1} a 0,1 mol. L^{-1} e (B) com diferentes tempos de imersão em solução de 3-MPA 10,0 mmol. L^{-1} no intervalo de 30 a 360 min, em solução de H_2SO_4 0,5 mol. L^{-1} , $\nu = 30 \text{ mV. s}^{-1}$	62
Figura 18 Voltamogramas lineares provenientes da dessorção redutiva do eletrodo modificado com 3-MPA, construídos com diferentes tempos de imersão no intervalo de 30 a 360 min, em solução de NaOH 0,5 mol. L^{-1} , $\nu = 20 \text{ mV. s}^{-1}$	64
Figura 19 Imagens de AFM do eletrodo de ouro (A) e do eletrodo de ouro modificado com a monocamada de 3-MPA, formada com diferentes tempos de imersão (B) 30 min, (C) 60 min, (D) 180 min e (E) 360 min.	66
Figura 20 Diagrama de Nyquist obtidos em PBS 0,1 mol. L^{-1} na presença de 5,0 mmol. L^{-1} de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, do eletrodo Au/MPA, construído em diferentes tempos de imersão. Figura inserida: Modelo de circuito equivalente correspondente aos dados experimentais.	67
Figura 21 (A) Voltamogramas cíclicos obtidos do eletrodo Au e Au/MPA na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, 5,0 mmol. L^{-1} , pH = 7,2, $\nu = 30 \text{ mV. s}^{-1}$. (B) Diagrama de Nyquist obtidos dos eletrodos Au e Au/MPA na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, 5,0 mmol. L^{-1} , pH = 7,2.....	69
Figura 22 Mecanismo idealizado do processo de ativação dos grupos carboxílicos da monocamada de 3-MPA e acoplamento dos AG.	70
Figura 23 (A) Voltamogramas cíclicos e (B) Diagramas de Nyquist obtidos dos eletrodos Au/MPA/AG obtidos em diferentes tempos de incubação (5 a 60 min) na solução de AG 0,5 g. L^{-1} . As medidas foram realizadas em PBS 0,1 mol. L^{-1} na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol. L^{-1} , pH = 7,2, $\nu = 30 \text{ mV. s}^{-1}$, na faixa de frequência de 10 kHz a 0,1 Hz.	72
Figura 24 (A) Voltamogramas cíclicos (B) Diagramas de Nyquist obtidos dos eletrodos Au/MPA/AG com diferentes concentrações de BSA, as caracterizações foram realizadas em PBS 0,1 mol. L^{-1} na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol. L^{-1} , $\nu = 30 \text{ mV. s}^{-1}$, na faixa de frequência de 10 kHz a 0,1 Hz.	73
Figura 25 Imagens de AFM dos eletrodos (A) Au/MPA, (B) Au/MPA/AG e (C) Au/MPA/AG/BSA. As imagens foram obtidas no modo não contato.	74

Figura 26 (A) Diagramas de Nyquist obtidos dos eletrodos modificados com diferentes tempos de incubação na solução de AB com concentração de 0,6 g. L ⁻¹ . As medidas foram realizadas em PBS 0,1 mol. L ⁻¹ na presença de [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} , 5,0 mmol. L ⁻¹ , pH = 7,2. (B) Correlação entre a Rct e os tempos de incubação na faixa de 5 a 60 min.	75
Figura 27 Diagramas de Nyquist obtidos do Au/MPA/AG/BSA/AB, antes e após o procedimento de regeneração (A) utilizando HCl/NaCl (método *A). (B) utilizando solução de NaOH/NaCl (método *B). As medidas foram realizadas em PBS 0,1 mol. L ⁻¹ na presença de [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 5,0 mmol. L ⁻¹ , pH = 7,2.	77
Figura 28 (A) Diagramas de Nyquist obtidos do Au/MPA/AG/BSA na presença de AB <i>T.cruzi</i> 0,6 g. L ⁻¹ e <i>anti-Toxoplasma</i> 1,0 g. L ⁻¹ e na ausência de AB. (B) Variação da Rct na presença e na ausência de AB. As medidas foram realizadas em PBS 0,1 mol. L ⁻¹ na presença de [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 5,0 mmol. L ⁻¹ , pH = 7,2, na faixa de frequência de 10 kHz a 0,1 Hz. (As barras de erro são provenientes do desvio padrão de três experimentos independentes, cada uma em triplicata).	79
Figura 29 Cronoamperograma obtido a partir do processo de eletrodeposição galvanostática. ...	83
Figura 30 Imagens de MEV da superfície do eletrodo de CG, (A) antes e (B) após o procedimento de polimento. A barra inserida nas figuras corresponde a 2 µm.	90
Figura 31 Difrátogramas de raios X referentes ao pó do eletrodo de CG.	91
Figura 32 (A) Espectros de FTIR obtidos da superfície do cilindro de CG pelo modo refletância. (B) Espectro Raman obtido do pó do cilindro de CG.	92
Figura 33 (A) Voltamogramas cíclicos obtidos de eletrodos CG, obtidos de diferentes pilhas e (B) Repetibilidade de medida proveniente do eletrodo 2. Os voltamogramas foram obtidos em KCl 0,1 mol. L ⁻¹ na presença de 5,0 mmol. L ⁻¹ de [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} , v = 50 mV. s ⁻¹	93
Figura 34 (A) Voltamogramas cíclicos do eletrodo CG, obtidos em diferentes velocidades de varredura. As medidas foram realizadas em KCl 0,1 mol. L ⁻¹ na presença de 5,0 mmol. L ⁻¹ de [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} . (B) Correlação entre Ipa vs v, (C) Correlação entre Ipa vs v ^{1/2}	94
Figura 35 Voltamogramas cíclicos obtidos do eletrodo de CG na presença de [AuCl ₄] ⁻ 10,0 mmol. L ⁻¹ em KH ₂ PO ₄ 0,1 mol. L ⁻¹ , v = 50 mV. s ⁻¹	95
Figura 36 Imagens de MEV-FEG das microestruturas de Au eletrodepositadas com concentração fixa de [AuCl ₄] ⁻ 10,0 mmol. L ⁻¹ e tempo de 700 s, em diferentes potenciais (A) E = +0,6 V, (B) E = +0,3 V, (C) E = -0,3 V e (D) E = -0,6 V. A escala da barra inserida na figura corresponde a 2 µm, com magnificação de 20.000X.	97

Figura 37 (A) Cronoamperogramas obtidos em diferentes potencial de eletrodeposição na faixa de -0,6 a +0,6 V vs Ag AgCl, com concentração fixa de $[\text{AuCl}_4]^-$ de 10,0 mmol. L^{-1} , (B) Curvas de $(I/I_{\text{max}})^2$ vs (t/t_{max}) teóricas e experimentais referentes aos processos de eletrodeposição realizados em diferentes potenciais.	98
Figura 38 Voltamogramas cíclicos obtidos dos eletrodos de CG modificados com diferentes potenciais de eletrodeposição, na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol. L^{-1} , $\nu = 50 \text{ mV. s}^{-1}$	99
Figura 39 Voltamogramas cíclicos obtidos dos eletrodos de CG modificados com concentração de fixa de $[\text{AuCl}_4]^-$ em 10 mmol. L^{-1} , e tempo de eletrodeposição de 700 s, com diferentes potenciais aplicados (A) $E = -0,3 \text{ V}$, (B) $E = +0,3 \text{ V}$, na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol. L^{-1} , em KCl 0,1 mol. L^{-1} , $\nu = 50 \text{ mV. s}^{-1}$	100
Figura 40 Imagens de MEV-FEG das microestruturas eletrodepositadas com diferentes concentrações de $[\text{AuCl}_4]^-$, (A) 1,0 mmol. L^{-1} , (B) 10,0 mmol. L^{-1} e (C) 100,0 mmol. L^{-1} . Com potencial fixo em +0,3 V e tempo de deposição de 700 s. A escala da barra inserida na figura corresponde a 2 μm , com magnificação de 20.000x.....	101
Figura 41 Voltamogramas cíclicos obtidos na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol. L^{-1} , $\nu = 50 \text{ mV. s}^{-1}$, provenientes dos eletrodos de CG modificados com diferentes concentrações de $[\text{AuCl}_4]^-$, com tempo e potencial de eletrodeposição fixo em 700 s e +0,3 V.	102
Figura 42 Imagens de MEV-FEG, dos eletrodos modificados com diferentes tempos de eletrodeposição (A) 200 s, (B) 700 s e (C) 1.200 s, com potencial de eletrodeposição de +0,3 V e concentração de 10 mmol. L^{-1} de $[\text{AuCl}_4]^-$. A escala da barra inserida na figura corresponde a 2 μm , com magnificação de 20.000 x.	103
Figura 43 Voltamogramas cíclicos obtidos dos eletrodos modificados mantendo fixo o potencial em +0,3 V e a concentração de $[\text{AuCl}_4]^-$ em 10,0 mmol. L^{-1} , com diferentes tempos de eletrodeposição na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol. L^{-1} , $\nu = 50 \text{ mV. s}^{-1}$	104
Figura 44 Difratograma do eletrodo de CG modificado com as microestruturas de ouro eletrodepositadas com as condições otimizadas (potencial de eletrodeposição de +0,3 V, concentração de $[\text{AuCl}_4]^-$ de 10,0 mmol. L^{-1} e tempo de deposição de 700 s).	105
Figura 45 (A) Voltamogramas cíclicos, (B) Diagrama de Nyquist dos eletrodos CG, Au e CG/Au em KCl 0,1 mol. L^{-1} na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol. L^{-1} , $\nu = 50 \text{ mV. s}^{-1}$	106
Figura 46 Voltamogramas cíclicos obtidos na presença de DA 1,0 mmol. L^{-1} , pH = 7,0 $\nu = 50 \text{ mV. s}^{-1}$, sobre os eletrodos CG, Au e CG/Au.	107
Figura 47 (A) Voltamogramas cíclicos do eletrodo CG/Au em diferentes velocidades de varredura na faixa de 10 a 100 mV. s^{-1} na presença de 1,0 mmol. L^{-1} de DA em PBS 0,1 mol. L^{-1} , pH = 7,0. (B) Correlação entre I_{pa} vs $\nu^{1/2}$. (C) Correlação de entre I_{pa} vs ν	108

Figura 48 Voltamogramas cíclicos obtidos dos eletrodos CG/Au, CG e Au em presença de (A) DA 1,0 mmol. L ⁻¹ e AU 10,0 mmol. L ⁻¹ , (B) DA 1,0 mmol. L ⁻¹ e AA 10,0 mmol. L ⁻¹ , em PBS 0,1 mol. L ⁻¹ , pH = 7,0, $\nu = 50 \text{ mV. s}^{-1}$	109
Figura 49 Voltamogramas de onda quadrada obtidos em PBS 0,1 mol. L ⁻¹ na presença de DA 0,1 mmol. L ⁻¹ , $f = 20 \text{ Hz}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 1 \text{ mV}$, sobre eletrodo de CG/Au.	111
Figura 50 Voltamogramas de onda quadrada obtidos na presença de DA 0,1 mmol. L ⁻¹ , em PBS 0,1 mol. L ⁻¹ , pH = 7,0. (A) correlação entre a variação da amplitude e a corrente de pico ($f = 100 \text{ Hz}$ e $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$), (B) correlação entre a variação da frequência e a corrente de pico ($a = 70 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$), (C) correlação entre a variação do incremento de pulso e a corrente de pico ($f = 70 \text{ Hz}$, $a = 70 \text{ mV}$).	112
Figura 51 Voltamogramas de onda quadrada do eletrodo CG/Au obtidos, em PBS 0,1 mol. L ⁻¹ , pH = 7,0, (A) na presença de DA 90 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ e AU 100 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ (B) na presença de DA 90 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ e AA 100 $\mu\text{mol. L}^{-1}$	114
Figura 52 (A) Voltamogramas de onda quadrada do eletrodo CG/Au na presença da mistura contendo diferentes concentrações de DA na faixa de 9,9 to 90 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ e AU com concentração fixa 100 $\mu\text{mol. L}^{-1}$. (B) Curva analítica para a determinação de dopamina. (C) Voltamogramas de onda quadrada do eletrodo CG/Au na presença da mistura contendo diferentes concentrações de AU na faixa de 134 a 517 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ e DA com concentração fixa de 90 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ em 0,1 mol. L ⁻¹ de PBS, pH = 7,0. (D) Curva analítica para a determinação de ácido úrico. A barra de erro representa o desvio padrão de três medidas, obtidas com o mesmo eletrodo.	115

Lista de Tabelas

Tabela 1 Recobrimentos superficiais parciais (θ), dos eletrodos modificados com diferentes tempos de imersão na solução de PAMAM-G4.....	35
Tabela 2 Valores de excesso superficial (Γ) obtidos dos voltamogramas dos eletrodos modificados com diferentes tempos de imersão na solução de PAMAM-G4 ~ 50 mmol. L ⁻¹	37
Tabela 3 Parâmetros eletroquímicos obtidos dos voltamogramas cíclicos e dos espectros de Nyquist das diferentes etapas de modificação do eletrodo de Au.....	39
Tabela 4 Valores de correntes de pico anódica obtidas da deconvolução dos voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 8.....	41
Tabela 5 Comparativo entre os LD dos diferentes biossensores na detecção de carbaril.	49
Tabela 6 Valores de recobrimentos superficiais parciais (θ) dos eletrodos modificados com diferentes tempos de imersão.	63
Tabela 7 Valores de excesso superficial (Γ) das moléculas adsorvidas sobre eletrodo de Au, determinados a partir dos voltamogramas lineares obtidos dos eletrodos modificados com SAM de 3-MPA em diferentes tempos de imersão.....	65
Tabela 8 Valores de resistência de transferência de carga (R _{ct}), capacitância (CPE) e de rugosidade média (R _q) e do fator de idealidade (n), obtidos dos eletrodos Au/MPA obtidos em diferentes tempos de imersão.	68
Tabela 9 Parâmetros voltamétricos e de EIE obtidos dos eletrodos Au/MPA/AG obtidos em diferentes concentrações de AG, com tempo de imersão de 30 min, na presença de [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 5,0 mmol. L ⁻¹ , pH = 7,2, v = 50 mV. s ⁻¹	71
Tabela 10 Efeito da concentração de BSA no desempenho do imunossensor.....	73
Tabela 11 Dados de R _{ct} obtidos antes e após o procedimento de regeneração do Au/MPA/AG/AB.	77
Tabela 12 Valores de R _{ct} obtidos do imunossensor Au/MPA/BASA/AG/AB em diferentes concentrações de AB <i>T. cruzi</i>	78
Tabela 13 Análise elementar qualitativa da superfície do eletrodo de CG por EDS.....	90
Tabela 14 Comparação do desempenho analítico dos eletrodos CG/Au obtidos com diferentes potenciais de deposição.	99
Tabela 15 Parâmetros voltamétricos e áreas eletroativas dos eletrodos CG, Au e CG/Au.	106
Tabela 16 Comparação dos limites de detecção dos sensores aplicados na detecção simultânea de dopamina e ácido úrico.....	116

Lista de abreviaturas e siglas

ΔE_p	Separação de potenciais de pico
ΔE_s	Incremento de varredura de potenciais
a	Amplitude do pulso
AA	Ácido ascórbico
AB	Anticorpos
ACh	Acetilcolina
AChE	Enzima acetilcolinesterase
AChI	Iodeto de acetiltiocolina
AG	Antígenos
AU	Ácido úrico
Au/PAMAM/GLUT/AChE	Biossensor enzimático
Au/MPA/AG/BSA	Imunossensor
AuNp	Nanopartículas de ouro
BSA	Albumina de soro bovino
CFU	Unidade formadora de colônia
CG	Eletrodo de carbono grafite
CG/Au	Eletrodo de carbono grafite modificado com partículas de ouro
CPE	Elemento de fase constante
DRX	Difração de raios X
DA	Dopamina hidrocloreada
EDC	Carbodiimida
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva de raios x
EIE	Espectroscopia de impedância eletroquímica
E_p	Potencial de pico
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico

f	Frequência dos pulsos de potenciais
GLUT	Glutaraldeído
I_p	Corrente de pico
I_{pa}	Corrente de pico anódica
I_{pc}	Corrente de pico catódica
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MEV-FEG	Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo
NHS	N-hidroxisuccinimida
NpPt	Nanopartículas de platina
n	Fator de idealidade
OCP	Potencial de circuito aberto
PAMAM-G4	Dendrímero poliamidoamina de quarta geração com núcleo de cistamina
PBS	Solução tampão fosfato salino
R_{ct}	Resistência de transferência de carga
R_q	Rugosidade quadrática
v	Velocidade de varredura de potenciais
VC	Voltametria cíclica
VOQ	Voltametria de onda quadrada
W1	Impedância de Warburg
3-MPA	Ácido 3-mercaptopropiônico

Sumário

CAPÍTULO I	21
1 Introdução	22
2 Objetivos	27
2.1 Objetivos Específicos	27
3 Materiais e Metodologias	28
3.1 Reagentes.....	28
3.2 Pré- tratamento da superfície do substrato de Au	28
3.3 Processo de formação da monocamada (Au/PAMAM)	28
3.4 Estudo da influência do método de imobilização da AChE sobre Au/PAMAM	29
3.5 Determinação de Carbaril	31
3.6 Medidas Eletroquímicas	31
4 Resultados e Discussão	32
4.1 Pré- tratamento do eletrodo de ouro	32
4.2 Formação da monocamada de PAMAM-G4.....	33
4.3 Imobilização da enzima AChE sobre Au/PAMAM	37
4.4 Estudo da resposta do biossensor Au/PAMAM/AChE na presença de carbaril	46
4.5 Estabilidade do biossensor Au/PAMAM/AChE	49
5 Conclusões	50
CAPÍTULO II	51
1 Introdução	52
2 Objetivos	57
2.1 Objetivos Específicos	57
3 Materiais e Metodologias	57
3.1 Reagentes e Soluções.....	57
3.2 Otimização do processo de formação da monocamada de 3-MPA	58
3.3 Imobilização dos Antígenos	59
3.4 Medidas eletroquímicas	60
3.5 Caracterizações por Microscopia de Força Atômica (AFM)	60

3.6 Regeneração do Imunossensor	60
3.7 Detecção da imunorreacção entre antígenos e anticorpos <i>T. cruzi</i>	61
4 Resultados e Discussão	61
4.1 Estudos da formação da monocamada de 3-MPA sobre o eletrodo de Au	61
4.2 Construção do Imunossensor Au/MPA/AG	70
4.2.1 Estudo da concentração de antígenos	70
4.2.2 Estudo do tempo de imersão na solução de antígenos	71
4.2.3 Estudo da concentração de BSA	72
4.2.4 Otimização do tempo de imersão na solução de AB	75
4.2.5 Regeneração do Imunossensor	76
4.2.6 Detecção eletroquímica de AB <i>T. cruzi</i>	78
5 Conclusões	80
CAPÍTULO III	81
1 Introdução	82
2 Objetivos	86
2.1 Objetivos Específicos	86
3 Materiais e Metodologias	87
3.1 Reagentes	87
3.2 Obtenção dos eletrodos de CG	87
3.3 Caracterização por difração de raios X	87
3.4 Caracterização por FTIR e Raman	87
3.5 Caracterização por MEV-FEG	88
3.6 Eletrodeposição de Au sobre os eletrodo CG	88
3.7 Detecção de dopamina na presença de ácido úrico e ácido ascórbico	88
4 Resultados e Discussões	90
4.1 Caracterização dos eletrodos de CG	90
4.2 Eletrodeposição de microestruturas de Au	95
4.2.1 Efeito do potencial de eletrodeposição	96
4.2.2 Efeito da concentração do precursor no processo de eletrodeposição	101
4.2.3 Efeito do tempo de eletrodeposição	103

4.3 Caracterização das microestruturas eletrodepositadas por DRX	105
4.4 Detecção eletroquímica de Dopamina	107
4.4.1 Detecção simultânea de dopamina na presença de ácido úrico e ácido ascórbico	109
4.4.2 Otimização dos parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada	111
4.4.4 Detecção eletroquímica simultânea de DA e AU	113
5 Conclusões	116
CAPÍTULO IV	118
Conclusões Gerais	119
Perspectivas Futuras.....	121
Referências Bibliográficas	122

Apresentação

O desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos tem sido o foco de inúmeras pesquisas, pois estes podem ser empregados na detecção eletroquímica de diferentes compostos em diversas áreas, como por exemplo, na indústria alimentícia, em análises clínicas e ambientais, em função de suas características, tais como: fácil operação, economicamente viáveis, sensíveis, seletivos e portáteis.¹

De acordo com a literatura^{2,3} um sensor eletroquímico pode ser considerado um dispositivo constituído por um eletrodo denominado de transdutor, que transforma uma informação química proveniente de uma espécie eletroativa, em um sinal eletroanalítico mensurável. A informação química mencionada pode ser originada a partir de uma reação do analito ou a partir de uma propriedade física do sistema investigado. No entanto, com o intuito de aumentar a sensibilidade e/ou a seletividade da detecção, o transdutor pode ser modificado pela adsorção de polímeros condutores, nanomateriais, ou biomoléculas, tais como, enzimas, antígenos e anticorpos originando os biossensores eletroquímicos.⁴ Biossensores eletroquímicos são dispositivos que apresentam um ou mais elementos biológicos os quais conferem seletividade ao dispositivo, acoplados em um transdutor, os quais convertem uma resposta biológica em um sinal eletroanalítico mensurável.^{4,5}

Entre as possibilidades de eletrodos que podem ser empregados no desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos, os eletrodos de ouro são largamente utilizados, devido à estabilidade térmica e química, biocompatibilidade e elevada condutividade elétrica.⁶

Com o intuito de aumentar a seletividade, especificidade e a sensibilidade das detecções eletroquímicas, frequentemente os eletrodos/transdutores são modificados com biomoléculas, tais como enzimas, antígenos e anticorpos. Tais dispositivos são denominados de biossensores, os quais podem ser classificados como biossensores enzimáticos, se este apresentar como elemento biológico reconhecedor enzimas acopladas ao transdutor, ou imunossensores se a biomolécula acoplada for um antígeno ou anticorpo.⁷ Entretanto, tanto o processo de imobilização quanto a otimização das etapas de imobilização são cruciais para manter ativa a biomolécula imobilizada sobre superfície do eletrodo. Neste sentido, diversas estratégias podem ser utilizadas no processo de construção dos biossensores. Em função da facilidade de modificação, estabilidade, ordenamento molecular e da presença de grupos funcionais periféricos, os quais viabilizam o processo de imobilização de biomoléculas, a técnica *self assembled monolayer* (SAM) apresenta-se como uma estratégia adequada, a qual é frequentemente utilizada no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos.

Pesticidas como os carbamatos, mais precisamente o carbaril (1-naftil metilcarbamato) é amplamente utilizado em diversas culturas. Entretanto, este pesticida apresenta elevada toxicidade aos mamíferos, pois pode inibir a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) responsável pela hidrólise da acetilcolina presentes nas sinapses. Neste sentido, o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos que utilizam a enzima AChE como molécula biológica reconhecedora apresenta-se como uma alternativa na detecção deste pesticida.

Em função das características já mencionadas da técnica SAM, esta é utilizada na construção de imunossensores eletroquímicos, os quais apresentam-se como uma alternativa aos métodos clínicos de diagnósticos (imunoensaios) na detecção de diferentes patologias, como por exemplo da tripanossomíase americana (Doença de Chagas), pois os imunossensores permitem um diagnóstico rápido, prático, os equipamentos são portáteis e as análises podem ser realizadas *in situ*. Estes fatores tornam os imunossensores eletroquímicos uma ferramenta alternativa e promissora para a detecção de diferentes doenças.

Diversos eletrodos, como de carbono, ouro, óxido de estanho dopado com índio (ITO), modificados como os mais variados materiais, como por exemplo, nanotubos de carbono, grafeno, polímeros condutores, nanopartículas, entre outros, têm sido utilizados como sensores eletroquímicos, aplicados na detecção e quantificação de diferentes compostos, tais como: peróxido de hidrogênio, dopamina, ácido úrico, íons metálicos, entre outros. Dentre os diversos materiais que podem ser utilizados como eletrodos no desenvolvimento de sensores eletroquímicos, pode-se destacar os eletrodos de carbono grafite, pois apresentam baixo custo, condutividade semelhante a eletrodos metálicos, resistência mecânica além da possibilidade de miniaturização. Recentemente, vários eletrodos de carbono grafite modificados com partículas ou microestruturas metálicas de ouro, tem sido reportados, pois estas aumentam a área eletroativa e promovem a eletrocatalise. A eletrodeposição potencioestática é uma das estratégias frequentemente utilizadas para modificar os eletrodos de carbono grafite com as microestruturas metálicas, pois esta permite controlar tanto a morfologia como o tamanho das partículas depositadas, desta forma avaliar a melhor configuração para se obter a maior sensibilidade da detecção.

O capítulo 1 desta tese aborda o desenvolvimento e aplicação de um biossensor enzimático para a detecção do pesticida carbaril, baseado na técnica SAM, utilizando o dendrímero poliamidoamina de quarta geração com núcleo de cistamina (PAMAM-G4) e a enzima acetilcolinesterase. No capítulo 2 é reportado o desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico *label-free* aplicado na detecção de anticorpos *Tripanossoma cruzi* em amostras de soro. Este biossensor foi construído sobre uma monocamada do tiol ácido 3-mercaptopropiônico

e sobre a mesma foi imobilizado os antígenos *T. cruzi* responsáveis pela especificidade do sensor. No capítulo 3 é relatado o desenvolvimento de um sensor eletroquímico para a detecção simultânea de dopamina e ácido úrico. O sensor proposto foi desenvolvido utilizando um eletrodo de carbono grafite obtido de pilhas de zinco/carbono o qual foi modificado com microestruturas de ouro pelo método de deposição potencioestática.

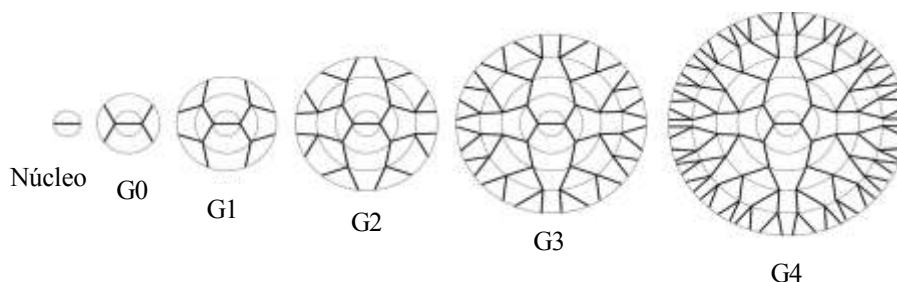
CAPÍTULO I

Desenvolvimento de um biossensor para detecção de carbaril utilizando a enzima acetilcolinesterase imobilizada em eletrodo de ouro modificado com o dendrímero PAMAM-G4

1 Introdução

A modificação de superfícies metálicas utilizando-se de monocamadas auto-organizadas (*Self Assembled Monolayer*) vem sendo estudada desde a década de 40.^{8,9} Esta técnica consiste na imersão de um substrato sólido metálico como: Pt,¹⁰ Ag¹¹ e Au,^{12,13} ou de nanopartículas metálicas¹⁴ na solução do adsorbato modificador, a qual pode ser constituída de moléculas orgânicas e inorgânicas. Entre as possibilidades de substratos e modificadores, eletrodos de ouro e tióis, são os mais utilizados no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos, devido à estabilidade proporcionada pela forte interação entre a superfície do eletrodo de ouro e o átomo de enxofre presente no tiol, e também da presença de grupos funcionais terminais^{15,16} Os dendrímeros têm sido utilizados no desenvolvimento de biossensores, pois além de apresentar uma elevada densidade de grupos funcionais terminais, apresentam estruturas tridimensionais ramificadas, as quais contribuem para manter a estrutura nativa das biomoléculas inalterada, minimizando o processo de desnaturação.^{17,18} As estruturas idealizadas desta classe de moléculas podem ser representadas pela Figura 1.

Figura 1 Esquema ilustrativo da estrutura dos dendrímeros, e suas gerações.



Fonte: Adaptado da referência 17.

Como pode ser visto, os dendrímeros apresentam uma estrutura molecular globular, constituído por um núcleo, sendo os mais comuns de etilenodiamina e cistamina, onde a partir destes núcleos ocorre o processo de ramificação. O número de unidades repetidas (ramificações) determina a geração da molécula, quanto maior a geração do dendrímero maior é número de grupos funcionais. Portanto em função destas características, estas moléculas são atrativas para a construção de biossensores eletroquímicos.^{19, 20} O dendrímero poli(amidoamina) de quarta geração com núcleo de cistamina (PAMAM-G4), além de apresentar as características mencionadas, pode formar monocamadas diretamente sobre a superfície de substrato de ouro, pois apresenta em seu núcleo uma ligação dissulfeto, a qual pode ser rompida utilizando agentes redutores, como borohidreto de sódio (NaBH_4), disponibilizando os átomos de enxofre para efetuar a quimissorção sobre a superfície metálica.²¹

Na literatura há vários estudos relatando a utilização de dendrímero na construção de sensores e biossensores eletroquímicos, aplicados na detecção de diferentes tipos de analitos, tais como: nitrito, peróxido de hidrogênio e glicose.^{22, 23} Recentemente, Zang et al.²⁴ reportaram o desenvolvimento de um sensor eletroquímico aplicado na detecção de paracetamol utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado. Para modificar este eletrodo foram utilizados nanotubos de carbono e o dendrímero PAMAM-G4. A estratégia utilizada neste trabalho consistiu na ligação covalente entre os ácidos carboxílicos presentes nos nanotubos e os grupos terminais aminos presentes no dendrímero. Com as condições otimizadas, os resultados demonstraram que o sensor exibiu propriedades eletrocatalíticas na detecção de paracetamol e sensível a variações de concentrações do analito na faixa de 0,3 a 200 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ com limite de detecção de 0,1 $\mu\text{mol. L}^{-1}$.

Ning et al.²³ desenvolveram um sensor eletroquímico para a detecção de nitrito, utilizando um eletrodo de carbono vítreo (ECV) modificado com o dendrímero PAMAM com núcleo de etilenodiamina de quarta geração. Devido ao fato dos dendrímeros apresentarem estruturas tridimensionais ramificadas, as quais formam nanocavidades, estas foram utilizadas para sintetizar e estabilizar nanopartículas metálicas de prata (AgNp). De acordo com os autores, o eletrodo modificado com o compósito PAMAM/Ag eletrocatalisou a oxidação do íon nitrito comparado ao eletrodo não modificado. O sensor apresentou resposta linear a variações de concentração do analito na faixa de 4 a 1.440 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ e apresentou limite de detecção de 0,40 $\mu\text{mol. L}^{-1}$.

Recentemente, Diéz et al.²¹ relataram o desenvolvimento de um biossensor amperométrico utilizando-se o dendrímero PAMAM-G4 com núcleo de cistamina, para a detecção de glucose. Como o dendrímero apresenta no núcleo a ligação de dissulfeto, estas ligações foram rompidas pela adição do agente redutor NaHB_4 , disponibilizando os átomos de enxofre para formar sobre a superfície do eletrodo de ouro, a monocamada do dendrímero. Com o intuito de aumentar a sensibilidade na detecção de peróxido de hidrogênio, produto da reação catalisada pela enzima Glucose oxidase (GOx), foram sintetizadas nas nanocavidades do dendrímero, nanopartículas de platina (NpPt). A imobilização da enzima GOx sobre o eletrodo modificado com a monocamada do dendrímero, se deu por interações eletrostáticas, pois a síntese das nanopartículas foi realizada no pH 7 e nesta condição os grupos aminos encontram-se parcialmente carregados positivamente e a enzima encontra-se carregada negativamente. O biossensor apresentou resposta linear na faixa de 5,0 a 705,0 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ de glucose, com limite de detecção de 2 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ e reteve 94% da resposta inicial após 9 dias de armazenagem.

Tendo em vista a versatilidade dos dendrímeros, Araque et al.²⁵ modificaram a superfície de um eletrodo de carbono vítreo, pela adsorção de uma mistura, contendo: óxido de grafeno funcionalizado com grupos carboxílicos e hidroxílicos. Com o intuito de aumentar a densidade de grupos funcionais terminais e proporcionar um ambiente favorável para imobilizar a enzima tirosinase, sobre a superfície do eletrodo modificado com o grafeno foi adsorvido o dendrímero poli(amidoamina) de quarta geração com núcleo de etilenodiamina. Após a evaporação do solvente, foi gotejada uma solução contendo a enzima tirosinase. O biossensor amperométrico foi aplicado na detecção de catecol, e apresentou resposta linear na faixa de 10 nmol. L⁻¹ a 22 µmol. L⁻¹ com limite de detecção de 6 nmol. L⁻¹. Em outro exemplo, Villalonga et al.²⁶ construíram um biossensor para a detecção de peróxido de hidrogênio, utilizando as técnicas SAM e Layer by Layer. O sensor foi construído sobre um eletrodo de ouro modificado com uma monocamada do dendrímero PAMAM-G4 com núcleo de cistamina, sobre a qual foram imobilizadas as enzimas HRP. Sobre esta plataforma foi construído um filme com multicamadas, constituído por camadas alternadas de HRP e do dendrímero poli(amidoamina) de quinta geração. Foi constatado que o limite de detecção obtido para o H₂O₂ diminuiu em função de número de bicamadas, até a terceira bicamada. Segundo os autores, a redução nos valores do limite de detecção foi atribuída à estrutura tridimensional formada, a qual contribuiu para o aumento da concentração de enzimas imobilizadas. O biossensor além de sensível a variações de concentrações de H₂O₂ na faixa entre 0,5 e 186 µmol. L⁻¹, com limite de detecção de 160 nmol. L⁻¹, e apresentou-se estável, pois manteve 63 % da resposta inicial após 30 dias de armazenamento.

Em função da versatilidade, sensibilidade e seletividade, biossensores enzimáticos são utilizados na detecção de pesticidas carbamatos.²⁷ A presença destes pesticidas em água e alimentos é potencialmente perigosa para os mamíferos, pois estes, se ingeridos ou inalados interagem com o sítio ativo da enzima acetilcolinesterase (AChE), inibindo a atividade da enzima. Esta enzima possui um sítio ativo onde existem três resíduos principais de aminoácidos, a serina, a histidina e o ácido glutâmico, os quais estão envolvidos diretamente no processo de hidrólise do substrato enzimático e neurotransmissor acetilcolina (ACh). Além dos resíduos de aminoácidos há duas regiões aniônicas, uma responsável pela interação com a parte catiônica da ACh e que orienta o substrato para o processo de hidrólise. A segunda região aniônica, denominada de sítio aniônico periférico é constituída basicamente por resíduos de triptofano e colina, os quais podem interagir com pesticidas, desta forma a conformação do sítio catalítico é alterada impedindo o processo de hidrólise da acetilcolina.^{28,29}

Em função da toxicidade causada pelos pesticidas principalmente pelo carbaril, Cancino et al.³⁰ desenvolveram um biossensor para detecção eletroquímica deste pesticida. O dispositivo foi construído sobre um eletrodo de ouro modificado com uma monocamada mista dos tióis 11-mercaptopropiônico e 2-mercaptoetanol, e sobre a plataforma formada foi imobilizada fisicamente a enzima acetilcolinesterase. Como a atividade da enzima é reduzida após a interação com o pesticida, a detecção do pesticida é realizada com base na redução da intensidade de corrente gerada pela oxidação do substrato enzimático iodeto de acetiltiocolina catalisada pela enzima AChE. Portanto, é necessário avaliar além da faixa de concentração em que o biossensor é sensível o tempo de imersão na solução do inibidor. Após otimizar as variáveis, o biossensor amperométrico proposto foi aplicado na detecção do pesticida e apresentou-se sensível a variações de concentração do analito na faixa entre 0,25 e 1,75 $\mu\text{mol. L}^{-1}$, apresentando limite de detecção de 0,34 nmol. L^{-1} e de quantificação de 1,15 nmol. L^{-1} . Liu et al.³¹ reportaram o desenvolvimento de um biossensor amperométrico aplicado na detecção de carbaril em amostras reais de couve. O biossensor foi construído sobre um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono e folhas de grafeno, ambos funcionalizados com grupos carboxílicos após tratamento oxidativo utilizando uma mistura de ácidos e peróxido de hidrogênio. A inserção de grupos carboxílicos teve como objetivo, imobilizar covalentemente a enzima AChE. Para estabelecer a ligação covalente entre a superfície do eletrodo modificada com a enzima foi necessária a utilização dos agentes de ativação carbodiimina (EDC) e n-hidroxisuccinimida (NHS), os quais permitem formar as ligações amidas entre os grupos carboxílicos presentes nos nanotubos e os grupos $-\text{NH}$ da enzima. Tal ligação, garantiu a estabilidade da enzima imobilizada e consequentemente do biossensor durante um período de armazenagem de 30 dias. O biossensor apresentou-se sensível a variações de concentração de carbaril na faixa de 5,0 nmol. L^{-1} a 5.000,0 nmol. L^{-1} , com limite de detecção de 1,7 nmol. L^{-1} .

A detecção de pesticidas como, por exemplo, do carbaril por biossensores que utilizam a inibição da atividade da enzima AChE é realizada com base na intensidade da corrente de oxidação do substrato enzimático tiocolina, gerada pelo processo de dimerização formando o dímero ditio-*bis*-colina. Portanto, o biossensor deve apresentar além da enzima um transdutor que eletrocatalise o processo de dimerização. Neste sentido, Cesarino et al.³² desenvolveram um biossensor para a detecção de compostos carbamatos (carbaril e metomil), utilizando a enzima AChE imobilizada sobre um eletrodo de carbono vítreo modificado com polianilina (PANI) e nanotubos de carbono. O processo de modificação da superfície do eletrodo consistiu na eletropolimerização de uma solução de PANI e nanotubos utilizando a técnica de voltametria

cíclica. A estrutura tridimensional formada pela PANI viabilizou a adsorção física da enzima AChE e garantiu estabilidade do biossensor por um período de 60 dias. Em função das propriedades eletrocatalíticas da estrutura PANI/nanotubo, o dispositivo apresentou limite de detecção de 1,4 e 0,9 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ para carbaril e metomil, respectivamente.

2 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho consiste no desenvolvimento de um biossensor enzimático a partir da técnica SAM e a enzima acetilcolinesterase (AChE), o qual será aplicado na detecção do pesticida carbaril. Entre os diversos tióis que podem ser empregados na formação da SAM, foi utilizado o dendrímero poli(amidoamina) de quarta geração com núcleo de cistamina (PAMAM-G4), devido à estrutura tridimensional ramificada e da presença dos grupos funcionais terminais aminos.

2.1 Objetivos Específicos

- Modificar a superfície do eletrodo de ouro utilizando o dendrímero PAMAM-G4;
- Otimizar as condições de formação da monocamada sobre a superfície do eletrodo de ouro;
- Caracterizar eletroquimicamente a monocamada formada sobre a superfície do eletrodo de ouro, utilizando as técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica;
- Imobilizar a enzima acetilcolinesterase (AChE) sobre a base formada pela monocamada do dendrímero PAMAM-G4;
- Aplicar o eletrodo Au/PAMAM/AChE na determinação do pesticida carbaril.

3 Materiais e Metodologias

3.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados nos experimentos são de pureza analítica (P.A.). A enzima acetilcolinesterase (AChE 827 U. mg^{-1}), glutaraldeído (25% v/v), iodeto de acetiltiocolina (AChI), poli(amidoamina) PAMAM-G4 (10% m/v) e carbaril foram adquiridos da Sigma Aldrich®. $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, foram adquiridos da Vetec (BRASIL). A solução tampão fosfato salino PBS 0,1 mol L^{-1} foi preparada pela mistura de Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 e NaCl 0,5 mol L^{-1} . Para o ajuste de pH foi utilizada solução de hidróxido de sódio 1,0 mol. L^{-1} . As soluções foram preparadas com água deionizada.

3.2 Pré- tratamento da superfície do substrato de Au

Para que ocorra a formação de monocamadas homogêneas, é necessária uma superfície limpa e livre de contaminantes, portanto o eletrodo de ouro com área de 0,028 cm^2 foi primeiramente submetido ao processo de limpeza mecânico, onde foi realizado polimento com alumina 0,3 μm . Em seguida, foi realizado o processo de limpeza química utilizando solução piranha (H_2O_2 e H_2SO_4 nas proporções 1:3), e por fim o polimento eletroquímico, que consistiu na varredura de 25 ciclos utilizando solução H_2SO_4 0,5 mol. L^{-1} , com janela de varredura de potencial de 0,2 a 1,6 V vs $\text{Ag}|\text{AgCl}$ e velocidade de varredura de 50 mV. s^{-1} . O processo adotado para a limpeza do substrato está de acordo com o relatado da literatura.³³

3.3 Processo de formação da monocamada (Au/PAMAM)

O tiol utilizado para a modificação do substrato de ouro foi o dendrímero poli(amidoamina) de quarta geração com núcleo de cistamina (PAMAM-G4). Para tanto, foi preparada 1 mL de solução deste modificador em álcool metílico com concentração de 50,0 mmol. L^{-1} . A esta solução foi adicionado 50 μL de uma solução de NaBH_4 0,1 mol. L^{-1} para redução das ligações dissulfeto. Esta solução ficou em repouso por quatro horas antes de ser utilizada.²¹ O procedimento adotado para o rompimento da ligação dissulfeto está de acordo com os procedimentos reportados na literatura.²¹

Após o rompimento da ligação dissulfeto, o eletrodo de ouro foi modificado pela imersão em solução metanólica de PAMAM-G4, com concentração de 50,0 mmol. L^{-1} . A modificação

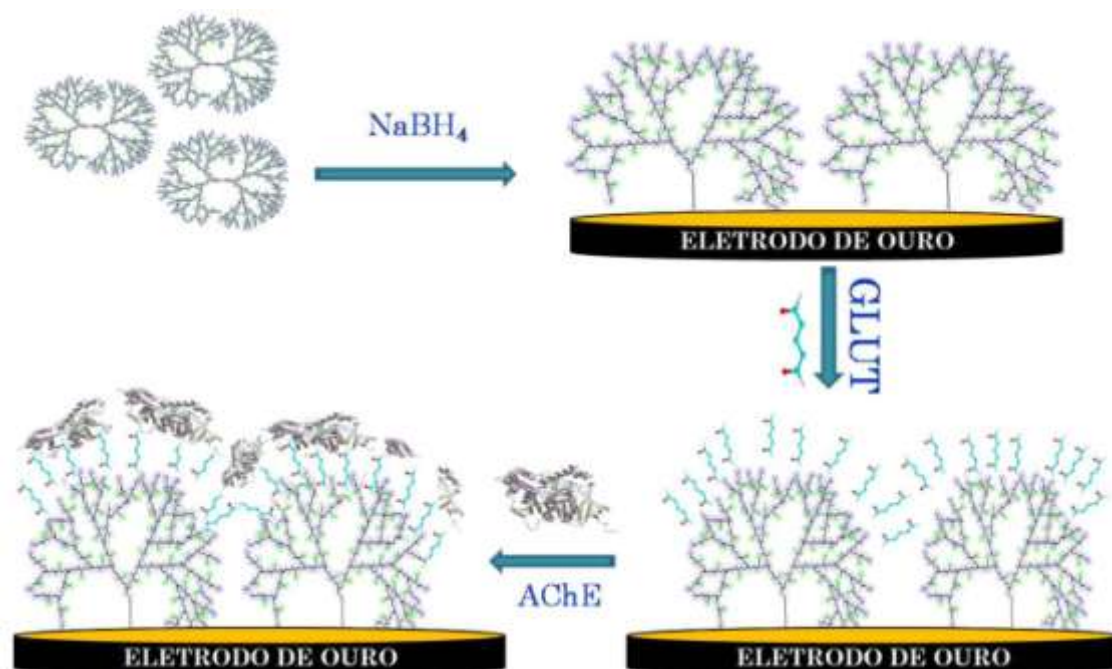
ocorreu com diferentes tempos de imersão: 3, 6, 12, 24 e 48 h. O eletrodo modificado foi designado como Au/PAMAM.

Para a otimização do tempo de formação da monocamada foram realizadas medidas de voltametria cíclica em H_2SO_4 0,5 mol. L^{-1} com $v = 50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, com janela de varredura de potencial de 0,2 a 1,6 V. Também foram realizados estudos de dessorção redutiva utilizando a técnica de voltametria linear, onde foi utilizado como eletrólito NaOH 0,5 mol. L^{-1} com janela de varredura de potencial de -0,2 à -1,4 V e $v = 20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

3.4 Estudo da influência do método de imobilização da AChE sobre Au/PAMAM

Dois métodos foram utilizados para a imobilização da enzima AChE sobre o eletrodo Au/PAMAM: *dip coating* e *drop coating*. Em ambos os procedimentos foi utilizado glutaraldeído (GLUT) após a modificação pela monocamada. Este procedimento constituiu-se na imersão do eletrodo Au/PAMAM na solução de GLUT por 1 hora, sendo que a concentração de GLUT foi otimizada. A faixa de concentração estudada variou de 0,1 a 10% (v/v). Após o período de imersão, o eletrodo foi lavado com água destilada, para remover o excesso de moléculas não adsorvidas. A Figura 2 apresenta o esquema idealizado do eletrodo Au/PAMAM/AChE.

Figura 2 Esquema idealizado do biossensor Au/PAMAM/AChE.



Fonte: O autor.

A imobilização realizada pelo procedimento *dip coating* ocorreu pela imersão do eletrodo modificado, na solução da enzima AChE por um período de 12 h. A faixa de concentração de enzima estudada foi de 62 a 496 U. mL⁻¹. A imobilização pelo procedimento *drop coating* foi realizada pelo gotejamento de 10 µL da solução enzimática sobre a superfície do eletrodo. Para comparação entre os procedimentos adotados, a concentração da solução da enzima foi de 496 U. mL⁻¹. Após a deposição da enzima, o eletrodo foi armazenado em recipiente refrigerado por 12 h. Em seguida, este eletrodo foi lavado com solução PBS 0,1 mol. L⁻¹, pH = 7,5, para remover as moléculas fracamente adsorvidas.

Tanto o eletrodo de Au como os eletrodos (Au/PAMAM, Au/PAMAM/GLUT, Au/PAMAM/GLUT/AChE) foram caracterizados pelas técnicas de voltametria cíclica e de EIE utilizando PBS 0,1 mol. L⁻¹, pH = 7,5, na presença de 5,0 mmol. L⁻¹ do par redox [Fe(CN)₆]^{-3/-4}. A faixa de varredura de potencial utilizada foi de -0,2 a 0,6 V vs Ag|AgCl, com $v = 50 \text{ mV. s}^{-1}$.

Com o intuito de investigar o perfil voltamétrico das diferentes arquiteturas foram realizadas medidas de voltametria cíclica com janela de varredura de 0,0 a 0,4 V vs Ag|AgCl, na presença de AChI com concentração de 5,0 mmol. L⁻¹, em PBS 0,1 mol. L⁻¹, pH = 7,5. Também foram realizadas medidas de voltametria cíclica na faixa de potencial de 0,0 a 0,80 V vs Ag|AgCl, tanto na presença de AChI como na presença de KI com concentração fixa de 0,5 mmol. L⁻¹.

Estudos de otimização da concentração de glutaraldeído e de unidades enzimáticas^{54,55} foram realizados a partir de medidas cronoamperométricas realizadas na presença de AChI com concentração fixa de 1,0 mmol. L⁻¹, e potencial de +0,28 V vs Ag|AgCl (determinado com base no potencial de pico obtido dos voltamogramas cíclicos) e tempo de análise de 300 s.

Com o intuito de averiguar a atividade catalítica da enzima AChE imobilizada, foram realizadas medidas cronoamperométricas com adições sucessivas de 100 µL da solução estoque de iodeto de acetiltiocolina 10,0 mmol. L⁻¹, obtendo-se a faixa de concentração de 99,0 a 2.000 µmol. L⁻¹. As medidas foram realizadas em PBS 0,1 mol. L⁻¹ e pH = 7,5.

A otimização do tempo de imersão na solução de carbaril foi realizada na faixa de 0,3 a 10 min, com concentrações fixas de carbaril 5,0 µmol. L⁻¹ e AChI 1,0 mmol. L⁻¹ e potencial de +0,28 V vs Ag|AgCl e tempo de análise de 300 s. As medidas foram realizadas em PBS 0,1 mol. L⁻¹, pH = 7,5. Entre as medidas foi necessário efetuar a regeneração do sítio ativo da enzima, que ocorreu pela lavagem com solução PBS 0,1 mol. L⁻¹, pH = 7,5 e em seguida o eletrodo foi imerso por 5 min na solução de AChI 10,0 mmol. L⁻¹. A porcentagem de reativação foi estimada com base na corrente inicial gerada pela oxidação do substrato enzimático na

concentração fixa de $1,0 \text{ mmol. L}^{-1}$ antes e após a interação com o pesticida na concentração fixa de $5,0 \text{ } \mu\text{mol. L}^{-1}$.

3.5 Determinação de Carbaril

Para a determinação de carbaril foram realizadas medidas cronoamperométricas em potencial fixo de $+0,28 \text{ V}$, com tempo de análise de 300 s , em 10 mL de PBS $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,5$, contendo $1,0 \text{ mmol. L}^{-1}$ de AChI. A concentração de carbaril variou de $1,0$ a $9,0 \text{ } \mu\text{mol. L}^{-1}$ com tempo de imersão de 5 min . Entre uma medida e outra o eletrodo Au/PAMAM/AChE foi submetido ao processo de reativação da enzima descrito no item anterior.

3.6 Medidas Eletroquímicas

Para a realização das medidas eletroquímicas utilizou-se uma célula eletroquímica com capacidade de 10 mL contendo três eletrodos: um eletrodo auxiliar de platina (Pt) com área de $1,0 \text{ cm}^2$, como eletrodo de referência Ag|AgCl e como eletrodo de trabalho ouro com área de $0,028 \text{ cm}^2$.

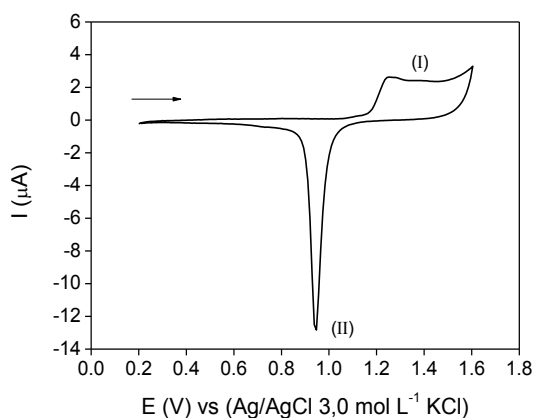
As medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram realizadas em potencial de circuito aberto (OCP) com amplitude de onda senoidal de 10 mV , na faixa de frequência de 10 kHz a $0,1 \text{ Hz}$. Utilizou-se como eletrólito suporte 10 mL de solução tampão PBS $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,5$ na presença da molécula sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$ $5,0 \text{ mmol. L}^{-1}$. O equipamento para as medidas eletroquímicas foi um potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT 100 usando os softwares GPES 4.7 e FRA. Os dados obtidos a partir dos resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica foram tratados utilizando o software Zview.

4 Resultados e Discussão

4.1 Pré- tratamento do eletrodo de ouro

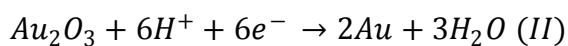
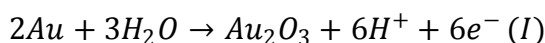
A limpeza do substrato de Au é uma etapa crucial na formação de monocamadas, pois impurezas podem dificultar a adsorção das moléculas ou causar defeitos diminuindo a reprodutibilidade e a estabilidade da monocamada formada. Deste modo é necessário seguir os procedimentos de limpeza mecânica, química e eletroquímica.³³ A Figura 3 apresenta o perfil voltamétrico do ouro após o processo de limpeza.

Figura 3 Voltamograma cíclico referente ao eletrodo de ouro, eletrólito suporte H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 50 \text{ mV. s}^{-1}$.



Fonte: O autor.

O voltamograma apresenta processos anódicos no intervalo de 1,2 a 1,5 V vs Ag|AgCl, proveniente da formação de hidróxido e óxido de ouro, e um pico catódico em 0,94 V, referente à redução dos compostos formados na varredura anódica. Os processos redox podem ser descritos pelas seguintes reações.^{34,35}



No potencial de 1,25 V a etapa I é constituída pela formação de um óxido hidratado que pode ser representado como $\text{Au}(\text{OH})_3$ ou $\text{Au}_2\text{O}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, já no potencial de 1,42 V há a formação do óxido de ouro anidro (Au_2O_3). Como pode ser visto no voltamograma apresentado na Figura 3, o pico catódico refere-se à redução da monocamada de óxido formada.^{34,36,37}

Utilizando a Equação 1 e a razão entre a área do pico catódico apresentado na Figura 3 e a velocidade de varredura foi possível estimar a densidade de carga.

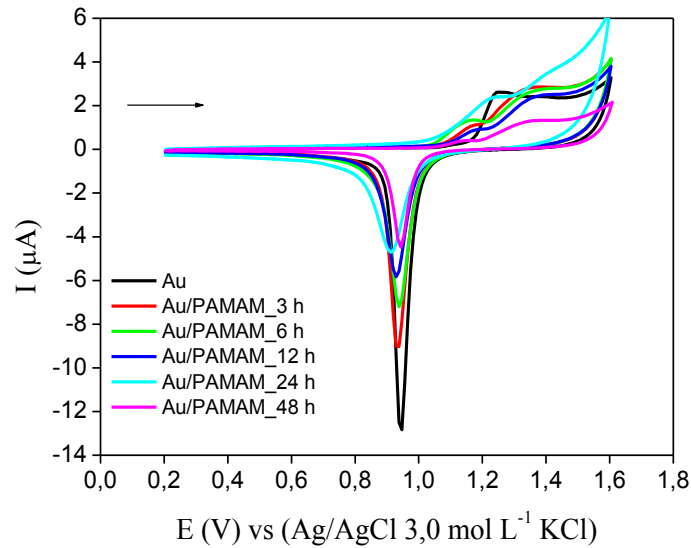
$$Q = \left(\frac{\int \text{area do pico catódico}}{v} \right) \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde $\int \text{area do pico catódico}$ é integral da área do pico catódico (A.V), v é velocidade de varredura em ($\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$) e Q é carga necessária para remover a camada de óxido adsorvido sobre a superfície do eletrodo de ouro (Coulomb).³⁸ O valor da carga obtida a partir do pico catódico do eletrodo de ouro sem modificação foi de 244 μC . Este valor foi utilizado como base para estimar o recobrimento superficial parcial dos eletrodos modificados com diferentes tempos de imersão.

4.2 Formação da monocamada de PAMAM-G4

Entre os vários alcanotióis que podem ser utilizados para a formação de monocamadas foi escolhido o poli(amidoamina) de quarta geração com núcleo de cistamina para modificar a superfície do substrato de ouro, pois este dendrímero tem em seu núcleo uma ligação dissulfeto, a qual permite a quimissorção direta sobre a superfície do eletrodo de ouro. Além disso, esta molécula apresenta uma estrutura tridimensional ramificada com 64 grupos aminos terminais, os quais a torna atrativa para a imobilização de biomoléculas.^{39,40} Para otimizar o processo de recobrimento pela monocamada de PAMAM-G4, foi realizado o estudo do tempo de imersão. O resultado da influência do tempo no recobrimento da superfície do eletrodo de ouro com a monocamada é apresentado na Figura 4.

Figura 4 (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de H_2SO_4 0,5 mol. L^{-1} , $v = 50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ do eletrodo Au/PAMAM obtido com diferentes tempos de imersão na solução de PAMAM $\sim 50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ no intervalo de tempo de 3 a 48 h.



Fonte: O autor.

A quimissorção de tióis pode ocorrer nos primeiros minutos após a imersão do eletrodo na solução do adsorvente.⁸ Este fato pode ser constatado observando a intensidade de pico catódico dos voltamogramas apresentados na Figura 4. Porém, verifica-se que a formação da monocamada é dependente do tempo de imersão, pois a intensidade da corrente de pico catódico diminui em função do aumento do mesmo. A partir da carga catódica dos eletrodos Au/PAMAM obtidos com diferentes tempos de imersão e a Equação 2 foi possível estimar o recobrimento parcial superficial (θ).^{41,42}

$$\theta (\%) = \left(\frac{Q_{\text{ouro}} - Q_{\text{modificado}}}{Q_{\text{ouro}}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

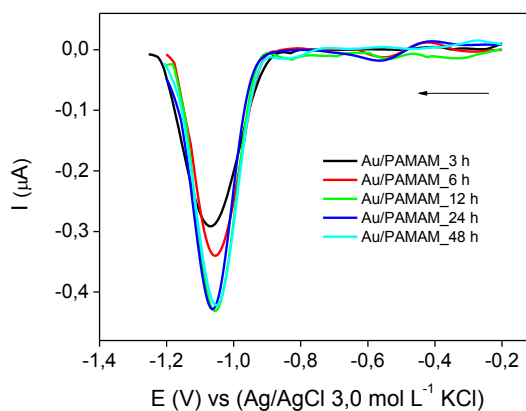
Onde Q_{ouro} é a carga do eletrodo sem modificação e $Q_{\text{modificado}}$ é carga do eletrodo modificado, as quais foram calculadas de acordo com a Equação 1. Os resultados de recobrimento superficial estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 Recobrimentos superficiais parciais (θ), dos eletrodos modificados com diferentes tempos de imersão na solução de PAMAM-G4.

Tempo (horas)	Carga (μC)	θ (%)
Au	244,0	-
3	169,8	30,7
6	131,8	45,9
12	106,0	56,5
24	85,7	64,0
48	81,4	66,5

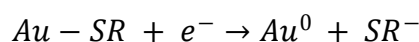
Como pode ser visto na Tabela 1, após três horas de imersão já ocorre a quimissorção das primeiras moléculas de PAMAM-G4. Porém, além da quimissorção, é necessário tempos de imersão maiores, pois é necessário que as moléculas adsorvidas se organizem, o que ocorre pelas interações intermoleculares entre as mesmas⁴³. No caso do dendrímero PAMAM-G4, as interações predominantes são do tipo ligações de hidrogênio, devido à grande quantidade de grupos aminos espalhados por toda a estrutura, fato que contribui no aumento de θ e na estabilidade da monocamada. Comparando os valores de recobrimento obtidos nos tempos de imersão, verifica-se que utilizando 12 h de imersão há um recobrimento de 56,5%, dobrando este tempo para 24 h verifica-se que há um aumento de apenas 13%. No entanto, o aumento do tempo para 48 h acarretou um acréscimo de 3,8% no θ . A partir destes resultados é possível afirmar que 12 h pode ser o tempo necessário para formar e estabilizar a monocamada de PAMAM-G4. Estes resultados foram comparados com os de dessorção redutiva, obtidos do eletrodo Au/PAMAM construído em diferentes tempos de imersão. Os voltamogramas lineares provenientes destes estudos são apresentados na Figura 5.

Figura 5 Voltamogramas lineares com correção de linha base obtidos em solução de NaOH 0,5 mol. L⁻¹, $\nu = 20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, provenientes da dessorção redutiva dos eletrodos Au/PAMAM obtidos com diferentes tempos de imersão no intervalo de 3 a 48 h.



Fonte: O autor.

Monocamadas formadas a partir de tiois podem apresentar dessorção redutiva⁴⁴ durante a varredura de potencial catódico com valores superiores a -0,7 V vs Ag|AgCl, porém o potencial de pico de dessorção é dependente do tamanho da cadeia carbônica e das interações entre elas.⁴⁵ O mecanismo redox envolvido na dessorção redutiva é apresentado a seguir.



O processo de dessorção inicia-se nos defeitos existentes na monocamada e progride para regiões de maior organização. Analisando os resultados, verifica-se que os voltamogramas apresentaram potencial de pico catódico em -1,06 V. Este valor de potencial é superior ao apresentado por alcanotióis de cadeia curta, os quais apresentam potencial de pico em torno de -0,9 V, e semelhante à dessorção de alcanotióis de cadeia longa (com mais de 8 átomos de carbono), cujos potenciais de pico catódicos encontram-se em torno de -1,0 V vs Ag|AgCl.⁴⁶ Este fato pode ser atribuído às forças intermoleculares entre os grupos funcionais terminais presentes na estrutura do dendrímero. Portanto, o potencial de pico pode variar em função do tamanho da cadeia carbônica e da organização da monocamada.⁴⁴ Observando os voltamogramas lineares verifica-se que houve o aumento da intensidade da corrente de pico em função do tempo de imersão. A partir destes resultados e utilizando a Equação 3, foi possível estimar a concentração de moléculas adsorvidas sobre a superfície do eletrodo, também denominada de excesso superficial (Γ).⁴⁷

$$\Gamma = \frac{Q}{n_e F A} \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde (Γ) é o excesso superficial em mol. cm⁻², (Q) é a carga calculada a partir do pico catódico gerado pela dessorção redutiva, (n_e) é o número de elétrons transferidos por molécula, (F) é a constante de Faraday e (A) é a área geométrica do eletrodo (cm²). A Tabela 2 resume os valores de excesso superficial (Γ) nos diferentes tempos de imersão.

Tabela 2 Valores de excesso superficial (Γ) obtidos dos voltamogramas dos eletrodos modificados com diferentes tempos de imersão na solução de PAMAM-G4 ~ 50 mmol. L⁻¹.

Tempo (horas)	Carga (μ C)	Γ (nmol cm ⁻²)
3	15,5	6,4
6	17,9	7,4
12	22,5	9,3
24	22,4	9,3
48	22,1	9,1

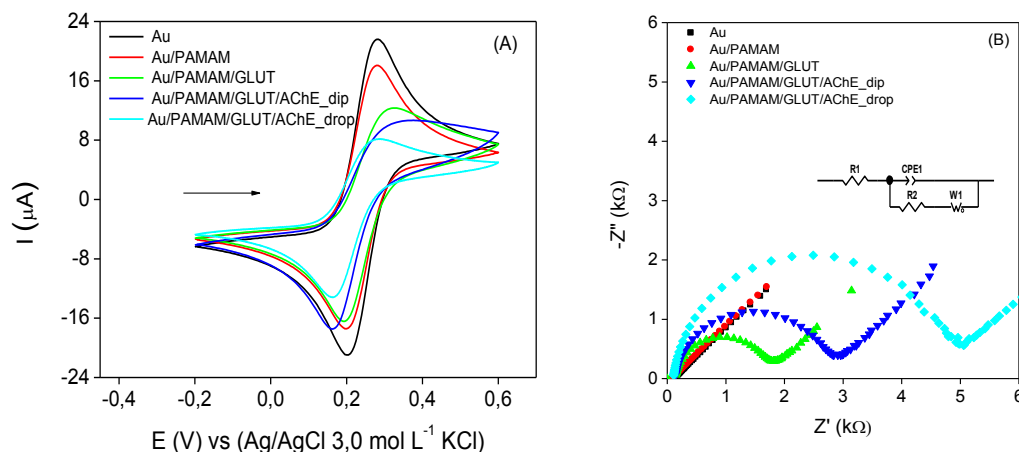
Durante a dessorção redutiva, verificou-se que a concentração de moléculas de PAMAM-G4 adsorvidas não aumentou significativamente com tempos de imersão superiores a 12 h. Comparando estes resultados com os de recobrimento superficial verifica-se que há uma divergência, pois dobrando o tempo para 24 h houve o aumento de 13% no θ . Este fato pode ser associado à reorganização das moléculas adsorvidas, tornando a monocamada mais compacta em função do aumento do tempo de imersão, dificultando a formação da camada de óxido de ouro e consequentemente ocorre à diminuição da carga catódica. Portanto, 12 h foi o tempo de imersão estipulado para a formação da monocamada, e utilizado para as demais caracterizações.

4.3 Imobilização da enzima AChE sobre Au/PAMAM

Após a otimização do processo de formação da monocamada, esta plataforma foi utilizada para a imobilização da enzima AChE. A enzima AChE apresenta atividade máxima em torno do pH = 7,5,⁴⁸ porém neste pH, o PAMAM-G4 apresenta os grupos aminos parcialmente protonados, pois há grupos aminos primários e secundários, os quais apresentam os seguintes valores de pKa 9,0 e 5,8,²¹ respectivamente. Portanto, foi necessária a utilização de glutaraldeído no processo de imobilização da enzima para garantir a estabilidade da mesma sobre o eletrodo Au/PAMAM. As etapas envolvidas no processo de imobilização da enzima foram avaliadas por voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. Os resultados destas caracterizações na presença da molécula sonda são apresentados nas Figuras 6 A e 6 B, para

todas as etapas de formação do biossensor, utilizando-se os métodos de *dip coating* e *drop coating*.

Figura 6 (A) Voltamogramas cíclicos obtidos dos eletrodos Au e Au/PAMAM/AChE obtidos pelos diferentes métodos (*dip coating* e *drop coating*) na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, 5,0 mmol. L⁻¹, pH = 7,5, $\nu = 50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. (B) Diagrama de Nyquist das diferentes superfícies eletródicas na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, 5,0 mmol. L⁻¹, pH = 7,5.



Fonte: O autor.

Utilizando a metodologia de circuitos equivalentes (inserido na Figura 6), ajustou-se os dados de EIE. O circuito proposto consiste em um resistor (R_1) representando a resistência da solução (PBS 0,1 mol. L⁻¹ na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, 5,0 mmol. L⁻¹), outro elemento (R_2) representando a resistência de transferência de carga (R_{ct}) causada pelos processos faradaicos na interface eletrodo/solução, um elemento de fase constante (CPE) representando a capacitância da dupla-camada elétrica e um elemento (W_1) o qual representa a difusão semi-finita.

Analisando os resultados, tanto de voltametria como de impedância, apresentados na Figura 6 A e 6 B, respectivamente, observa-se que houve a redução das intensidades de correntes de pico e o aumento da resistência de transferência de carga (R_{ct}) em função do bloqueio causado pela monocamada de PAMAM-G4 e pelas etapas posteriores, comparado ao eletrodo de ouro não modificado. Os dados obtidos dos voltamogramas e dos diagramas de Nyquist estão resumidos na Tabela 3.

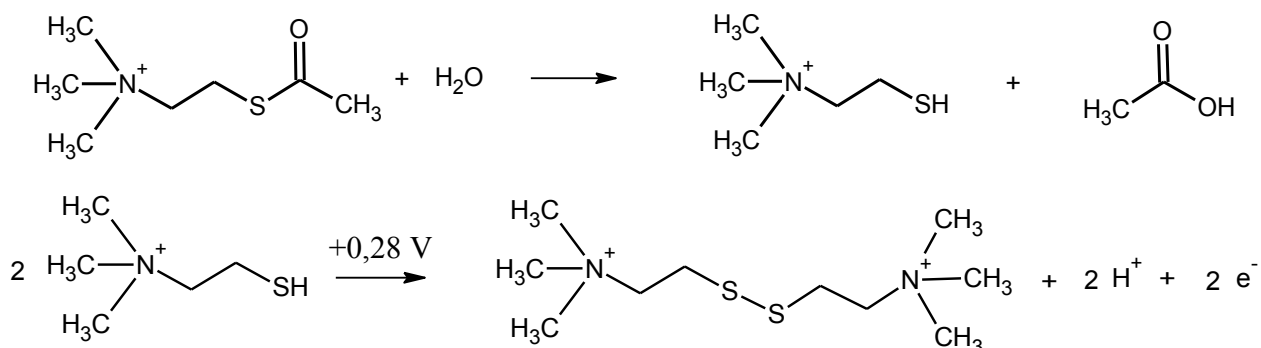
Tabela 3 Parâmetros eletroquímicos obtidos dos voltamogramas cíclicos e dos espectros de Nyquist das diferentes etapas de modificação do eletrodo de Au.

Eletrodo	I _{pa} (μA)	ΔE _p (V)	*R _{ct} (kΩ)
Au	21,2	0,07	0,14
Au/PAMAM	18,0	0,08	0,15
Au/PAMAM/GLUT	11,4	0,12	0,29
Au/PAMAM/GLUT/AChE_dip	8,0	0,20	2,82
Au/PAMAM/GLUT/AChE_drop	7,8	0,11	4,92

*R_{ct} = resistência a transferência de carga.

Comparando-se os métodos de imobilização da AChE, verifica-se que enzima imobilizada pelo método *drop coating* apresentou a maior R_{ct}, além das correntes de picos reduzirem consideravelmente em relação ao eletrodo modificado pelo método *dip coating*. Este fato pode ser relacionado à maior quantidade de enzima imobilizada pelo método *drop coating* ou a conformação adotada pela enzima imobilizada. A qual bloqueou parcialmente a superfície do eletrodo dificultando acesso da molécula sonda ao eletrodo de Au e desta forma reduziu as correntes de picos geradas no processo redox da molécula sonda. Por esta razão, para verificar qual o método mais adequado para construção do biossensor foi averiguada a resposta eletroquímica das diferentes arquiteturas na presença do substrato AChI. A enzima AChE tem como substrato enzimático a molécula acetilcolina (ACh), a qual é hidrolisada pela enzima.⁴⁹ Embora ocorra à hidrólise da ACh, não ocorre à transferência de elétrons, porque ACh não é eletroativa. No entanto, o iodeto de acetiltiocolina (AChI) pode atuar como substrato enzimático, pois esta molécula é hidrolisada pela enzima e o produto da hidrólise a tiocolina dimeriza-se formando o dímero ditio-*bis*-colina. O mecanismo envolvido nesta reação é apresentado na Figura 7.

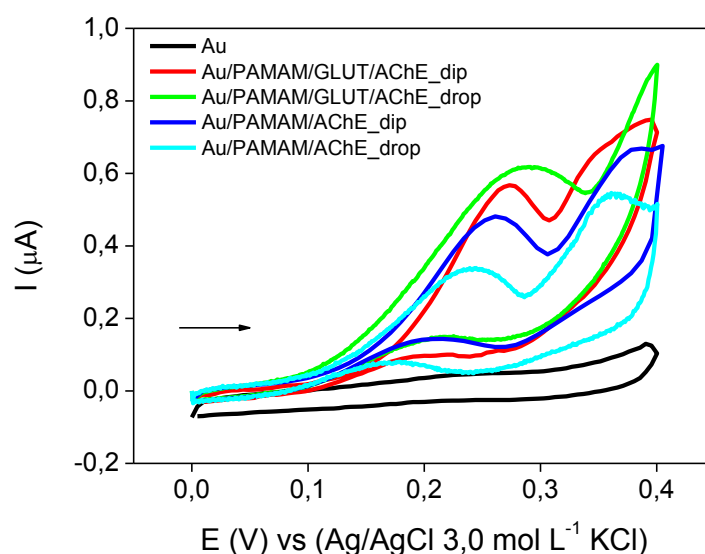
Figura 7 Esquema da reação de hidrólise da molécula de AChI no centro ativo da AChE.⁴⁸



Fonte: Adaptado da referência 45.

Como pode ser visto no mecanismo anterior, na dimerização da tiocolina ocorre à liberação de dois elétrons, os quais são evidenciados nos voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 8.

Figura 8 Voltamogramas cíclicos obtidos na presença de AChI 5,0 mmol. L⁻¹, em PBS 0,1 mol. L⁻¹, pH = 7,5, $\nu = 10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, utilizando-se diferentes configurações de eletrodos.



Fonte: O autor.

Como pode ser visto nos voltamogramas apresentados na Figura 8, todas as configurações de eletrodos apresentaram potencial de pico anódico em aproximadamente $0,25 \pm 0,02 \text{ V}$, o qual é atribuído a formação do dímero ditio-*bis*-colina, porém verifica-se que há variações nas intensidades de correntes de pico em função do método adotado para imobilizar a enzima AChE. Com intuito de comparar as intensidades de corrente de picos com maior precisão, foi realizado um procedimento matemático de deconvolução mediante o uso do software Microcal Origin® (versão 6.0). Para este processo, foi fixado o potencial de pico em cada voltamograma, para a posterior aplicação da análise gaussiana. Os valores das intensidades das correntes de pico obtidas das diferentes arquiteturas de eletrodos após a deconvolução são apresentados na Tabela 4.

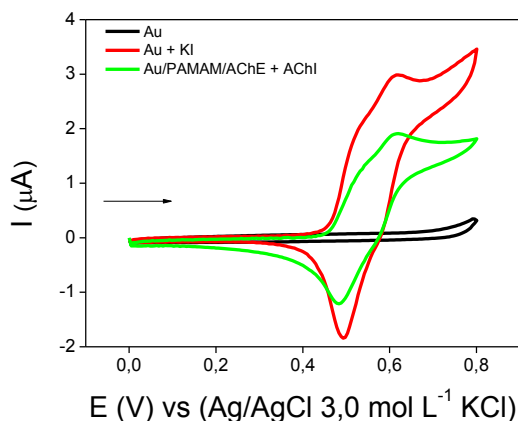
Tabela 4 Valores de correntes de pico anódica obtidas da deconvolução dos voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 8.

Eletrodo	I_{pa} (μA)
Au/PAMAM/GLUT/AChE_dip	0,47
Au/PAMAM/GLUT/AChE_drop	0,40
Au/PAMAM/AChE_dip	0,30
Au/PAMAM/AChE_drop	0,26

*Os termos dip e drop, referem-se aos procedimentos utilizados para imobilizar a enzima AChE sobre o eletrodo Au/PAMAM.

Apesar dos estudos anteriores indicarem que a quantidade de enzima imobilizada pelo procedimento *drop coating* (Au/PAMAM/GLUT/AChE_drop) pode ser maior em relação ao *dip coating* (dados mostrados na Tabela 4), verifica-se que o eletrodo que apresentou a maior intensidade de corrente de pico na presença do substrato AChI foi o biossensor em que a enzima foi imobilizada pelo método *dip coating* com GLUT (Au/PAMAM/GLUT/AChE_dip). Este fato provavelmente está relacionado à conformação adotada pela enzima durante a ligação cruzada com glutaraldeído. Devido à grande quantidade de enzima adsorvida aleatoriamente pelo método *drop coating*, pode ocorrer à formação de agregados, os quais dificultam ou inibem o acesso do substrato ao centro ativo da enzima.^{50,51} O eletrodo de Au sem a enzima também apresentou uma pequena corrente de pico, o que pode ser decorrente de uma pequena quantidade do substrato enzimático o qual se hidrolisa em meio aquoso, mas a intensidade de corrente é menor quando comparada aos biossensores. Entretanto, analisando os voltamogramas da Figura 8, verifica-se que há um segundo processo que se inicia em aproximadamente +0,4 V. Com o intuito de investigar este segundo processo a janela de varredura de potencial foi ampliada e foram realizadas medidas tanto na presença de AChI como na presença de KI, pois o substrato enzimático apresenta o iodeto como contra íon. Os resultados destes estudos são apresentados na Figura 9.

Figura 9 Voltamogramas cíclicos obtidos dos eletrodos Au na presença de KI 0,5 mmol. L⁻¹ e Au/PAMAM/AChE na presença de AChI 0,5 mmol. L⁻¹, em solução PBS 0,1 mol. L⁻¹, pH = 7,5, $\nu = 30 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

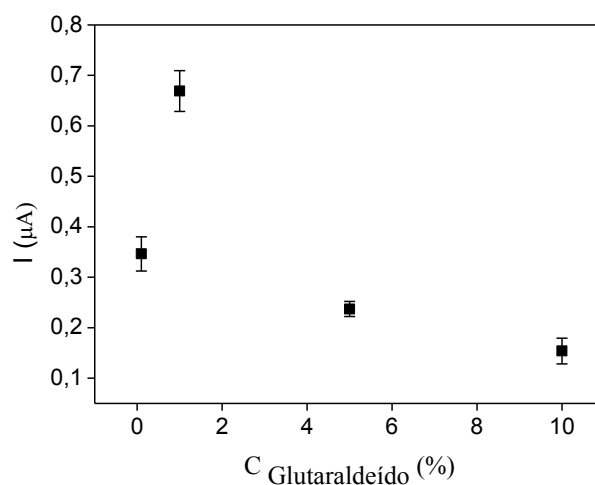


Fonte: O autor.

Analisando-se os voltamogramas, verifica-se que utilizando o eletrodo de Au na presença de KI, pode ser observados dois processos redox com potenciais de pico em $E_{pa1} = 0,48 \text{ V}$ (pouco definido) e $E_{pa2} = 0,63 \text{ V}$, assim como para o eletrodo Au/PAMAM/AChE na presença de AChI com potenciais de pico em $E_{pa1} = 0,47$ e $E_{pa2} = 0,61 \text{ V}$. Comparando os voltamogramas verifica-se que apesar dos valores de E_{pa} serem deslocados os perfis voltamétricos se assemelham, tanto na presença de AChI como na presença de KI. Estes resultados podem ser um indicativo de que pode estar ocorrendo à formação do íon triiodeto.^{52,53}

A sensibilidade do biossensor pode ser afetada em função da concentração de glutaraldeído, devido à redução da atividade catalítica no caso das enzimas, pois a ligação cruzada entre a enzima e a superfície do transdutor, pode ocasionar alterações na conformação nativa da biomolécula e agregação, dificultando o acesso do substrato enzimático ao sítio ativo.^{54,55} Neste sentido, foi averiguada a influência da concentração de GLUT, na resposta eletroquímica do biossensor utilizando a técnica de cronoamperometria (Figura 10.), com potencial fixo em +0,28 V, pois este foi o potencial de pico anódico observado nos voltamogramas cíclicos, na caracterização do eletrodo Au/PAMAM/AChE na presença de AChI.

Figura 10 Correlação entre a corrente anódica e a concentração de glutaraldeído na faixa de 0,1 a 10%, para o eletrodo (Au/PAMAM/AChE_{dip}), na presença de AChI 1,0 mmol. L⁻¹, em PBS 0,1 mol. L⁻¹, pH = 7,5, potencial fixo em +0,28 V e tempo de 300 s. (n = 3)

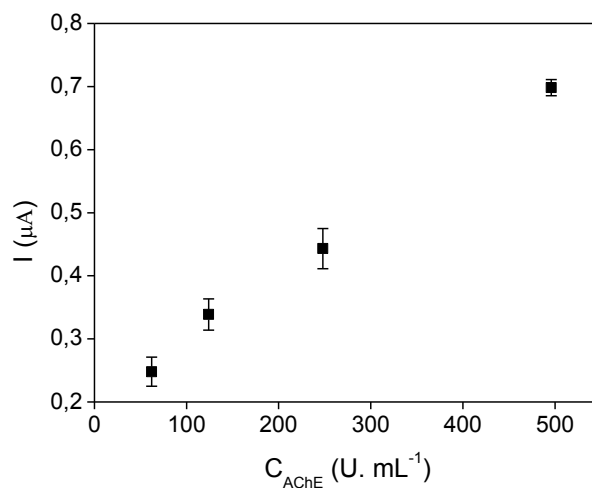


Fonte: O autor.

A concentração de GLUT afeta significativamente a sensibilidade do biossensor, pois ao comparar as intensidades de correntes, verifica-se que na presença de GLUT 10%, o biossensor Au/PAMAM/AChE apresentou intensidade de corrente 72% menor, comparada ao biossensor construído com solução de GLUT 1%. Este fato pode estar relacionado à desnaturação da enzima durante a imobilização.^{55,56} Portanto a concentração de 1% de GLUT foi mantida constante para as demais caracterizações eletroquímicas.

Mantendo-se a concentração do glutaraldeído em 1%, a influência da concentração enzimática foi avaliada (Figura 11).

Figura 11 Correlação entre a intensidade de corrente e a concentração de unidades enzimáticas, dados obtidos do eletrodo (Au/PAMAM/GLUT/AChE) preparados com diferentes concentrações da enzima, na faixa de 62 a 496 U. mL⁻¹, e GLUT 1% na presença de AChI 1,0 mmol. L⁻¹, em PBS 0,1 mol. L⁻¹, pH = 7,5. Potencial fixo em +0,28 V e tempo de 300 s. (n = 3)

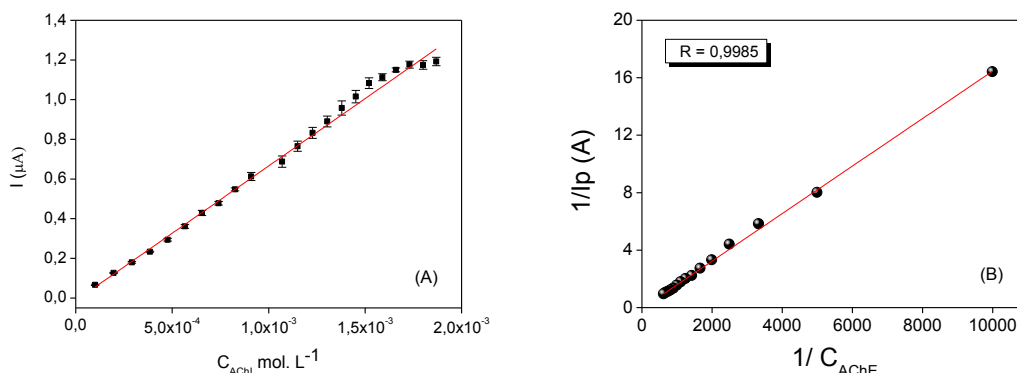


Fonte: O autor.

A Figura 11 apresenta a correlação entre a variação de corrente e a concentração da enzima AChE. Verifica-se que houve um incremento na intensidade de corrente de pico em função do aumento da concentração de unidades enzimáticas no intervalo estudado (62–496 U.). Provavelmente a intensidade da corrente deve aumentar ainda mais com o aumento das unidades enzimáticas, porém isto implicaria num aumento do custo do biossensor. Portanto a concentração de 496 U. mL⁻¹ foi utilizada para a construção do mesmo.

O processo de imobilização da enzima sobre o eletrodo pode afetar a atividade catalítica da enzima, portanto, foram realizadas medidas cronoamperométricas utilizando diferentes concentrações do substrato enzimático. A Figura 12 mostra o desempenho do biossensor.

Figura 12 (A) Correlação entre a intensidade de corrente e a variação de concentração de AChI na faixa de 99,0 a 2.000 $\mu\text{mol. L}^{-1}$, em PBS 0,1 mol. L^{-1} , pH = 7,5, no potencial de +0,28 V, (n = 3). (B) Correlação de Lineweaver-Burk.



Fonte: O autor.

Como pode ser observado na Figura 12 A, no início da reação entre o AChI e a enzima AChE há uma correlação linear entre a corrente anódica e a concentração de substrato, pois neste estágio, a velocidade de formação do complexo enzima/substrato segue uma lei de velocidade de segunda ordem, pois depende tanto da concentração de sítios ativos disponíveis quanto da concentração de substrato.⁵⁷ Entretanto, concentrações superiores a 1,5 mmol. L^{-1} de AChI ocasionaram um estado estacionário na corrente de pico, pois a reação atingiu a velocidade máxima devido à saturação dos sítios ativos disponíveis. Neste estágio, a velocidade da reação é independente da concentração de substrato, e este perfil é característico de reações de ordem zero em relação ao substrato e de primeira ordem em relação à decomposição do complexo enzima/substrato no processo de formação do produto catalisado pela enzima.⁵⁸

Utilizando a regressão linear obtida do gráfico do duplo recíproco e a equação de Lineweaver-Burk⁵⁹ Eq. 4, foi possível calcular a constante aparente de Michaelis-Menten (K_M^{app}).^{60,61}

$$\frac{1}{I_{ss}} = \left(\frac{1}{I_{max}} \right) + \left(\frac{K_M^{\text{app}}}{I_{max} C} \right) \quad (\text{Eq. 4})$$

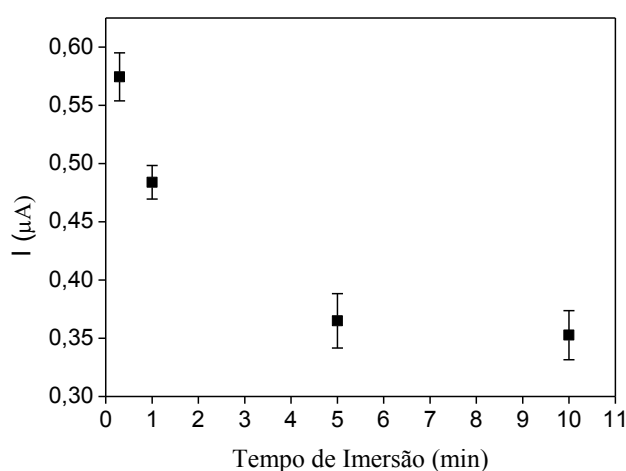
Onde I_{ss} é o valor da corrente no estado estacionário depois da primeira adição do substrato enzimático, I_{max} equivale a máxima corrente após a saturação do sítio ativo da enzima, C representa a concentração do substrato enzimático na solução após a saturação. O K_M^{app} obtido para este biossensor foi de 2,9 mmol. L^{-1} . De acordo com a literatura,⁶² a K_M^{app} da AChE (*Electrophorus electricus*) livre, determinada pelo método de Ellman's, é de 0,2 mmol. L^{-1} . Este valor de K_M^{app} é característico da enzima e seu substrato, entretanto comparando os valores de

K_M^{app} da enzima livre e imobilizada é evidente a redução da afinidade da enzima imobilizada, pois o processo de imobilização pode alterar a conformação nativa da enzima e reduzir a afinidade.⁶³ Entretanto, o valor de K_M^{app} determinado para este biossensor, é próximo ao apresentado na literatura para um biossensor baseado na imobilização da AChE, sobre o eletrodo de carbono vítreo modificado com o dendrímero PAMAM e nanotubos de carbonos ($1,66 \text{ mmol. L}^{-1}$)⁶⁴ e para um biossensor onde a enzima foi adsorvida sobre a superfície de eletrodo de carbono impresso modificado com polietilenoimina ($1,5 \text{ mmol. L}^{-1}$).⁶⁵

4.4 Estudo da resposta do biossensor Au/PAMAM/AChE na presença de carbaril

A enzima AChE possui um sítio ativo onde existem três resíduos principais de aminoácidos, a serina, a histidina e o ácido glutâmico os quais podem interagir com pesticidas. Desta forma a conformação do sítio catalítico é alterada impedindo o processo de hidrólise da acetiltiocolina. Portanto, a detecção do carbaril é realizada com base na redução da intensidade da corrente anódica, proveniente da dimerização do produto da hidrólise catalisada pela enzima. Assim, o tempo de imersão na solução de carbaril é uma variável importante na sensibilidade do biossensor. Neste sentido, a influência deste parâmetro foi avaliada e o resultado é apresentado na Figura 13.

Figura 13 Respostas amperométricas do biossensor Au/PAMAM/AChE obtidas em PBS $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$, pH = 7,5, na presença de $1,0 \text{ mmol. L}^{-1}$ de AChI, potencial aplicado de +0,28 V, com diferentes tempos de imersão (0,3 a 10 min.) na solução de carbaril $5,0 \text{ } \mu\text{mol. L}^{-1}$. (n = 3)



Fonte: O autor.

Na presença do substrato enzimático AChI com concentração de $1,0 \text{ mmol. L}^{-1}$ o biossensor apresentou intensidade de corrente de $0,7 \text{ } \mu\text{A}$. Após a imersão do biossensor por

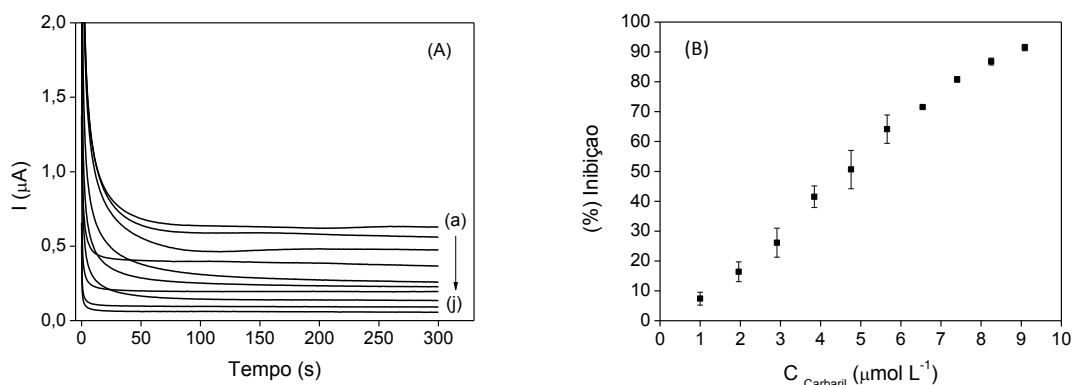
30 s na solução de carbaril, a intensidade de corrente diminuiu para 0,55 μA . Aumentando o tempo de imersão para 60 s, a intensidade de corrente diminuiu para 0,4 μA . Entretanto, tempos de imersão superiores a 300 s não apresentaram reduções significativas nas intensidades de corrente (0,3 μA). O tempo de 300 s é semelhante a outros trabalhos já reportados na literatura para a inibição da enzima AChE.^{30,73} Este tempo de imersão relativamente curto, é um indicativo de que há afinidade do inibidor pelo sítio ativo da enzima, entretanto, nem todos os sítios disponíveis foram ocupados pelo inibidor, pois mesmo não havendo variações na intensidade de corrente, ainda há uma corrente residual. Este resultado sugere que há uma competição pelo sítio ativo entre o substrato e o inibidor.⁶⁶

O processo de inibição enzimática causada por pesticidas carbamatos é reversível, e pode durar apenas algumas horas, desde que a enzima esteja em contato com solventes aquosos. Isto ocorre porque a inibição envolve a formação de um complexo enzima-pesticida pouco estável, o qual pode ser hidrolisado, liberando desta forma o centro ativo da enzima, porém este processo pode ser acelerado utilizando procedimentos de regeneração.⁶⁷

O procedimento de reativação do biossensor utilizado neste trabalho consistiu na lavagem do biossensor com PBS 0,1 mol. L⁻¹ e em seguida o dispositivo foi imerso por 5 min na solução do substrato enzimático 10,0 mmol. L⁻¹. O método utilizado é simples, porém eficiente, pois o processo permitiu a regeneração de 90% da corrente inicial. Portanto no intervalo entre as medidas na presença do pesticida, o biossensor foi submetido ao procedimento de reativação. Este procedimento é bem descrito no trabalho de e Bucur et al.⁶⁷

Como pode ser visto na Figura 14, a sensibilidade do biossensor foi averiguada em diferentes concentrações do pesticida.

Figura 14 (A) Cronoamperogramas obtidos com diferentes concentrações da solução do pesticida carbaril na faixa de 1,0 a 9,0 $\mu\text{mol. L}^{-1}$, com concentração fixa de AChI de 1,0 mmol. L^{-1} em PBS 0,1 mol. L^{-1} pH = 7,5, potencial aplicado de 0,28 V (B) Correlação entre a % inibição e a concentração de carbaril. (n = 3)



Fonte: O autor.

A partir dos cronoamperogramas obtidos nas diferentes concentrações de carbaril (Figura 14 A), verificou-se que há uma correlação linear com a corrente anódica. A partir desta e utilizando a Equação 5 foi possível estimar a porcentagem de inibição, a qual é apresentada pela Figura 14 B.

$$I\% = \frac{i_0 - i_c}{i_0} \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde $I\%$ representa a porcentagem de inibição da atividade enzimática, i_0 representa a corrente inicial na presença de AChI e i_c representa a corrente após a interação com a solução do pesticida.⁶⁸ Verifica-se que com o aumento da concentração ocorre aumento da porcentagem de inibição no intervalo de 9,8 a 92%.

Utilizando a correlação linear entre a variação de concentração de carbaril e a corrente anódica, a qual é descrita pela seguinte equação $y = 7,08 \times 10^{-7} + 0,0757x$, com coeficiente de correlação de $R = 0,9705$ e o desvio padrão de dez brancos (0,823 nA), foram determinados seguindo-se os critérios estabelecidos pela IUPAC,⁶⁹ os limites de quantificação ($LQ = 0,032 \mu\text{mol. L}^{-1}$) e de detecção ($LD = 0,0108 \mu\text{mol. L}^{-1}$). A Tabela 5 apresenta o comparativo entre os LD apresentados por diferentes biossensores para a detecção de carbaril.

Tabela 5 Comparativo entre os LD dos diferentes biossensores na detecção de carbaril.

Eletrodo	LD ($\mu\text{mol. L}^{-1}$)	Faixa linear ($\mu\text{mol. L}^{-1}$)	Referência
Carb ^d /CoPc ^e /AChE	2,0	5,0 – 75,0	73
GC ^a /MWCNT ^b /PANI ^c /AChE	1,4	9,9 – 49,6	32
Au/MPA/AChE	0,035	2,0 – 30,0	70
Au/PAMAM/AChE	0,010	1,0 – 9,0	Este trabalho
Au/MPA ^f /AChE-ChO ^g	0,006	0,01 – 1,0	71
GC/Chit-PB ^h /AChE	0,003	0,01 – 0,4	72

^aGC_eletrodo de carbono vítreo, ^bMWCNT_ nanotubos de paredes múltiplas, ^cPANI_polianilina, ^dCarb_eletrodo de pasta de carbono, ^eCoPc_ftalocianina de cobalto, ^fMPA_ácido 3-mercaptopropiônico, ^gAChE-ChO_enzimas acetilcolinesterase e colina oxidase, ^hChit-PB_compósito quitosana e nanopartículas de azul da Prússia.

Analisando os dados da Tabela 5 verifica-se que o LD apresentado pelo biossensor desenvolvido neste trabalho é comparável a outros sistemas reportados na literatura.^{32,73} Portanto o dispositivo Au/PAMAM/AChE apresenta-se como uma alternativa viável na detecção do pesticida carbaril.

4.5 Estabilidade do biossensor Au/PAMAM/AChE

Com o intuito de determinar a vida útil do dispositivo, realizou-se o monitoramento diário da resposta do biossensor durante 10 dias, totalizando 10 medidas. Entre uma medida e outra o biossensor foi armazenado em PBS 0,1 mol L⁻¹ em pH = 7,5 e refrigerado a 4 °C. As medidas foram realizadas na presença de AChI 1,0 mmol. L⁻¹. Verificou-se que após a quinta medida a corrente apresentada foi de 90% da corrente inicial. Após um período de armazenamento de 10 dias e consequentemente a décima medida, o sensor apresentou 60% da corrente inicial. No trabalho de Cancino et al.³⁰ é relatado o desenvolvimento de um biossensor para a detecção de carbaril. Este biossensor foi construído sobre eletrodo de ouro funcionalizado com uma monocamada mista de MPA e MUA e sobre esta plataforma foi imobilizada por adsorção física a enzima AChE. Estudos de estabilidade mostram que o biossensor apresentou 75 % da resposta inicial após 50 medidas consecutivas durante um período de 15 dias.

5 Conclusões

A formação da SAM pela quimissorção direta do dendrímero PAMAM-G4 seguido pelo rearranjo das moléculas PAMAM-G4 adsorvidas sobre o eletrodo de ouro e também a recobrimento pela monocamada, foi evidenciada pelos resultados de voltametria cíclica e de redução dessortiva utilizando voltametria linear. Em função da estrutura tridimensional ramificada, da presença dos grupos funcionais terminais na plataforma formada (Au/PAMAM) e da metodologia *dip coating* com o auxílio de glutaraldeído empregada na imobilização da enzima AChE, proporcionou a enzima imobilizada uma orientação favorável, facilitando o acesso do substrato enzimático aos sítios ativos, pois o sensor Au/PAMAM/AChE apresentou as maiores intensidades de corrente anódicas na presença do substrato enzimático.

Estudos do tempo de imersão na presença da solução de carbaril mostraram que 5 min são suficientes para ocorrer o bloqueio dos sítios ativos das enzimas. Os estudos de regeneração empregados na reativação do biossensor, além de eficientes indicaram que afinidade da enzima pelo substrato é maior do que pelo carbaril, pois foi possível reativar o Au/PAMAM/AChE utilizando a solução de AChI em um curto intervalo de tempo.

A estratégia utilizada para modificar o eletrodo de ouro com a monocamada do dendrímero PAMAM-G4 apresentou-se promissora para o desenvolvimento de biossensores, pois o limite de detecção ($LD = 0,0108 \mu\text{mol. L}^{-1}$) apresentado pelo biossensor na determinação de carbaril, foi semelhante ou inferior a outros biossensores eletroquímicos.

CAPÍTULO II

Desenvolvimento e aplicação de um imunossensor eletroquímico sobre monocamadas auto-organizadas para a detecção qualitativa de anticorpos *T. cruzi*

1 Introdução

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) algumas doenças, tais como: malária, dengue, leishmanioses, esquistossomose, tuberculose, doença de Chagas entre outras, são denominadas de doenças negligenciáveis ou reemergentes.⁷⁴ Entre estas doenças, a Tripanossomíase americana, também conhecida como doença de Chagas, é uma das mais comuns, e anualmente responsável por centenas de mortes. De acordo com relatório da OMS, aproximadamente 8 milhões de pessoas estão infectadas, e mais de 25 milhões de pessoas residem em área de risco.^{75,76}

A doença de Chagas foi descrita pela primeira vez em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas, e devido à disseminação do parasita para o continente americano, a doença ficou conhecida como tripanossomíase americana. A tripanossomíase americana é uma infecção parasitária causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, e transmitida pelas fezes dos insetos pertencente da classe dos *triatomíneos*, conhecido popularmente por barbeiro.⁷⁶

As técnicas mais comuns utilizadas no diagnóstico da doença incluem análises imunológicas (hemaglutinação indireta (IHA), imunofluorescência indireta (IFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA)). De acordo com Ferrer et al.⁷⁷ as técnicas imunológicas apresentam-se seletivas, porém dependendo do estágio da doença a sensibilidade é baixa podendo apresentar resultados falso positivo ou falso negativo. Portanto, segundo os critérios estabelecidos pela OMS, a análise de possíveis pacientes infectados, deve ser realizada por duas técnicas, caso haja divergência nos resultados, deve-se usar uma terceira.⁷⁸

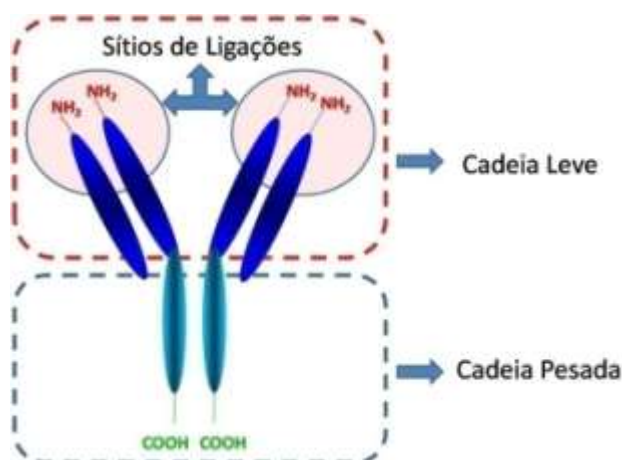
Neste sentido, o desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos apresenta-se como uma alternativa complementar para o diagnóstico da tripanossomíase americana e outras patologias. Os imunossensores eletroquímicos pertencem à classe de biossensores, nos quais se utiliza um antígeno (AG) (ou um fragmento da biomolécula responsável pela especificidade) ou anticorpo (AB), como molécula biológica reconhecadora acoplada a um transdutor de sinal, que pode detectar e quantificar concentrações da espécie complementar. A detecção da formação do imunocomplexo pode ser realizada pelo método direto ou indireto. Para monitorar a detecção eletroquímica pelo método indireto é necessário que o anticorpo seja marcado, como por exemplo, com compostos fluorescentes e enzimas, tais como, as peroxidases, glucose oxidase e luciferase. A peroxidase de raiz forte (HRP), em função da robustez é mais utilizada, nestes casos as espécies marcadas são denominadas de conjugados.^{79,80} A configuração básica dos imunossensores marcados consiste na imobilização de um anticorpo monoclonal (este anticorpo é proveniente de somente um linfócito B, e replicado diversas vezes como um clone, o qual se

liga somente a um determinado epítopo, região específica do antígeno). Sobre a superfície do transdutor, este anticorpo ao interagir com um antígeno forma o imunocomplexo. Uma vez o antígeno ligado ao anticorpo imobilizado, este complexo pode ser reconhecido por um anticorpo secundário, geralmente um policlonal marcado, como por exemplo, com a enzima HRP. Desta forma pode-se detectar e quantificar variações de concentração do antígeno pela corrente gerada pela oxidação ou redução do substrato enzimático, peróxido de hidrogênio.^{81,82}

A detecção eletroquímica da formação do imunocomplexo pelo método direto é mais simples, e apresenta menor custo comparado ao método indireto, pois dispensa o uso do anticorpo secundário marcado.¹²⁵ Neste método o antígeno ou anticorpo (mono ou policlonal) é imobilizado na superfície do substrato e pode interagir com a espécie complementar resultando na formação do imunocomplexo, o qual pode ser monitorado utilizando técnicas voltamétricas ou de espectroscopia de impedância eletroquímica.¹²⁵

Os antígenos também chamados de imunógenos são geralmente glicoproteínas de alta densidade, que em um organismo vertebrado induz o sistema imunológico a produzir anticorpos que atacam o imunógeno em uma região específica, denominada de epítopo, resultando em uma resposta imune.^{83,84} Os anticorpos constituem uma classe de glicoproteínas conhecidas como imunoglobulinas, os quais são produzidos pelo sistema imunológico de vertebrados, mais precisamente pelos linfócitos. Estas biomoléculas são essenciais para a prevenção e combate às infecções causadas por imunógenos. Os anticorpos podem ser divididos em cinco classes (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE), o que os difere, é a sequência de aminoácidos que constituem a estrutura da proteína. Porém, a maioria dos anticorpos presentes no sistema imunológico dos mamíferos são do tipo IgG.^{85,86} A Figura 15 apresenta a estrutura idealizada e generalizada dos anticorpos.

Figura 15 - Esquema idealizado da estrutura de anticorpos.



Fonte: O autor.

De maneira geral os anticorpos IgG assim como os demais, apresentam estruturas na forma de Y, peso molecular médio de 150 kDa, constituídos por dois tipos de cadeias polipeptídicas, denominadas de leve e pesada. Cada molécula de anticorpo apresenta duas cadeias leves e duas pesadas. As duas cadeias pesadas são ligadas entre si por duas ligações dissulfetos, e estas são ligadas as cadeias leves por uma ligação dissulfeto. Ambas as cadeias são constituídas por sequências de aminoácidos, entretanto, as extremidades das cadeias leves, apresentam uma região variável constituída por uma sequência de 110 resíduos de aminoácidos, e esta região é responsável pela atividade biológica e especificidade de ligação dos anticorpos com os respectivos antígenos.^{87,88} Já a cadeia pesada é denominada de região constante, também é constituída por uma sequência de aminoácidos, entretanto esta região apresenta uma elevada densidade de grupos carboxílicos terminais.⁸⁹

Entre as técnicas que podem ser utilizadas na construção de imunossensores eletroquímicos a *self assembled monolayer* (SAM) apresenta-se como uma alternativa promissora, pois monocamadas de tióis sobre eletrodos de ouro, além de conferirem estabilidade à funcionalização, alguns tióis apresentam grupos funcionais terminais, os quais permitem a imobilização de anticorpos ou antígenos com orientação adequada para estabelecer a interação específica com a espécie complementar.^{90,91}

Diversos trabalhos têm relatado o desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos utilizando a técnica SAM. Por exemplo, Lin et al.⁹² utilizaram a técnica SAM para construir um imunossensor impedimétrico aplicado na detecção de adenovirus do tipo 5. O dispositivo foi construído sobre a superfície de eletrodo de ouro modificado com uma monocamada de 1,6-hexanoditiol (HDT). Com o intuito de aumentar a área superficial do eletrodo Au/HDT, este foi imerso em uma solução contendo nanopartículas de ouro (AuNp), em seguida o eletrodo Au/HDT/AuNp foi imerso na solução do ácido 3-mercaptopundecanóico (MUA). Sobre a plataforma Au/HDT/AuNp/MUA foram imobilizados covalentemente utilizando EDC/NHS os AB anti-adenovirus do tipo 5. As variações nos valores de R_{ct} demonstraram que o imunossensor proposto apresentou resposta a variações de concentrações do vírus.

Martins et al.⁹³ desenvolveram um imunossensor eletroquímico para detecção de um dos agentes que mais causam intoxicações alimentares, a bactéria *Staphylococcus aureus*. O dispositivo foi desenvolvido sobre a superfície de um eletrodo de ouro modificado com monocamadas de cisteamina, para imobilização da proteína A, a qual é constituinte da parede celular da *Staphylococcus* e capaz de estabelecer uma ligação com bactéria. Foram estudados diferentes métodos, tais como: adsorção física, ligação covalente utilizando EDC/NHS e ligação cruzada com glutaraldeído. Porém, o método utilizando a ligação covalente foi o que

proporcionou ao dispositivo maior estabilidade. O imunossensor voltamétrico apresentou resposta na detecção da bactéria em amostras de queijo contaminadas, com limite de detecção de 33,9 ng. mL⁻¹.

Entre as várias possibilidades de alcanotióis, o ácido 3-mercaptopropiônico (3-MPA) constitui uma alternativa vantajosa no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos, pois o 3-MPA é um alcanotiól de cadeia curta, fato que viabiliza a transferência de elétrons e o tempo de formação e estabilização da monocamada é relativamente menor, comparado a tióis de cadeias maiores.⁴⁶ Outro fator importante é a presença dos grupos carboxílicos terminais, os quais apresentam pKa em torno 5,6,⁹⁴ e que no pH fisiológico os grupos funcionais estão desprotonados, fato que viabiliza a imobilização de biomoléculas, seja pela interação eletrostática ou pela utilização de agentes de ligação cruzada.⁹⁵ Recentemente Braiek et al.⁹⁶ relataram o desenvolvimento de imunossensor impedimétrico para a detecção da bactéria *Staphylococcus aureus*. O imunossensor foi desenvolvido sobre eletrodos de ouro modificados com monocamadas do ácido 3-mercaptopropiônico, os quais após a ativação dos grupos carboxílicos com EDC/NHS permitiram a imobilização dos anticorpos *anti-S aureus*. A sensibilidade do dispositivo foi avaliada em diferentes concentrações de *Staphylococcus*, apresentando limite de detecção de 10 CFU. mL⁻¹. Assim como a bactéria *Staphylococcus* a *Listeria monocytogenes* é um agente patogênico de origem alimentar que pode causar várias doenças tais como: meningite, gastroenterite, septicemia. Neste sentido, Cheng et al.⁹⁷ desenvolveram um imunossensor eletroquímico, utilizando um eletrodo de ouro com SAM do ácido 3-mercaptopropiônico, ativado com EDC/NHS, modificado com anticorpos monoclonais anti-*Listeria*. O eletrodo obtido foi imerso na solução contendo as células da bactéria *Listeria monocytogenes* em diferentes concentrações, sendo posteriormente gotejado sobre o mesmo uma solução com concentração fixa dos anticorpos policlonais biomarcados com a enzima HRP. Utilizando a técnica de cronoamperometria e o substrato enzimático (peróxido de hidrogênio), foi avaliada a sensibilidade do imunossensor variando a concentração de solução contendo a bactéria na faixa de 1,0 x 10² a 1,0 x 10⁶ CFU. mL⁻¹, apresentando limite de detecção de 1,0 x 10¹ CFU. mL⁻¹. Como pode ser constatado, a detecção da bactéria *Listeria* é realizada de forma indireta, isto é, a concentração do analito, neste caso da bactéria é diretamente proporcional a intensidade da corrente gerada pela redução do peróxido de hidrogênio.

O desenvolvimento de imunossensores para detecção de tripanossomíase americana utilizando-se diferentes técnicas de imobilização tem sido reportado na literatura. O trabalho de Luz et al.⁹⁸ reporta o desenvolvimento de um imunossensor para a detecção de tripanossomíase americana utilizando eletrodo de ouro modificado com SAM mista dos tióis ácidos

3-mercaptopropiônico e 11-mercaptoundecanoico, sobre a qual os antígenos *T. cruzi* foram covalentemente imobilizados utilizando EDC/NHS. Os possíveis sítios de ligações não específicas foram bloqueados com albumina de soro bovino (BSA). As etapas de modificação e também a detecção dos anticorpos *T. cruzi* em amostras de soro foi realizada de forma direta utilizando a técnica de ressonância de plasma de superfície (SPR), pela variação do ângulo da radiação incidente. O imunossensor apresentou resposta às variações de concentração de amostras de soro contaminadas com anticorpos *T. cruzi* até o fator de diluição 1:1.280 e seletivo a detecção de anticorpos *T. cruzi* na presença dos componentes constituintes da amostra de soro. Outro exemplo é relatado por Ferreira et al.⁹⁹ no qual os autores relataram a detecção eletroquímica indireta de anticorpos *T. cruzi* utilizando um eletrodo impresso de ouro modificado com SAM de cisteamina (CYS). Sobre a plataforma Au/CYS, foram imobilizados covalentemente os antígenos *T. cruzi* utilizando glutaraldeído e os sítios não específicos foram posteriormente bloqueados com BSA. Neste caso, a detecção dos anticorpos da amostra de soro foi realizada de forma indireta e, portanto, após incubar o eletrodo na solução contendo os AB *T. cruzi* foi necessário incubar o eletrodo na solução contendo AB secundário marcado com a enzima HRP. Portanto, a detecção dos anticorpos *T. cruzi* foi realizada com base na corrente de redução do peróxido de hidrogênio gerada pela reação catalisada pela enzima HRP.

Os imunossensores eletroquímicos que dispensam o uso de marcadores, ou seja, que detectam a imunorreação pelo método direto, são tão sensíveis quanto aqueles que detectam a formação do imunocomplexo indiretamente, entretanto os livres de marcadores são menos onerosos, pois dispensam o uso de anticorpos secundários.

2 Objetivos

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver um imunossensor eletroquímico, o qual será aplicado na detecção direta de anticorpos *T. cruzi* em amostras de soro. O processo de construção do imunossensor consistiu na modificação do eletrodo de ouro pela formação de uma monocamada do tiol ácido 3-mercaptopropiônico (3-MPA). Sobre a plataforma formada, foi imobilizado covalentemente os antígenos do protozoário *Trypanosoma cruzi*.

2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência dos parâmetros (concentração e tempo de imersão) envolvidos no processo de formação da monocamada do tiol ácido 3-MPA;
- Caracterizar eletroquimicamente as etapas de formação do eletrodo Au/MPA/AG/BSA, utilizando-se as técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica na presença da molécula sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$;
- Otimizar os parâmetros (concentração e tempo de imersão) envolvidos no processo de imobilização dos antígenos (AG);
- Averiguar o melhor tempo de incubação em amostras de soro contendo anticorpos (AB) provenientes da doença;
- Realizar testes de seletividade e sensibilidade em amostras de soros na presença e na ausência de AB.

3 Materiais e Metodologias

3.1 Reagentes e Soluções

Para o desenvolvimento do imunossensor foi utilizado eletrodo de ouro policristalino com diâmetro de 2 mm, comercializado pela BASi®. Os antígenos *T. cruzi*, assim como os anticorpos *anti-T. cruzi* foram obtidos do kit laboratorial para a determinação qualitativa de tripanossomíase americana, comercializado pela Gold Analisa®. O kit é constituído por eritrócitos estabilizados de aves e sensibilizados com componentes antigênicos do *Trypanosoma cruzi*. Os anticorpos *T. cruzi* estão contidos em amostras de soro de carneiro em PBS 0,1 mol. L⁻¹. Todas as diluições necessárias foram realizadas em PBS 0,1 mol. L⁻¹, pH = 7,2. A dosagem protéica total dos anticorpos *T. cruzi* (0,6 g. L⁻¹), *Toxoplasma* (1,0 g. L⁻¹), bem como antígenos *T. cruzi* (2,5 g. L⁻¹), foram determinadas pelo método de Bradford.¹⁰⁰ O método Bradford é um ensaio colorimétrico

utilizado para a determinação total de proteínas e baseia-se na absorbância do corante Coomassie Brilliant Blue G-250. Para determinar a dosagem protéica, foi utilizado o reagente de Bradford, que consiste em uma solução contendo 40 mg deste corante, 20 mL de etanol 95% (V/V) e 40 mL de ácido fosfórico 85% (V/V). O volume da solução final foi acertado para 100 mL com água ultrapura, em seguida a solução foi diluída na proporção de 1:3 com água ultrapura, em seguida foi filtrada.

Para as análises, o protocolo relatado na literatura foi adaptado para placas de ELISA. A curva padrão foi obtida utilizando-se de uma solução estoque de BSA, com concentração de $0,5 \mu\text{g. mL}^{-1}$. A partir da solução estoque foram realizadas diferentes diluições ($0,1 \mu\text{g. mL}^{-1}$, $0,2 \mu\text{g. mL}^{-1}$, $0,3 \mu\text{g. mL}^{-1}$, $0,4 \mu\text{g. mL}^{-1}$ e $0,5 \mu\text{g. mL}^{-1}$). Em cada poço da placa de ELISA, foram adicionados: $4,0 \mu\text{L}$ de cada uma das soluções diluídas de BSA, $36 \mu\text{L}$ de água ultrapura (milli-Q) e $160 \mu\text{L}$ do reagente de Bradford. Em seguida, realizou-se a leitura utilizando um leitor de ELISA (Bio-Rad) com comprimento de onda fixo em 595 nm.

Em cada um dos poços da placa de ELISA foram adicionados: $4 \mu\text{L}$ das amostra com concentração desconhecida, $36 \mu\text{L}$ de água ultrapura e $160 \mu\text{L}$ do reagente de Bradford e realizou-se a leitura como descrito na construção da curva analítica, obtidas em diferentes concentrações de BSA. A partir da regressão linear obtida da curva analítica, calculou-se a concentração protéica das amostras contendo os antígenos e anticorpos. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Os reagentes utilizados: n-hidroxisuccinimida (NHS), 1-etil-3-(3-cloridrato) dimetilaminopropil carbodiimida (EDC), ácido 3-mercaptopropiônico (3-MPA), hexacianoferrato de potássio (III) $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, hexacianoferrato de potássio (II) $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, hidróxido de sódio (NaOH), cloreto de sódio (NaCl), albumina de soro bovino (BSA), fosfato de sódio mono (NaH_2PO_4) e dibásico (Na_2HPO_4) foram adquiridos da Sigma Aldrich®. Os demais reagentes utilizados são de pureza analítica (PA). Todas as soluções foram preparadas com água destilada.

3.2 Otimização do processo de formação da monocamada de 3-MPA

O procedimento de limpeza utilizado foi o mesmo descrito no capítulo I, e está de acordo com o procedimento relatado por Carvalho et al.³³ Inicialmente foi averiguada a influência da concentração de 3-MPA na modificação do eletrodo. Neste estudo, o eletrodo de ouro foi imerso na solução de 3-MPA com diferentes concentrações (na faixa de $1,0 \text{ mmol. L}^{-1}$ a $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$) com tempo de imersão fixo em 30 min. Após a otimização da concentração da solução do tiol, o

eletrodo de ouro foi imerso na solução de 3-MPA com concentração fixa de $10,0 \text{ mmol. L}^{-1}$, com diferentes tempos de imersão: 30, 60, 180 e 360 min. Após cada modificação o eletrodo foi submetido ao processo de limpeza. As medidas eletroquímicas referentes à otimização da formação da monocamada de 3-MPA, foram realizadas em solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol. L}^{-1}$, $v = 30 \text{ mV. s}^{-1}$, e também em NaOH $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$, $v = 10 \text{ mV. s}^{-1}$.

3.3 Imobilização dos Antígenos

Para a imobilização dos antígenos (AG), os grupos carboxílicos presentes na monocamada do 3-MPA foram primeiramente ativados pela imersão do eletrodo Au/MPA em solução aquosa contendo $0,2 \text{ mol. L}^{-1}$ de EDC e $0,05 \text{ mol. L}^{-1}$ de NHS, durante 20 min, segundo procedimento já bem descrito na literatura.^{101,102}

Após ativação dos grupos carboxílicos da monocamada, o eletrodo foi imerso na solução de AG com diferentes concentrações, na faixa de $0,25$ a $2,5 \text{ g. L}^{-1}$ e tempo de imersão fixo em 5 min. Posteriormente à otimização da concentração de AG, foi estudado o tempo de imersão na solução de AG no intervalo de (5, 15, 30 e 60 min) sendo que a concentração de AG foi mantida constante $0,5 \text{ g. L}^{-1}$. Na etapa seguinte, o eletrodo foi lavado com PBS $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$ em pH 7,2. Finalizada a etapa da determinação das melhores condições de imobilização dos AG, os possíveis sítios de ligação não ocupados pelos AG, foram bloqueados pela imersão do eletrodo Au/MPA/AG na solução de BSA, sendo que a concentração utilizada foi estudada na faixa de 1 a 10 mg. mL^{-1} . O tempo de imersão nesta solução foi de 15 min. A Figura 16 mostra o esquema idealizado da formação do imunossensor (Au/MPA/AG/BSA).

Figura 16 Esquema idealizado da construção do sensor Au/MPA/AG/BSA.



Fonte: O autor.

3.4 Medidas eletroquímicas

Todas as otimizações realizadas, foram monitoradas tanto por voltametria cíclica quanto por espectroscopia de impedância eletroquímica, utilizando solução PBS 0,1 mol. L⁻¹, pH = 7,2 na presença da molécula sonda [Fe(CN)₆]^{-3/4} 0,5 mol. L⁻¹, com $v = 30 \text{ mV. s}^{-1}$. As medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram realizadas em potencial de circuito aberto (OCP) na faixa de frequência de 10 kHz a 0,1 Hz, com perturbação de onda senoidal de 10 mV.

3.5 Caracterizações por Microscopia de Força Atômica (AFM)

Com o intuito de investigar a morfologia das superfícies dos eletrodos modificados nas diferentes etapas de modificação, foram realizadas caracterizações por AFM. O equipamento utilizado para realizar as medidas, foi um microscópio marca SHIMADZU modelo SPM 9600 do Laboratório Multiusuários da UEPG. As imagens foram obtidas no modo não contato.

3.6 Regeneração do Imunossensor

De acordo com a literatura, os imunossensores podem ser regenerados pela dissociação do imunocomplexo. Para efetuar a regeneração do imunossensor, podem ser utilizadas soluções ácidas ou básicas com elevada força iônica.^{103,140}

A primeira estratégia avaliada, consistiu na imersão do imunossensor na solução contendo HCl, pH = 2,0 e NaCl 0,1 mol. L⁻¹. Neste período, o eletrodo Au/MPA/AG/BSA foi primeiramente imerso na solução de AB 0,6 g. L⁻¹ por 30 min. Após o período de incubação, utilizando a técnica de EIE foi avaliada a variação da Rct. Em seguida, o Au/MPA/AG/BSA/AB foi imerso na solução de HCl/NaCl por 5 min. Posteriormente, o imunossensor foi caracterizado e obtido o valor da Rct. Com o intuito de avaliar o procedimento de regeneração utilizado, o imunossensor foi novamente imerso na solução de AB com concentração de 0,6 g. L⁻¹ por 30 min em seguida o dispositivo foi caracterizado.

O mesmo procedimento foi utilizado para a solução contendo NaOH e NaCl 0,1 mol. L⁻¹, pH = 10. Os procedimentos de regeneração utilizados, foram realizados de acordo com os descritos na literatura.^{103,140}

3.7 Detecção da imunorreação entre antígenos e anticorpos *T. cruzi*

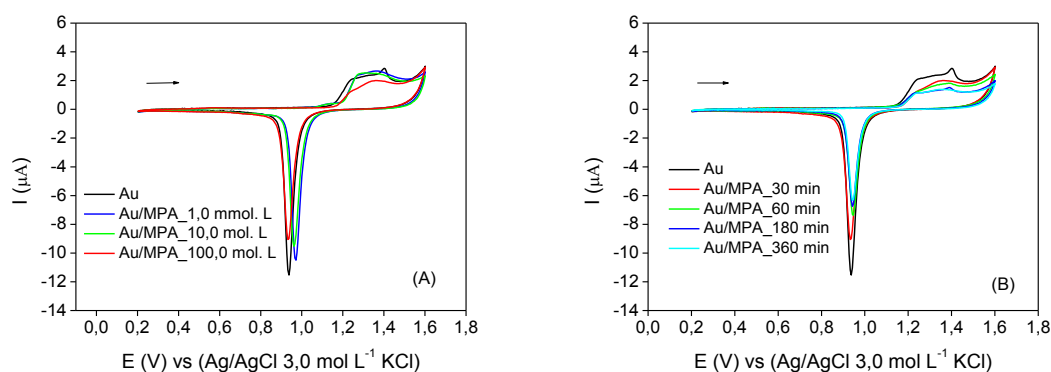
A resposta do imunossensor foi avaliada em amostras de soro contaminadas com AB com concentração de 0,6 g. L⁻¹. Neste experimento, o imunossensor foi imerso na solução contendo os AB por 30 min. Em seguida o dispositivo foi caracterizado por EIE e também por VC, na presença de [Fe(CN)₆]^{-3/4} 0,5 mol. L⁻¹ em PBS 0,1 mol. L⁻¹, pH = 7,2. Tanto os antígenos como os anticorpos *T. cruzi* foram obtidos a partir dos kits comerciais Gold Analisa, os quais foram utilizados sem purificações. A seletividade do Au/MPA/AG/BSA foi avaliada em amostras contaminadas com anticorpos *Toxoplasma* com fator de diluição de 0,6 g. L⁻¹. As medidas foram realizadas de maneira similar ao AB *T. cruzi*. O mesmo procedimento foi utilizado para a amostra de soro na ausência de AB (controle negativo). As medidas de EIE foram realizadas em potencial de circuito aberto (OCP) na faixa de frequência de 10 kHz a 0,1 Hz, com amplitude de onda senoidal de 10 mV.

4 Resultados e Discussão

4.1 Estudos da formação da monocamada de 3-MPA sobre o eletrodo de Au

Primeiramente, foi realizado o estudo do processo de formação da monocamada de 3-MPA. Desta forma, com o intuito de averiguar a porcentagem de recobrimento (θ) da monocamada do 3-MPA sobre a superfície do eletrodo, foram realizados estudos da influência do tempo de imersão e da concentração de 3-MPA. Os resultados voltamétricos nas diferentes condições são apresentados na Figura 17.

Figura 17 (A) Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado com 3-MPA em diferentes concentrações do 3-MPA na faixa de $1,0 \text{ mmol. L}^{-1}$ a $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$ e (B) com diferentes tempos de imersão em solução de 3-MPA $10,0 \text{ mmol. L}^{-1}$ no intervalo de 30 a 360 min, em solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol. L}^{-1}$, $v = 30 \text{ mV. s}^{-1}$.



Fonte: O autor.

Foi avaliada a redução da área do pico catódico causada pela quimissorção da monocamada em diferentes concentrações de 3-MPA, com tempo de imersão fixo em 30 min. A partir da Figura 17 (A), pode-se observar uma maior supressão da intensidade de corrente de pico quando foi utilizada a concentração de $10,0 \text{ mmol. L}^{-1}$. Concentrações superiores a $10,0 \text{ mmol. L}^{-1}$ não apresentaram variações significativas na redução da corrente de pico, provavelmente devido à saturação da superfície. Porém, utilizando-se concentrações inferiores a $1,0 \text{ mmol. L}^{-1}$, a supressão do sinal foi mínima, comparada a intensidade de corrente catódica do eletrodo não modificado.

Os resultados de VC sugerem que a partir da concentração do tiol $1,0 \text{ mmol. L}^{-1}$ e tempo de interação de apenas 30 min, já ocorre a formação da SAM, porém ainda incompleta e desorganizada. De acordo com a literatura, baixas concentrações requerem maiores tempos de imersão.^{43,104} Desta forma, para as demais caracterizações, a concentração de 3-MPA utilizada foi de $10,0 \text{ mmol. L}^{-1}$.

Estudos em diferentes tempos de imersão na solução de 3-MPA são mostrados na Figura 17 B. Como pode ser observado, a corrente de pico catódico diminuiu em comparação ao eletrodo de ouro não modificado já nos primeiros 30 min. Após 180 min de imersão, não são observadas variações significativas na redução da intensidade das correntes de pico, pois as cadeias carbônicas que estavam paralelas à superfície, alinham-se verticalmente promovendo maior ordenamento molecular até a saturação da superfície do eletrodo. Vale ressaltar que o tempo de adsorção está relacionada com o tamanho da cadeia carbônica e a presença de grupos funcionais terminais presentes na estrutura do adsorbato.¹⁰⁵ O tempo de imersão determinado para a formação da monocamada de 3-MPA, é semelhante ao relatado por Pedrosa et al.¹⁰⁶ e

Tsu et al.¹⁰⁷ A partir da carga do pico catódico nos diferentes tempos de imersão e a Equação 2, foi possível estimar os valores de recobrimento parcial superficial, cujos resultados são apresentados na Tabela 6.

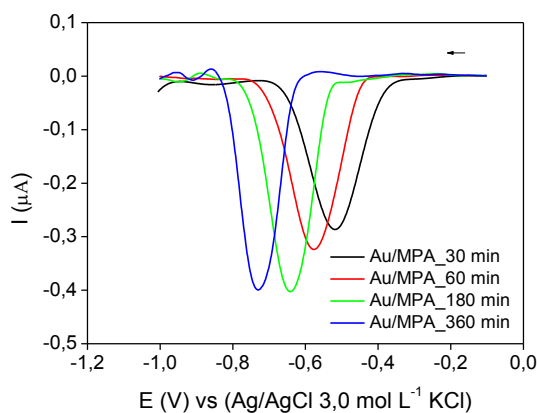
Tabela 6 Valores de recobrimentos superficiais parciais (θ) dos eletrodos modificados com diferentes tempos de imersão.

Tempo (min)	Carga (μC)	θ (%)
Au	212,0	-
30	167,0	21,2
60	137,9	34,9
180	122,9	42,0
360	116,4	45,0

Verifica-se que com 30 min de imersão já se tem um $\theta = 21,2$ %, o qual aumenta em função do tempo até 180 min onde o θ é de 42,0%. Para tempos de imersão superiores, este valor de θ manteve-se praticamente constante. Este fato pode estar relacionado ao empacotamento da monocamada, pois nos primeiros minutos as moléculas de tióis estão adsorvidas aleatoriamente sobre a superfície e θ é pequeno, com o aumento do tempo, as moléculas aleatoriamente adsorvidas se alinham perpendicularmente a superfície aumentando as interações intermoleculares, resultando em um empacotamento mais denso, proporcionando um aumento do recobrimento superficial.¹⁰⁵ A porcentagem de recobrimento está de acordo com os resultados apresentados por monocamadas formadas por outros tióis de cadeia curta.⁴¹ Estes resultados foram confrontados com os resultados de dessorção redutiva, os quais são apresentados na Figura 18.

A partir de estudos de dessorção redutiva eletroquímica é possível averiguar e estimar a estabilidade e número moléculas adsorvidas sobre a superfície do eletrodo (Figura 18).

Figura 18 Voltamogramas lineares provenientes da dessorção redutiva do eletrodo modificado com 3-MPA, construídos com diferentes tempos de imersão no intervalo de 30 a 360 min, em solução de NaOH 0,5 mol. L⁻¹, $\nu = 20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.



Fonte: O autor.

Monocamadas formadas por tióis podem dessorver da superfície durante a varredura de potencial catódico com valores superiores a $-0,4 \text{ V vs Ag|AgCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, porém o potencial de pico de dessorção é dependente do tamanho da cadeia carbônica e das interações entre elas.^{44,45}

O processo de dessorção inicia-se nos defeitos existentes na monocamada e progride para regiões de maior organização. Analisando os voltamogramas apresentados na Figura 18, verifica-se que ocorre o deslocamento do potencial e aumento da intensidade de corrente de pico em função do tempo de imersão. Este fato pode estar atribuído ao aumento da organização das moléculas adsorvidas, pois a organização assim como o empacotamento da monocamada é dependente do tempo de imersão do eletrodo na solução do tiol.¹⁰⁸

Para o Au/MPA obtido com tempo de imersão de 30 min, verifica-se um Epc em $-0,5 \text{ V}$. Este potencial é menor do que o apresentado por outras monocamadas formadas por alcanotióis de cadeia curta. Esta discrepância pode estar relacionada ao baixo empacotamento da SAM.^{108,109} Isto pode ser constatado ao comparar o valor de recobrimento superficial (θ) nestas condições, o qual é baixo ($\theta = 21,2$), indicando que o número de defeitos na monocamada é grande.

Comparando as intensidades de corrente de pico nos tempos de imersão de 180 e 360 min não se observam variações significativas nas mesmas, indicando que a partir de 180 min já ocorre à saturação da superfície. Porém com 360 min de imersão, o eletrodo apresentou o Epc em $-0,73 \text{ V}$, enquanto que em 180 min, o Epc foi de $-0,64 \text{ V}$. Este deslocamento do potencial para regiões mais negativas pode ser atribuído ao aumento da organização das moléculas adsorvidas.

Utilizando os dados de dessorção e a Equação 3, foi possível estimar o número de moléculas adsorvidas (Γ) nos diferentes tempos de imersão. Estes dados estão resumidos na Tabela 7.

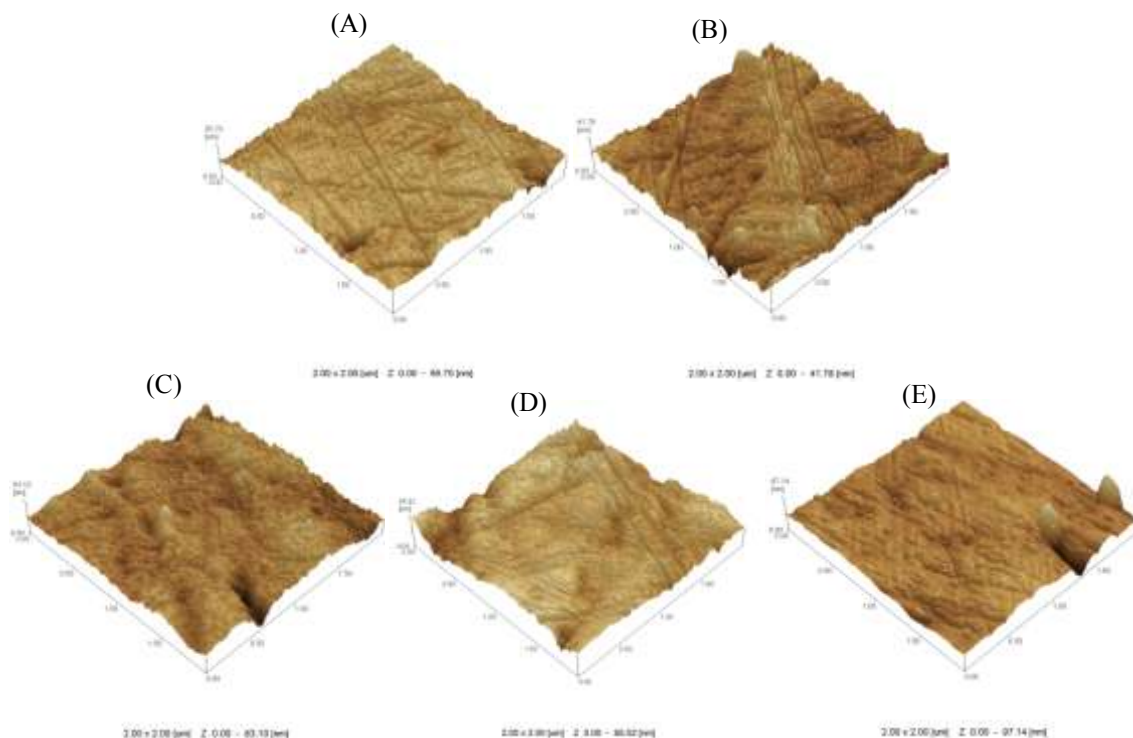
Tabela 7 Valores de excesso superficial (Γ) das moléculas adsorvidas sobre eletrodo de Au, determinados a partir dos voltamogramas lineares obtidos dos eletrodos modificados com SAM de 3-MPA em diferentes tempos de imersão.

Tempo (min)	Carga (μC)	Γ (nmol cm^{-2})
30	14,7	4,8
60	18,5	6,1
180	25,8	8,5
360	26,4	8,7

Analisando os dados apresentados na Tabela 7 verifica-se que o número de moléculas adsorvidas aumenta em função do tempo de imersão. Este fato está relacionado com a formação e estabilização da monocamada. O 3-MPA apresenta grupos carboxílicos terminais, os quais podem causar repulsões eletrostáticas, impedimentos estéricos e podem limitar o número de moléculas adsorvidas.¹⁰⁹ Fato que está de acordo com os resultados apresentados, pois verificou-se que tempos de imersão superiores a 180 min não proporcionaram aumento significativo na concentração de moléculas adsorvidas. Portanto, o tempo de imersão estipulado para a modificação do eletrodo foi de 180 min.

Como a organização das moléculas é alterada em função do tempo de imersão, provavelmente a rugosidade também deverá apresentar alterações. Portanto, o processo da formação da monocamada nos diferentes tempos de imersão foi averiguado utilizando a técnica de microscopia de força atômica (AFM). As imagens de AFM obtidas para filmes Au/MPA com diferentes tempos de imersão são apresentadas na Figura 19.

Figura 19 Imagens de AFM do eletrodo de ouro (A) e do eletrodo de ouro modificado com a monocamada de 3-MPA, formada com diferentes tempos de imersão (B) 30 min.; (C) 60 min.; (D) 180 min. e (E) 360 min.

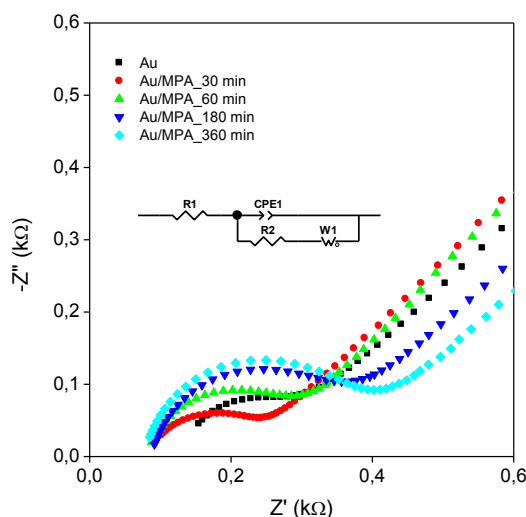


Fonte: O autor.

A partir das imagens de AFM foi determinada a rugosidade quadrática média (R_q) de cada uma das superfícies. Verificou-se que a R_q varia em função do tempo de imersão, pois o eletrodo de Au apresentou R_q de 5 nm e após 30 min de imersão na solução de 3-MPA, a superfície apresentou R_q de 9,60 nm. No entanto, as imagens de AFM mostraram que o aumento do tempo de imersão para 60, 180 e 360 min causou o decréscimo da R_q para 8,09, 6,03 e 5,16 nm respectivamente. Este resultado é um indicativo de que nos primeiros minutos de imersão, ocorre à adsorção de moléculas de 3-MPA, porém de forma randômica, pois a R_q aumentou em comparação ao eletrodo de Au não modificado. Entretanto, o aumento do tempo de imersão possibilita que seja estabelecido um maior número de interações intermoleculares entre as moléculas de 3-MPA adsorvidas, desta forma ocorre o empacotamento da monocamada. Estes resultados estão de acordo com o aumento do recobrimento superficial (θ) causado pelo aumento do tempo de imersão, pois maiores tempos de imersões permitem que as moléculas aleatoriamente adsorvidas orientem-se perpendicularmente à superfície do eletrodo de ouro, devido às interações intermoleculares, permitindo a adsorção de novas moléculas, de modo a aumentar o empacotamento da monocamada e a proporcionar a redução da R_q .

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica também foi utilizada para averiguar a influência do tempo de imersão no processo de formação da monocamada. Os resultados são apresentados na Figura 20.

Figura 20 Diagrama de Nyquist obtidos em PBS 0,1 mol. L⁻¹ na presença de 5,0 mmol. L⁻¹ de [Fe(CN)₆]^{3-/4-}, do eletrodo Au/MPA, construído em diferentes tempos de imersão. Figura inserida: Modelo de circuito equivalente correspondente aos dados experimentais.



Fonte: O autor.

Utilizando a metodologia de circuitos equivalentes (inserido na Figura 20), ajustou-se os dados de EIE. O circuito proposto consiste em uma resistência (R1) representando a resistência da solução (PBS 0,1 mol. L⁻¹ na presença de [Fe(CN)₆]^{3-/4-}, 5,0 mmol. L⁻¹), outro elemento (R2) representando os processos faradaicos, um elemento (W1) o qual representa a difusão semi-finita e um elemento de fase constante (CPE) representando a capacitância da dupla-camada elétrica. Esse último elemento é utilizado para a obtenção de um melhor ajuste e é representado matematicamente pela Equação 6.

$$Z_{CPE} = 1/C(j\omega)^n \quad \text{Eq. 6}$$

Nesta equação tanto o termo C que representa a capacitância (F. sⁿ⁻¹) como n são constante empíricas, j é o número imaginário ($j = \sqrt{-1}$) e ω corresponde à frequência angular.^{110,111,112} O parâmetro n pode assumir valores entre 0 e 1. Pelas unidades de C , quando n assume valores de 1, o elemento de fase constante representa um capacitor ideal de placas planas paralelas. Quando o capacitor não é ideal, n assume valores distintos e menores que 1, o que pode ser relacionado com a não homogeneidade da superfície do eletrodo.^{113,114} O elemento (W)

também denominado de impedância de Warburg representa a difusão semi-infinita da molécula sonda na solução (região linear de baixa frequência), também foi adicionado ao circuito.^{115,116}

Os resultados dos ajustes pela metodologia dos circuitos equivalentes foram comparados com os valores de R_q das monocamadas construídas com diferentes tempos de imersão. Os dados desta correlação estão resumidos na Tabela 8.

Tabela 8 Valores de resistência de transferência de carga (R_{ct}), capacitância (CPE) e de rugosidade média (R_q) e do fator de idealidade (n), obtidos dos eletrodos Au/MPA obtidos em diferentes tempos de imersão.

Eletrodo	R_{ct} (Ohm)	CPE ($\mu F \cdot cm^{-2}$)	n	R_q (nm)
Au	145	0,71	0,91	5,0
Au/MPA_30 min	160	6,12	0,75	9,60
Au/MPA_60 min	209	5,27	0,82	8,09
Au/MPA_180 min	254	3,50	0,87	6,03
Au/MPA_360 min	289	1,90	0,88	5,16

De forma geral, verifica-se que o aumento do tempo de imersão promove o aumento da R_{ct} , devido ao maior recobrimento superficial, o qual é acompanhado pela redução de defeitos na monocamada, pois a R_q diminuiu em função do aumento do tempo de imersão.

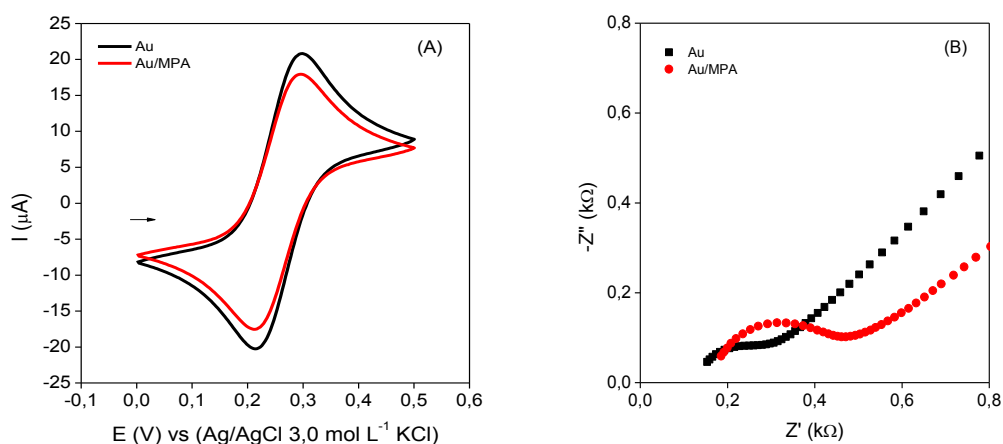
A partir dos dados da Tabela 8, pode-se também confirmar que a adsorção de 3-MPA é rápida, pois com apenas 30 min de imersão a capacitância aumentou ($6,12 \mu F \cdot cm^{-2}$), quando comparada com a capacitância do eletrodo de Au não modificado ($0,71 \mu F \cdot cm^{-2}$). No entanto, aumentando o tempo de imersão de 60 até 360 min a capacitância tende a diminuir. Este resultado indica que as moléculas de 3-MPA são adsorvidas inicialmente de maneira aleatória, alterando a morfologia da superfície do eletrodo de ouro. Entretanto, o aumento do tempo de imersão permite que as moléculas randomicamente adsorvidas, organizem-se devido às interações intermoleculares entre as cadeias alquílicas das moléculas adsorvidas, consequentemente ocorre o aumento da homogeneidade da superfície e a redução da capacitância.¹¹⁷

Utilizando a Equação 6 e o ajuste dos dados foi determinado fator de idealidade (n) para o eletrodo de Au ($n = 0,91$). Após a imersão do eletrodo de Au na solução de 3-MPA por 30 min o fator de idealidade diminuiu de 0,91 para 0,75. Este afastamento de idealidade é um indício de que ocorreu o aumento da rugosidade superficial e a presença de defeitos.¹¹⁸ Este resultado era esperado, pois com 30 min de imersão apenas 20% da superfície foi recoberta. No entanto, quando o tempo de imersão foi prolongado para 60 e 180 min o valor de n aumentou para 0,82 e 0,87 respectivamente, e manteve-se constante para tempos de imersão superiores. Estes resultados corroboram com os valores de θ e Γ , pois nos tempos de imersão de 60 e

180 min obteve-se o aumento da concentração de moléculas adsorvidas que correspondem respectivamente aos recobrimentos superficiais de 34 e 42 %. O aumento da densidade de moléculas adsorvidas e do empacotamento da monocamada em função do tempo de imersão bem como a redução dos valores de rugosidades obtidos das imagens de AFM corrobora com a formação de uma superfície mais homogênea.^{117,118}

Após otimizar todo o processo de formação da monocamada, o perfil voltamétrico do eletrodo Au/MPA foi comparado com o eletrodo de Au não modificado na presença da molécula sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (Figura 21).

Figura 21 (A) Voltamogramas cíclicos obtidos do eletrodo Au e Au/MPA na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, 5,0 mmol. L⁻¹, pH = 7,2, $\nu = 30 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. (B) Diagrama de Nyquist obtidos dos eletrodos Au e Au/MPA na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, 5,0 mmol. L⁻¹, pH = 7,2.



Fonte: O autor.

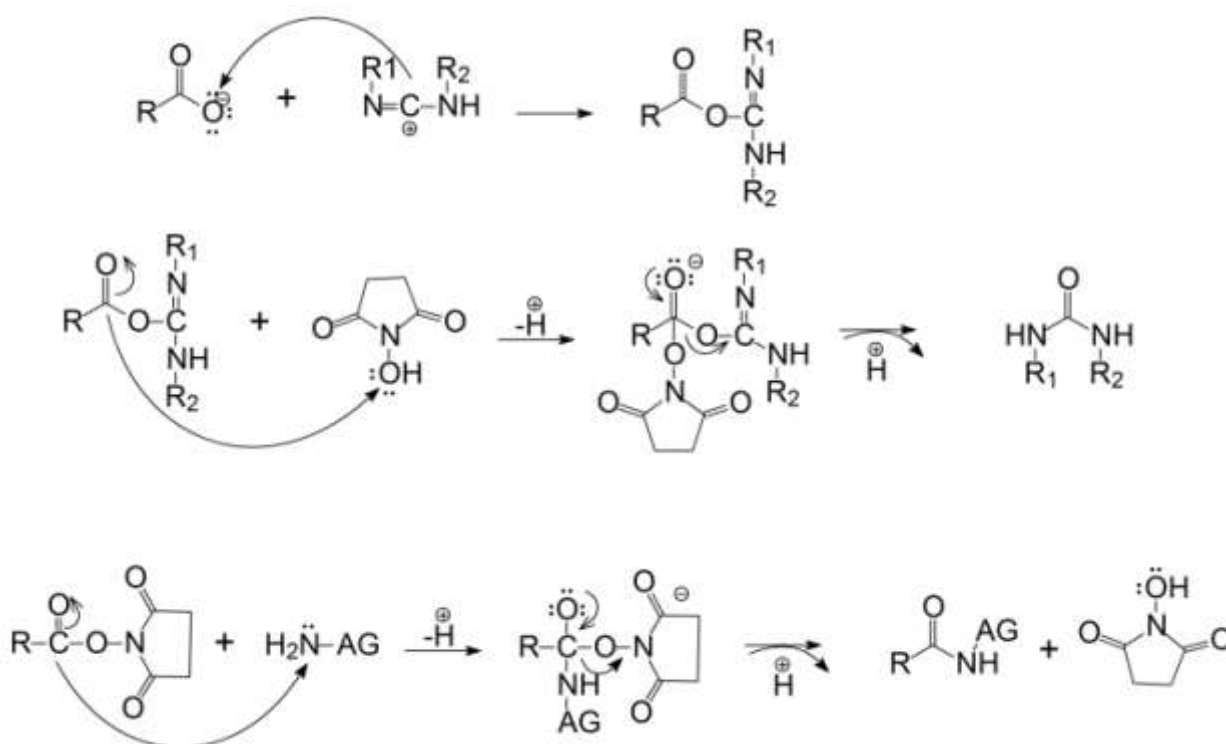
Comparando os voltamogramas (Figura 21 A), verifica-se que as intensidades de corrente de pico do eletrodo modificado foram menores ($I_{pa} = 17,35 \mu\text{A}$ e $I_{pc} = 17,51 \mu\text{A}$) do que o eletrodo de ouro ($I_{pa} = 20,00 \mu\text{A}$ e $I_{pc} = 20,04 \mu\text{A}$). Estes resultados corroboram com os apresentados na Figura 21 B, pois verifica-se o aumento da R_{ct} no eletrodo modificado (0,25 kΩ) comparado ao eletrodo de ouro (0,14 kΩ). Estes resultados estão correlacionados ao bloqueio parcial da superfície, devido ao tamanho da cadeia carbônica e a presença de defeitos.¹¹⁹ Além do bloqueio causado pela monocamada, há repulsões eletrostáticas entre a superfície do eletrodo e a molécula sonda, pois as caracterizações eletroquímicas foram realizadas no pH = 7,2, e neste pH os grupos carboxílicos do MPA estão desprotonados, pois apresentam pK_a 5,2.⁹⁴

4.2 Construção do Imunossensor Au/MPA/AG

4.2.1 Estudo da concentração de antígenos

Para a imobilização dos antígenos (AG) sobre a SAM de 3-MPA (Au/MPA) é necessário primeiramente ativar os grupos carboxílicos presentes na monocamada. Para tanto, foi utilizado EDC/NHS na razão de 1:4, e tempo de imersão de 20 min. Tanto a concentração de EDC/NHS assim como o tempo de imersão foram estipulados com base nos trabalhos publicados por Johnsson et al.¹⁰¹ e Liu et al.¹⁰² Os grupos carboxílicos presentes na monocamada ao reagirem com EDC formam o intermediário *o*-acilisoureira, porém este intermediário pode sofrer racemização e formar um composto estável o *n*-acilureia que impede a formação da ligação amida. Para minimizar esta reação, é utilizado o nucleófilo NHS, o qual reage com o intermediário *o*-acilisoureira e forma um éster intermediário, que é ativo para acoplar com os grupos amins constituintes do AG. O mecanismo idealizado é mostrado na Figura 22.

Figura 22 Mecanismo idealizado do processo de ativação dos grupos carboxílicos da monocamada de 3-MPA e acoplamento dos AG.



Fonte: Adaptado das referências 120,121.

Após ativar os grupos carboxílicos foi imobilizado o AG, porém a concentração de AG é uma variável que pode influenciar na resposta do imunossensor, pois a intensidade da resposta proveniente da interação entre antígenos e anticorpos, depende da quantidade de AG adsorvidos

na superfície do transdutor. Portanto, este parâmetro foi otimizado, os resultados desta otimização estão resumidos na Tabela 9.

Tabela 9 Parâmetros voltamétricos e de EIE obtidos dos eletrodos Au/MPA/AG obtidos em diferentes concentrações de AG, com tempo de imersão de 30 min, na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol. L⁻¹, pH = 7,2, $v = 50 \text{ mV. s}^{-1}$.

Eletrodo	I _{pa} (μA)	ΔE _p (V)	R _{ct} (kΩ)
Au/MPA	17,50	0,08	0,25
Au/MPA/AG_0,25 g. L ⁻¹	15,36	0,11	0,95
Au/MPA/AG_0,5 g. L ⁻¹	14,68	0,11	1,19
Au/MPA/AG_2,5 g. L ⁻¹	13,70	0,11	1,20

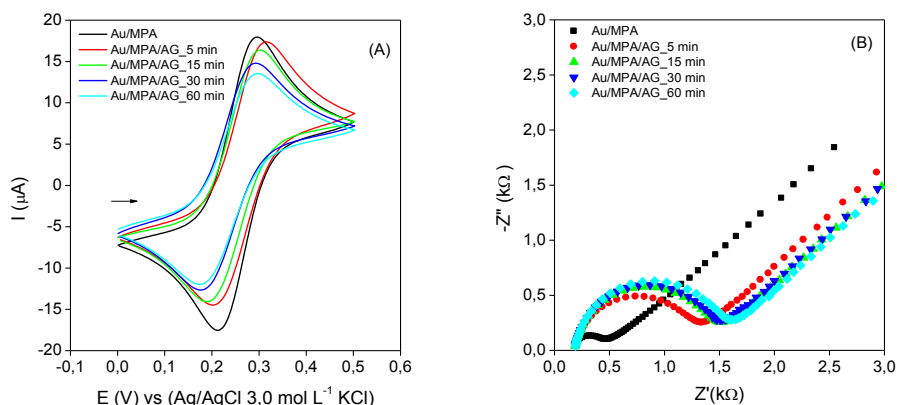
Analisando as respostas voltamétricas e impedimétricas, verifica-se que a redução das intensidades de corrente de pico anódica é acompanhada pelo aumento da R_{ct} quando aumenta-se a concentração de 0,25 a 0,5 g. L⁻¹. Este resultado pode ser atribuído à formação de uma camada isolante na superfície, resultando no aumento dos valores da R_{ct}.¹²² No entanto, concentrações maiores não apresentaram variações significativas de R_{ct}. Portanto, a concentração de AG utilizada para as demais caracterizações foi de 0,5 g. L⁻¹. Luz et al.⁹⁸ avaliaram a influência da concentração de antígenos *T. cruzi* imobilizado sobre a SAM mista de 3-MPA e 11-mercaptoundecanoico (11-MUA) utilizando da técnica de ressonância de plasma de superfície (SPR). De acordo com os autores, o aumento da concentração de antígenos foi acompanhado pelo deslocamento do ângulo de incidência. Entretanto, valores superiores a 50 μg. mL⁻¹ não apresentaram variações significativas no ângulo de incidência. Comparando as concentrações de AG utilizados neste trabalho com este exemplo, verifica-se que há uma discrepância dos valores de concentrações dos antígenos. Pois, os antígenos utilizados neste trabalho foram obtidos dos kits comerciais ELISA e para a determinação da concentração destes, foi utilizado o método de Bradford¹⁰⁰ no qual se determina a dosagem protéica total. No exemplo anterior, os antígenos utilizados foram purificados, portanto a concentração utilizada para a preparação do imunossensor é somente da espécie antigênica.

4.2.2 Estudo do tempo de imersão na solução de antígenos

Depois de determinar a melhor concentração do AG, foi necessário avaliar o tempo de imersão na solução do mesmo. O estudo do tempo de imersão é tão importante quanto o da concentração, pois é necessário um tempo hábil para que ocorra a formação das ligações amidas entre a monocamada e os AG, deste modo minimizando as ligações não específicas evitando

falsos diagnósticos positivos.¹²³ O resultado desta etapa de otimização foi acompanhado por VC e EIE, de acordo com as Figuras 23 A e 23 B.

Figura 23 (A) Voltamogramas cíclicos e (B) Diagramas de Nyquist obtidos dos eletrodos Au/MPA/AG obtidos em diferentes tempos de incubação (5 a 60 min) na solução de AG 0,5 g. L⁻¹. As medidas foram realizadas em PBS 0,1 mol. L⁻¹ na presença de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 5,0 mmol. L⁻¹, pH = 7,2, $\nu = 30 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, na faixa de frequência de 10 kHz a 0,1 Hz.



Fonte: O autor.

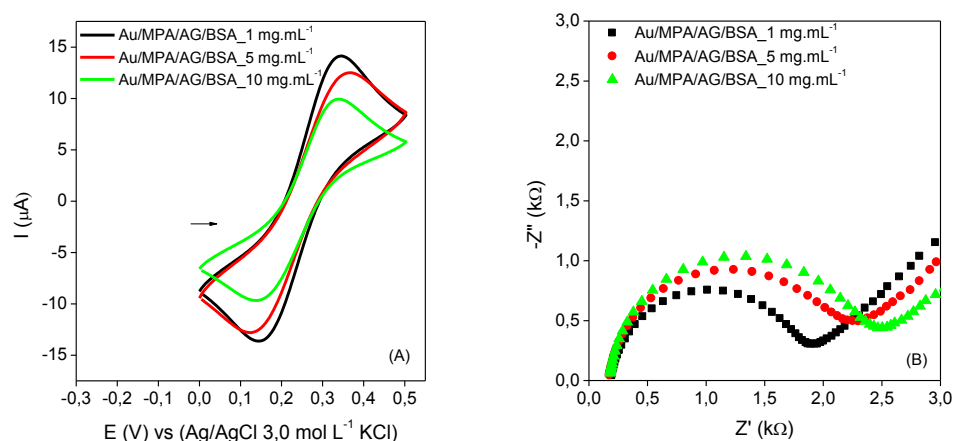
Analisando os dados voltamétricos e os de EIE, verifica-se que tanto as correntes de pico como a resistência à transferência de carga (R_{ct}) são dependentes do tempo de imersão na solução de AG. Como pode ser observado já nos primeiros 5 min ocorre o aumento da R_{ct} e a redução das intensidades de corrente de pico ($R_{ct} = 1,06 \text{ k}\Omega$, $I_{pa} = 14,5 \text{ }\mu\text{A}$), comparado ao eletrodo Au/MPA ($R_{ct} = 0,25 \text{ k}\Omega$, $I_{pa} = 17,3 \text{ }\mu\text{A}$). Prolongando o tempo de incubação para 15 min observou-se o aumento da R_{ct} ($R_{ct} = 1,22 \text{ k}\Omega$) e a redução da corrente anódica ($I_{pa} = 13,2 \text{ }\mu\text{A}$). Entretanto, tempos de imersão superiores a 15 min não apresentaram variações significativas nos valores de R_{ct} . Portanto, 15 min foi o tempo de imersão selecionado para a modificação do Au/MPA e realização dos estudos subsequentes. Resultado semelhante foi relatado por Souto et al.¹²⁴ no qual os autores desenvolveram um imunossensor para a detecção de leishmaniose infantum pela técnica SPR, a base de SAM de ácido 11-MUA sobre eletrodo de ouro.

4.2.3 Estudo da concentração de BSA

Após o processo de imobilização do AG, é possível que ainda existam alguns sítios de ligações não específicas remanescentes da monocamada, os quais podem ligar-se aos AB influenciando na resposta eletroquímica.¹²⁵ Portanto, é necessário que estes possíveis sítios sejam

bloqueados. A caseína e a albumina de soro bovino (BSA) são proteínas bastante utilizadas para este fim, entretanto a albumina é mais utilizada, pois é umas das proteínas que está em maior quantidade no plasma sanguíneo.¹²⁶ Portanto, foi utilizado BSA para bloquear os possíveis sítios não ocupados pelos AG e a influência da concentração desta foi avaliada (Figura 24).

Figura 24 (A) Voltamogramas cíclicos (B) Diagramas de Nyquist obtidos dos eletrodos Au/MPA/AG com diferentes concentrações de BSA, as caracterizações foram realizadas em PBS 0,1 mol. L⁻¹ na presença de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 5,0 mmol. L⁻¹, $\nu = 30 \text{ mV. s}^{-1}$, na faixa de frequência de 10 kHz a 0,1 Hz.



Fonte: O autor.

Analisando os voltamogramas, verifica-se que o aumento da concentração de BSA proporciona a redução das intensidades de correntes de pico e o aumento da Rct. Fato esperado, pois a camada protéica não é condutora. Desta forma ocorre o aumento da camada isolante sobre a superfície do eletrodo, dificultando a eletro-oxidação da molécula sonda. A Tabela 10 resume os resultados do estudo da concentração de BSA.

Tabela 10 Efeito da concentração de BSA no desempenho do imunossensor.

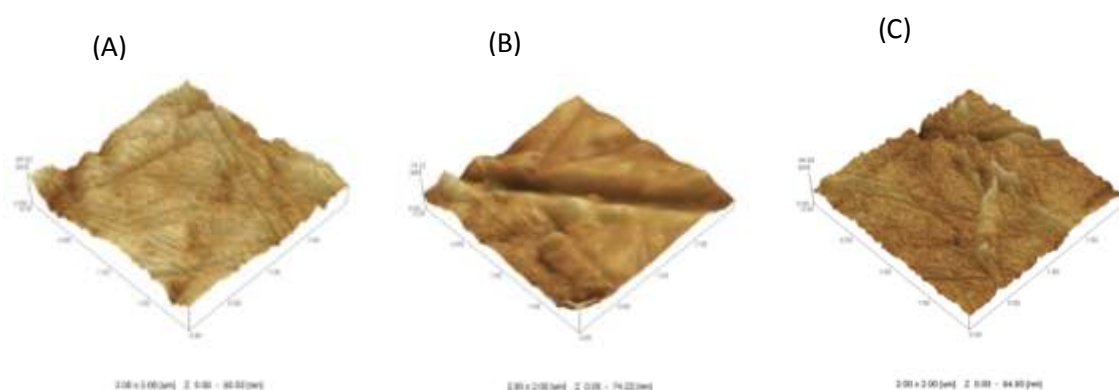
Concentração de BSA (mg. mL ⁻¹)	Rct (kΩ)	Ipa (μA)
1,0	1,59	10,60
5,0	1,89	8,72
10,0	1,97	8,03

Verificou-se que a Rct aumenta em função do aumento da concentração de BSA. No entanto, esta camada não irá interferir na formação do imunocomplexo, pois as ligações entre AG e AB são específicas.¹²⁷ Tanto o BSA quanto o AG são constituídos por aminoácidos, portanto a interação com os grupos carboxílicos ativados da monocamada é semelhante. Portanto, o tempo estipulado para avaliar a influência da concentração de BSA foi baseado no tempo de imersão utilizado para a imobilização de AG, o qual foi de 15 min. Analisando os

resultados apresentados na Tabela 10 verifica-se que $5,0 \text{ mg. mL}^{-1}$ é suficiente para bloquear a superfície e minimizar interações não específicas com o AB, pois concentrações superiores não apresentaram variações significativas nas intensidades de correntes de pico, assim como no aumento da Rct, portanto $5,0 \text{ mg. mL}^{-1}$ com tempo de incubação de 15 min foram os parâmetros utilizados para os estudos subsequentes na presença dos anticorpos. Estudos semelhantes são apresentados no trabalho de Xie et al.¹²⁸ para um imunossensor para a detecção da fosfoproteína p53 (proteína associada a vários tipos de câncer). O imunossensor foi construído sobre eletrodo de carbono impresso modificado pelo método *drop coating* com quitosana e folhas de grafeno, sobre a superfície foi imobilizado fisicamente os anticorpos fosfo-p53. Para bloquear os sítios de ligações não específicas da superfície foi utilizado BSA, cuja concentração foi avaliada na faixa de $0,1$ a $5,0 \text{ g. mL}^{-1}$ e constatou-se que concentrações baixas ($0,1 \text{ g. mL}^{-1}$) não foram suficientes para bloquear todos os sítios de ligações não específicas. No entanto, concentrações elevadas de BSA ($5,0 \text{ g. mL}^{-1}$) bloqueavam tanto os sítios de ligações não específicas como a interação do anticorpo com antígeno (proteína p53). Desta forma, optou-se pela concentração de 1 g. mL^{-1} de BSA.

Com o intuito de avaliar as alterações na morfologia da SAM causada pela imobilização de AG e BSA, o eletrodo foi caracterizado por microscopia de força atômica nas diferentes etapas de modificação. As imagens são mostradas na Figura 25.

Figura 25 Imagens de AFM dos eletrodos (A) Au/MPA, (B) Au/MPA/AG e (C) Au/MPA/AG/BSA. As imagens foram obtidas no modo não contato.



Fonte: O autor.

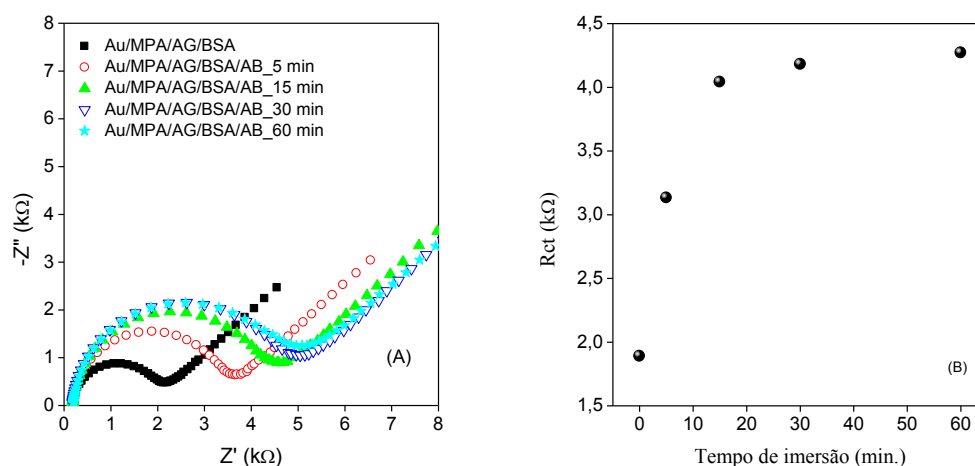
Comparando as imagens obtidas nas diferentes etapas de imobilização, verifica-se que há mudanças na morfologia da superfície, as quais são acompanhadas por alterações nos valores da Rq. O eletrodo Au/MPA apresentou $R_q = 6,0 \text{ nm}$, e após a imobilização dos antígenos esta aumentou para $R_q = 9,5 \text{ nm}$. Entretanto, após a adsorção de BSA ($5,0 \text{ mg. L}^{-1}$) a Rq diminuiu

para 8,3 nm. De acordo com a literatura,¹²⁹ esta diminuição da rugosidade sugere que havia espaços entre os AG imobilizados e estes foram ocupados pelas moléculas de BSA, proporcionando uma diminuição da rugosidade.

4.2.4 Otimização do tempo de imersão na solução de AB

Embora a interação antígeno/anticorpo apresente elevada afinidade (geralmente apresentam constante de afinidade (K_{af}) entre 10^5 a 10^9),^{130,131} o tempo de imersão do eletrodo na solução de AB é uma variável que pode interferir na sensibilidade da detecção, pois o tempo necessário para ocorrer à formação do imunocomplexo é dependente do transporte de massa até a superfície contendo os antígenos imobilizados.¹³² Neste sentido, foi avaliada a influência do tempo de imersão na solução de AB *T. cruzi*, como pode ser observado na Figura 26.

Figura 26 (A) Diagramas de Nyquist obtidos dos eletrodos modificados com diferentes tempos de incubação na solução de AB com concentração de 0,6 g. L⁻¹. As medidas foram realizadas em PBS 0,1 mol. L⁻¹ na presença de [Fe(CN)₆]^{3-/4-}, 5,0 mmol. L⁻¹, pH = 7,2. (B) Correlação entre a Rct e os tempos de incubação na faixa de 5 a 60 min.



Fonte: O autor.

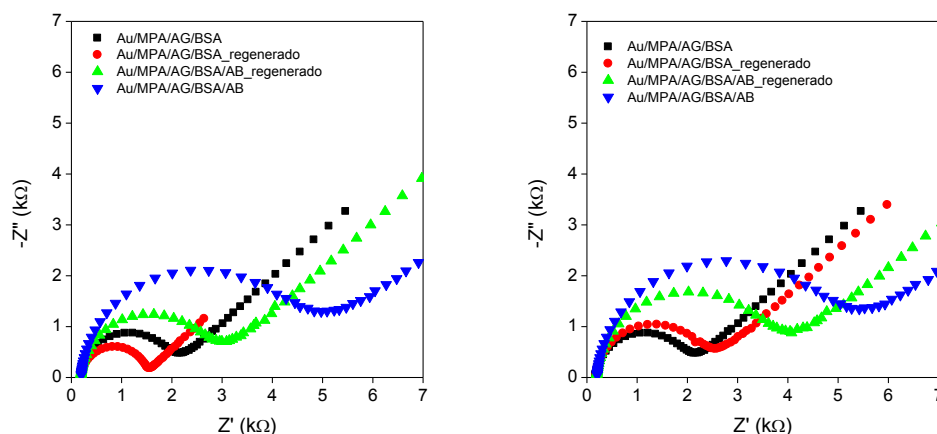
Analisando a Figuras 26 A, verifica-se o aumento do diâmetro do semicírculo em função do aumento do tempo de incubação. Este resultado é um indicativo que houve a ligação entre a superfície do dispositivo e o AB em solução,^{133,134} formando o imunocomplexo. No entanto, analisando-se a Figura 26 B, verifica-se que a resistência aumentou já nos primeiros 5 min de incubação (3,13 kΩ), comparado com a Rct da etapa anterior (1,89 kΩ). Porém com 30 min de incubação a resposta impedimétrica atingiu um máximo (4,18 kΩ) e manteve-se estável para tempos de incubação superiores. Este fato pode ser atribuído a saturação dos sítios de ligações específicas.¹³⁴ Portanto, este foi o tempo de incubação utilizado para o estudo da

resposta do imunossensor. Estudo semelhante é relatado por Souto et al.¹²⁴ para um imunossensor ótico, aplicado na detecção de leishmaniose utilizando a técnica SPR. Este imunossensor foi baseado em eletrodo de ouro funcionalizado com SAM do ácido 11-MUA, modificado com antígenos *L. infantum*. Entretanto, foi constatado que a sensibilidade do sensor depende tanto da concentração da solução de antígenos, quanto do tempo de imersão na solução de anticorpos. Neste sentido foi avaliado o tempo necessário para formação do imunocomplexo e verificou-se que 10 min foram suficientes para saturar os sítios de ligações específicas. Porém, o tempo necessário para formar o imunocomplexo, depende da metodologia empregada na imobilização dos antígenos ou dos anticorpos e da afinidade entre as biomoléculas.^{135,136}

4.2.5 Regeneração do Imunossensor

A interação entre AB e AG ocorre por múltiplas forças intermoleculares, tais como ligação de hidrogênio, interações eletrostáticas e van der Waals, estas interações são as responsáveis pela estabilidade do imunocomplexo formado.^{137,138} Portanto, para romper a ligação AG/AB e regenerar o imunossensor, é necessário utilizar condições severas, tais como soluções com pH maior do que 9,0 ou menor do que 3,0 e/ou em soluções salinas com elevadas concentrações.^{139,140,141} Estes procedimentos podem romper a ligação AB/AG, mas também podem reduzir o tempo de vida do sensor ou inutilizá-los.¹⁴² Com o intuito de reutilizar o imunossensor, estratégias de regeneração foram avaliadas, as quais são mostradas na Figura 27.

Figura 27 Diagramas de Nyquist obtidos do Au/MPA/AG/BSA/AB, antes e após o procedimento de regeneração (A) utilizando HCl/NaCl (método *A). (B) utilizando solução de NaOH/NaCl (método *B). As medidas foram realizadas em PBS 0,1 mol. L⁻¹ na presença de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 5,0 mmol. L⁻¹, pH = 7,2.



Fonte: O autor.

O dois métodos avaliados, consistiram na variação do pH, pois os sítios de ligações entre AG/AB são constituídos por estruturas complexas de resíduos de aminoácidos. Estudos de modelagem molecular mostram que a extremidade variável dos AG, de maneira geral, é constituída por resíduos do aminoácido tirosina, além de apresentar frações dos resíduos de histidina, lisina e glutamato.^{85,86,143} Portanto variando o pH de 2,0 a 10,0, os resíduos de tirosina podem ser protonados ou desprotonados, pois apresentam o $pK_{a1} = 2,2$ e $pK_{a2} = 9,0$,¹⁴⁴ desta forma dissociando o imunocomplexo. Os valores de R_{ct} obtidos antes e após os procedimentos de regeneração estão resumidos na Tabela 11.

Tabela 11 Dados de R_{ct} obtidos antes e após o procedimento de regeneração do Au/MPA/AG/AB.

Método	Au/MPA/AG/BSA	Au/MPA/AG/BSA/AB	Regenerado	**Au/MPA/AG/BSA/AB
*A	$1,89 \pm 0,20 \text{ k}\Omega$	4,12 kΩ	1,29 kΩ	2,47 kΩ
*B	$1,89 \pm 0,20 \text{ k}\Omega$	4,23 kΩ	2,09 kΩ	3,36 kΩ

*A_ procedimento utilizando solução de HCl, pH = 2,0, *B_ procedimento utilizando solução de NaOH, pH = 9,5.

**Detecção de AB após o procedimento de regeneração.

Analisando os valores de R_{ct} apresentados, verifica-se que a variação do pH dissocia o imunocomplexo. Porém os resultados de regeneração, não foram satisfatórios, pois a R_{ct} após o procedimento de regeneração pelo método *A, foi menor do que a R_{ct} do Au/MPA/AG/BSA. Utilizando este procedimento acredita-se que além da dissociação do imunocomplexo, ocorreu a remoção da camada de BSA e parte da camada de AG.

Utilizando o procedimento de regeneração *B, verificou-se que o eletrodo Au/MPA/AG/BSA após o procedimento, apresentou R_{ct} maior ($R_{ct} = 2,09 \text{ k}\Omega$) do que a R_{ct}

apresentada pelo mesmo eletrodo antes do procedimento de regeneração, este fato provavelmente ocorreu devido a não dissociação completa do imunocomplexo.

Após os procedimentos de regeneração por ambos os métodos, o imunossensor foi aplicado na detecção de AB com concentração fixa de $0,6 \text{ g. L}^{-1}$. No entanto, os valores de R_{ct} foram menores do que o esperado ($R_{ct} = 4,17 \pm 0,37 \text{ k}\Omega$). Este fato ocorreu provavelmente devido as drásticas variações do pH, causando a degradação das biomoléculas.

4.2.6 Detecção eletroquímica de AB *T. cruzi*

Com o intuito de avaliar a sensibilidade do imunossensor, medidas de impedância em diferentes concentrações de AB *T. cruzi* foram realizadas. Os resultados destas análises estão resumidos na Tabela 12.

Tabela 12 Valores de R_{ct} obtidos do imunossensor Au/MPA/BASA/AG/AB em diferentes concentrações de AB *T. cruzi*.

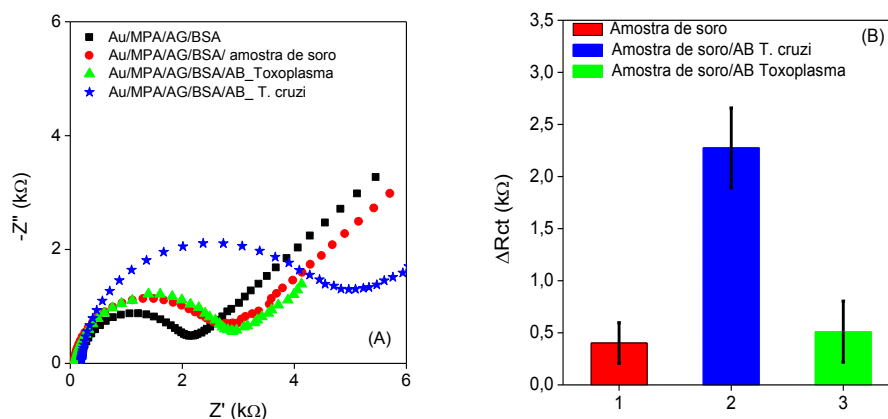
Eletrodo	Concentração AB (g. L^{-1})	^a R_{ct} ($\text{k}\Omega$)
*Au/MPA/AG/BSA	-	$2,31 \pm 0,20$
Au/MPA/AG/BSA/AB	0,07	$2,52 \pm 0,18$
Au/MPA/AG/BSA/AB	0,15	$3,43 \pm 0,31$
Au/MPA/AG/BSA/AB	0,60	$4,17 \pm 0,37$

*Au/MPA/AG/BSA em amostra de soro, ^aMédia de 3 análises.

Como pode ser visto na Tabela 12 a sensibilidade do imunossensor é limitada a diluição de $0,07 \text{ g. L}^{-1}$, pois com esta concentração, a R_{ct} foi de $2,52 \text{ k}\Omega$. Entretanto, este valor está dentro do desvio padrão da R_{ct} apresentado pelo eletrodo Au/MPA/AG/BSA na presença da amostra de soro não contaminada ($R_{ct} = 2,31 \pm 0,20 \text{ k}\Omega$). Portanto, os resultados mostram que a concentração de $0,07 \text{ g. L}^{-1}$ é a quantidade mínima que o sensor pode detectar. Entretanto em diagnósticos clínicos de infecções como da tripanossomíase americana, o parâmetro analítico é a presença ou ausência de anticorpos. Neste sentido, a análise qualitativa baseada na resposta imune positiva ou negativa é suficiente para o diagnóstico.¹⁴⁵ Entretanto, a especificidade do imunossensor é um parâmetro muito importante no diagnóstico clínico. Portanto, a resposta do imunossensor proposto foi avaliada em amostras de soro infectadas com AB *T. cruzi* e também em amostras de soro contendo AB de *Toxoplasma*. As amostras de soro são matrizes complexas, pois podem conter compostos derivados do sangue, as quais podem interferir no diagnóstico clínico de AB. Neste sentido, a resposta eletroquímica do imunossensor também foi avaliada em

amostras de soro na ausência de AB. Os resultados destas análises são apresentados na Figura 28.

Figura 28 (A) Diagramas de Nyquist obtidos do Au/MPA/AG/BSA na presença de AB *T.cruzi* 0,6 g. L⁻¹ e anti-*Toxoplasma* 1,0 g. L⁻¹ e na ausência de AB. (B) Variação da Rct na presença e na ausência de AB. As medidas foram realizadas em PBS 0,1 mol. L⁻¹ na presença de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 5,0 mmol. L⁻¹, pH = 7,2, na faixa de frequência de 10 kHz a 0,1 Hz. (As barras de erro são provenientes do desvio padrão de três experimentos independentes, cada uma em triplicata).



Fonte: O autor.

Os resultados de EIE (Figura 28 A) mostram que o eletrodo Au/MPA/AG/BSA apenas na presença da molécula sonda apresentou $R_{ct} = 1,89 \text{ k}\Omega$. As medidas em amostra de soro contaminadas como AB de *Toxoplasma* e na ausência de anticorpos, apresentaram os seguintes valores de resistências: $R_{ct} = 2,57 \pm 0,17 \text{ k}\Omega$ e $R_{ct} = 2,31 \pm 0,20 \text{ k}\Omega$, respectivamente. A similaridade dos valores de R_{ct} entre a amostra não infectada e infectada com o AB *Toxoplasma* é um indicativo da seletividade do dispositivo. Em contraste, após a incubação na solução contendo AB *T. cruzi* foi verificado um aumento significativo na resistência $R_{ct} = 4,17 \pm 0,37 \text{ k}\Omega$, o qual é atribuído à formação do imunocomplexo. A resistência do eletrodo Au/MPA/AG/BSA ($1,89 \text{ k}\Omega$) foi utilizada como base para estimar a variação da R_{ct} (ΔR_{ct}) na presença e na ausência de AB, como mostrado na Figura 28 B. A variação da resistência apresentada pelo eletrodo Au/MPA/AG/BSA na detecção de AB *T. cruzi* foi 70% maior do que a apresentada pelos possíveis interferentes (amostra de soro na ausência de anticorpos, e amostra de soro contaminada como AB *Toxoplasma*). Portanto, os resultados mostram que o imunossensor proposto é seletivo e pode ser aplicado na detecção eletroquímica de AB *T. cruzi* em amostras de soro, com diagnóstico rápido e confiável.

5 Conclusões

O aumento da densidade de moléculas adsorvidas e do empacotamento da monocamada de 3-MPA em função do tempo de imersão bem como a redução dos valores de rugosidade obtidos das imagens de AFM corrobora com a formação de uma monocamada mais homogênea.

A presença dos grupos carboxílicos na monocamada e a utilização de EDC e NHS permitiram imobilizar covalentemente os antígenos *Trypanosoma cruzi*, deste modo aumentando a estabilidade do imunossensor. Os resultados apresentados pelas técnicas eletroquímicas e por AFM permitiram evidenciar que mesmo após determinar as melhores condições de imobilização dos AG, havia espaços sobre a monocamada não ocupados pelos antígenos, os quais foram bloqueados pela adsorção de BSA, pois a adsorção desta ocasionou o aumento da Rct e da rugosidade e a redução das correntes de picos, comparado ao eletrodo Au/MPA/AG.

Foi constatado que a resposta do imunossensor Au/MPA/AG/BSA na detecção de AB *T. cruzi* depende do tempo de imersão na solução de anticorpos, pois verificou-se que na faixa de tempo avaliada, ocorreu o aumento da Rct em função do aumento do tempo de imersão. As estratégias utilizadas para regenerar o imunossensor, causaram a degradação das biomoléculas imobilizadas, inutilizando o dispositivo. Entretanto, a regeneração do dispositivo não é crucial, pois os sensores e biossensores comerciais podem ser descartáveis.

Vale ressaltar que tanto os antígenos quanto os anticorpos *T. cruzi* utilizados no desenvolvimento e caracterização do sensor, foram obtidos dos Kits comerciais ELISA e mesmo não purificados apresentaram-se como uma alternativa promissora para o desenvolvimento do imunossensor, pois o dispositivo apresentou-se seletivo na detecção qualitativa de AB *T. cruzi* em amostras de soro, uma vez que a diferença de Rct entre a amostra de soro contaminada com AB *T. cruzi* e as amostras na ausência e na presença de AB *Toxoplasma* foi maior do que 70 %.

A metodologia de análise direta empregada na detecção dos AB, ou seja, sem a necessidade da utilização de marcadores apresenta menor custo e menor tempo de preparo, comparado aos imunossensores marcados, pois dispensa o uso de anticorpos secundários.

CAPÍTULO III

Desenvolvimento de sensores eletroquímicos a base de eletrodos de carbono grafite obtidos de pilhas exauridas modificados com microestruturas de ouro

1 Introdução

Eletrodos de carbono apresentam várias vantagens para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos, tais como: permitem modificações físicas e químicas, ampla janela de varredura de potencial e atividade eletrocatalítica para uma variedade de espécies redox.^{146,147} Porém materiais carbonáceos com elevada pureza, como por exemplo, carbono vítreo, carbono pirolítico, nanotubos e grafeno apresentam custos elevados em função dos processos de obtenção.¹⁴⁸

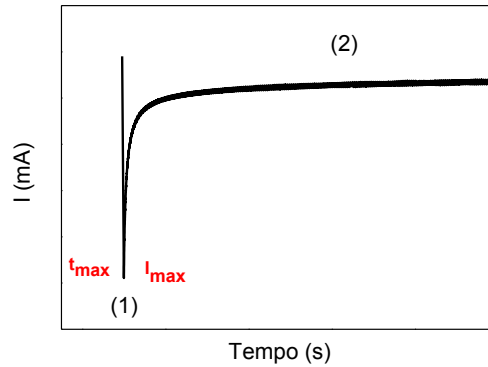
Os cátodos de pilhas comerciais denominadas de Leclanché ou zinco/carbono de 1,5 V são uma fonte alternativa de carbono grafite, que pode ser utilizada na construção de sensores eletroquímicos, pois as pilhas são constituídas por bastões de carbono grafite (cátodo) e uma mistura de óxidos de manganês, cloreto de zinco e cloreto de amônio.¹⁴⁹ Depois de exauridas, é necessário que estas baterias sejam descartadas de forma correta, pois o descarte incorreto pode causar impactos ambientais.^{150,151} Portanto a reutilização destas pilhas ou parte destas contribui para a preservação do meio ambiente.

As superfícies dos eletrodos de carbono grafite são versáteis, pois permitem diferentes modificações, por exemplo, adsorção de diferentes compostos, tais como: ftalocianinas, enzimas e partículas metálicas,^{152,153,154} as quais podem aumentar as propriedades eletrocatalíticas e a seletividade quando aplicados como sensores eletroquímicos.

As partículas metálicas apresentam-se como uma alternativa promissora para a modificação de superfície, tais como a dos eletrodos de carbono, pois elas podem aumentar a área superficial e a eletrocatalise.¹⁵⁵ Entre os métodos de obtenção de partículas metálicas, a rota química é uma das mais utilizadas, porém esta rota exige o rigoroso controle dos parâmetros envolvidos durante a síntese, como por exemplo, pH, concentração do precursor e do estabilizante, temperatura e da força do redutor.¹⁵⁶ Por outro, lado a técnica de eletrodeposição é vantajosa em relação à rota química, pois dispensa o uso de redutores e estabilizantes, e as partículas podem ser sintetizadas diretamente sobre a superfície do eletrodo. Vale ressaltar que a técnica permite o controle tanto do tamanho como da morfologia das partículas depositadas, minimiza a formação de resíduos e pode ser aplicada em escala industrial.^{157,158}

O método de eletrodeposição potenciostática consiste em polarizar o eletrodo de trabalho com um sobrepotencial fixo suficiente para reduzir os cátions metálicos presentes na solução eletrolítica, utilizando-se a técnica de cronoamperometria. A Figura 29 apresenta o cronoamperograma característico do processo de eletrodeposição potenciostática.

Figura 29 Cronoamperograma obtido a partir do processo de eletrodeposição galvanostática.



Fonte: O autor.

Como pode ser visto no cronoamperograma, nos instantes iniciais após a aplicação do sobrepotencial ocorre um aumento rápido da intensidade de corrente até atingir um máximo de corrente (I_{max}) no instante t (t_{max}), devido ao processo de nucleação (1), em seguida ocorre a diminuição da intensidade de corrente até ocorrer a estabilização da corrente (2). Neste ponto ocorre o crescimento dos grãos eletrodepositados devido à coalescência dos núcleos.¹⁵⁹ O processo de nucleação e crescimento das partículas de metais eletrodepositadas, pode ser instantâneo ou progressivo. Estes mecanismos podem ser distinguidos utilizando o modelo matemático proposto por Scharifker et al.¹⁶⁰

O mecanismo de nucleação instantâneo ocorre quando todos os núcleos se formam ao mesmo tempo após a aplicação de um sobrepotencial, em seguida ocorre o crescimento dos grãos. Segundo Scharifker et al.¹⁶⁰ o mecanismo pode ser descrito pela Equação 7.

$$(I/I_m)^2 = 1,9524\{1 - \exp[-1,2564(t/t_m)]\}^2 / (t/t_m) \quad \text{Eq. 7}$$

No mecanismo progressivo os núcleos crescem progressivamente após a aplicação do sobrepotencial, o qual pode ser descrito pela Equação 8.

$$(I/I_m)^2 = 1,2254\{1 - \exp[-2,3367(t/t_m)^2]\}^2 / (t/t_m) \quad \text{Eq. 8}$$

Em ambos os casos (I) representa a densidade de corrente no tempo (t) após aplicação do potencial, (I_m) é a densidade de corrente máxima no tempo (t_m). O mecanismo de nucleação e crescimento é atribuído ao sistema, por comparação aos modelos teóricos.^{161,162}

Tendo em vista a versatilidade da técnica de eletrodeposição e as atrativas propriedades físico-químicas do eletrodo carbono, German et al.¹⁶³ relataram o desenvolvimento de um biossensor utilizando eletrodo de carbono grafite modificado com nanopartículas de ouro, as

quais foram eletrodepositadas pela técnica de voltametria cíclica. Após otimizar as condições de eletrodeposição (faixa de varredura de potencial e concentração do sal de ouro), foi imobilizada fisicamente a enzima GOx pelo método *drop coating*. Os resultados amperométricos mostraram que o eletrodo modificado com as nanopartículas e a enzima GOx, apresentaram o dobro do valor da corrente da redução do peróxido de hidrogênio gerado pela reação catalisada pela enzima, comparado ao eletrodo em que apenas a GOx estava adsorvida sobre o eletrodo de carbono, devido ao aumento da área superficial proporcionada pelas nanopartículas eletrodepositadas. Em outro trabalho Shu et al.¹⁵⁵ desenvolveram um sensor eletroquímico, para a detecção não enzimática de glucose, a partir da modificação do eletrodo de carbono vítreo pela eletrodeposição de nanopartículas de ouro via o método potenciostático. Durante o processo de eletrodeposição verificou-se que tanto o potencial como o tempo aplicado, influenciaram no tamanho e na forma das microestruturas eletrodepositadas. Variando o potencial na faixa de +0,3 a -0,3 V vs Ag|AgCl, verificou-se que a forma das microestruturas eletrodepositadas variaram de tetraédrica para dendrítica. Segundo os autores, o eletrodo que apresentou a maior sensibilidade na detecção de glucose, foi aquele em que a estruturas dendríticas estavam presentes, porém estas estruturas apresentaram pouca aderência. Avaliando o mecanismo de nucleação e crescimento de grãos, verificou-se que independente do potencial aplicado o mecanismo foi progressivo. O dispositivo apresentou uma correlação linear entre a corrente anódica e a concentração de glucose no intervalo de 0,1 a 25 mmol. L⁻¹ e limite de detecção de 50 µmol. L⁻¹.

Em outro trabalho, Hezard et al.¹⁸² desenvolveram um sensor eletroquímico sensível à detecção de Hg (II). O sensor foi construído sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo, o qual teve a superfície modificada pela eletrodeposição de nanopartículas de ouro. O processo de eletrodeposição foi realizado utilizando a técnica de voltametria cíclica, com janela de varredura de 0,0 a 0,9 V vs Ag|AgCl. As otimizações realizadas no processo de deposição, permitiram obter partículas com diâmetro médio de 36 nm. O eletrodo modificado foi aplicado na detecção de Hg, utilizando a técnica de voltametria de redissolução anódica apresentando limite de detecção de 0,42 nmol. L⁻¹. Vale ressaltar que nas mesmas condições de análise o eletrodo de carbono não modificado, não apresentou processo redox referente oxidação do Hg.

Como pode-se observar nos exemplos anteriores, é possível aliar eletrodos de carbono juntamente com a versatilidade da técnica de eletrodeposição para obtenção de eletrodos modificados com partículas metálicas, os quais podem ser aplicados como sensores eletroquímicos. Neste sentido, propõem-se a utilização de eletrodos de carbono grafite obtido de pilhas esgotadas, os quais serão modificados com partículas de ouro pela técnica de eletrodeposição potenciostática. Após determinar as melhores condições de obtenção do eletrodo

CG/Au, o eletrodo será aplicado como sensor eletroquímico na detecção simultânea de dopamina e ácido úrico.

2 Objetivos

O principal objetivo deste trabalho é desenvolver um sensor eletroquímico, modificando a superfície dos eletrodos de carbono grafite (CG) obtidos de pilhas exauridas de 1,5 V com microestruturas de ouro, a partir da técnica de eletrodeposição potencioestática. O sensor proposto será aplicado na detecção simultânea de dopamina e ácido úrico.

2.1 Objetivos Específicos

- Modificar a superfície dos eletrodos de CG, com microestruturas de ouro, pela técnica de eletrodeposição;
- Otimizar os parâmetros envolvidos no processo de eletrodeposição potencioestático, tais como: potencial, tempo de eletrodeposição e concentração do precursor ácido cloro áurico (HAuCl_4);
- Caracterizar os eletrodos de CG modificado e não modificado pelas técnicas de microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (MEV-FEG), espectroscopia de energia dispersiva de raios x (EDS), Raman, espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), difração de raios X, e também por técnicas eletroquímicas: voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica, na presença da molécula sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$;
- Aplicar o eletrodo de CG modificado com as partículas de ouro, na detecção simultânea de dopamina (DA) e ácido úrico (AU).

3 Materiais e Metodologias

3.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados nos experimentos são de pureza analítica (PA). O precursor metálico HAuCl_4 , KCl , hexacianoferrato de potássio (III) $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, hexacianoferrato de potássio (II) $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, hidróxido de sódio (NaOH), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), fosfato de sódio mono (NaH_2PO_4) e dibásico (Na_2HPO_4), dopamina e ácido ascórbico foram adquiridos da Sigma Aldrich®.

3.2 Obtenção dos eletrodos de CG

Os cilindros de CG com área geométrica de $0,126 \text{ cm}^2$ e comprimento de 4,5 cm, foram obtidos de pilhas esgotadas de zinco/carbono de 1,5 V. Os eletrodos foram lavados com clorofórmio, em seguida com álcool etílico e por fim com água destilada. Após o procedimento de lavagem as extremidades dos eletrodos foram polidas com lixas de granulometria 1.200 e 2.000 μm , e em seguida isoladas, utilizando-se resina comercial epóxi.

3.3 Caracterização por difração de raios X

O equipamento utilizado nas análises por difração de raios X, foi um equipamento Rigaku, modelo IV, $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$), com 2θ variando entre 10° a 80° . Os difratogramas provenientes do eletrodo de CG foram obtidos do pó do eletrodo. A distância entre as camadas adjacentes foram calculadas utilizando a equação da lei de Bragg.^{164, 165} O difratograma proveniente do eletrodo de CG modificado com as microestruturas de ouro foi obtido a partir do cilindro de CG.

3.4 Caracterização por FTIR e Raman

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro SHIMADZU FTIR-8400. A faixa de varredura utilizada foi de 500 a 3.500 cm^{-1} , utilizando-se de pastilhas de KBr contendo o pó do cilindro de CG.

Os espectros Raman foram obtidos usando um espectroscópio Raman acoplado a um microscópio ótico da marca BRUKER, modelo Senterra, com resolução de 0,5 nm, laser de 632 nm, objetiva 20 X, potência de 2 mW. A faixa de varredura utilizada foi de 100 a 2.000 cm^{-1} .

3.5 Caracterização por MEV-FEG

As microscopias eletrônicas de varredura foram realizadas em um equipamento MIRA-TESCAN, operando a 20 kV, com diferentes magnificações. O tamanho médio das partículas foi estimado utilizando o software *Image J*, versão 1.8.

3.6 Eletrodeposição de Au sobre os eletrodo CG

Primeiramente foi averiguada a influência do potencial aplicado no processo de eletrodeposição, sendo que a eletrodeposição foi realizada utilizando a técnica potenciostática. Neste estudo, o eletrodo de CG foi utilizado como eletrodo de trabalho e imerso na célula eletroquímica contendo a solução de HAuCl_4 com concentração de $10,0 \text{ mmol. L}^{-1}$ e tempo fixo de 700 s. A faixa de potencial avaliada foi de -0,6 a +0,6 V vs Ag|AgCl. Entre uma otimização e outra, o eletrodo foi submetido ao procedimento de limpeza já descrito no item 3.2. Após determinar o potencial aplicado, foi averiguada a influência do tempo de eletrodeposição, a faixa avaliada foi de 200 a 1.200 s, mantendo fixo o potencial em +0,3 V assim como a concentração de HAuCl_4 em $10,0 \text{ mmol. L}^{-1}$. Após otimizar o potencial e o tempo de deposição, foi avaliada a influência da concentração do HAuCl_4 , a faixa estudada foi de 1,0 a $100,0 \text{ mmol. L}^{-1}$, mantendo fixo tanto o potencial como o tempo.

3.7 Detecção de dopamina na presença de ácido úrico e ácido ascórbico

O comportamento eletroquímico do eletrodo CG/Au foi avaliado na presença de dopamina $1,0 \text{ mmol. L}^{-1}$ utilizando a técnica de voltametria cíclica. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos na faixa de potencial de 0,0 a 0,4 V em solução PBS $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$, pH = 7,0 a 50 mV. s^{-1} . Também foi utilizada a técnica de voltametria cíclica na detecção de dopamina $1,0 \text{ mmol. L}^{-1}$ na presença dos interferentes, ácido ascórbico e ácido úrico, ambos com concentração de $10,0 \text{ mmol. L}^{-1}$. Os voltamogramas foram obtidos na faixa de 0,0 a 0,75 V em solução PBS $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$, pH = 7,0 a 50 mV. s^{-1} .

Foi utilizada a técnica de voltametria de onda quadrada e o eletrodo CG/AU na detecção de DA. Entretanto, a influência dos parâmetros instrumentais foi avaliada (incremento variou-se na faixa de 1 a 10 mV, amplitude de pulso de 10 a 100 mV e frequência de pulso de 10 a 100 Hz). As otimizações dos parâmetros foram realizadas na presença de DA $0,1 \text{ mmol. L}^{-1}$.

Com os parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada otimizados, foram obtidas as curvas de calibração para DA na presença AU. A faixa de concentração de DA estudada de

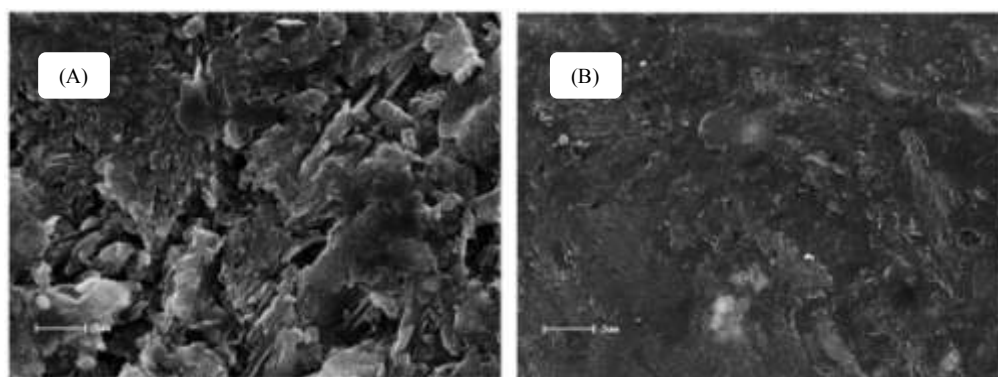
9,9 a 90 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ com concentração fixa de AU de 100 $\mu\text{mol. L}^{-1}$. As curvas de calibração para AU na presença DA foram obtidas na faixa de concentração de AU de 100 a 500 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ com concentração fixa de DA de 90 $\mu\text{mol. L}^{-1}$.

4 Resultados e Discussões

4.1 Caracterização dos eletrodos de CG

As propriedades físico-químicas dos materiais carbonáceos já são conhecidas e relatadas na literatura,^{146,166} porém o eletrodo de CG proposto é um material alternativo, portanto foi necessário analisar a morfologia e a estrutura do material por diferentes técnicas. A Figura 30 mostra as imagens de MEV da superfície do CG antes e após o procedimento de limpeza.

Figura 30 Imagens de MEV da superfície do eletrodo de CG, (A) antes e (B) após o procedimento de polimento. A barra inserida nas figuras corresponde a 2 μm .



Fonte: O autor.

Como pode ser visto na Figura 30 A, verifica-se que a superfície é heterogênea devido à presença de lamelas, as quais são características de materiais gráfiticos. No entanto como o objetivo é a aplicação do eletrodo como sensor eletroquímico, foi necessário polir a superfície (Figura 30 B) para tornar a superfície mais homogênea e garantir a reprodutibilidade das etapas posteriores.

Com o intuito de averiguar a composição do CG, foi realizada a análise elementar da superfície por espectroscopia de energia dispersiva (EDS). O resultado desta análise é apresentado na Tabela 13.

Tabela 13 Análise elementar qualitativa da superfície do eletrodo de CG por EDS.

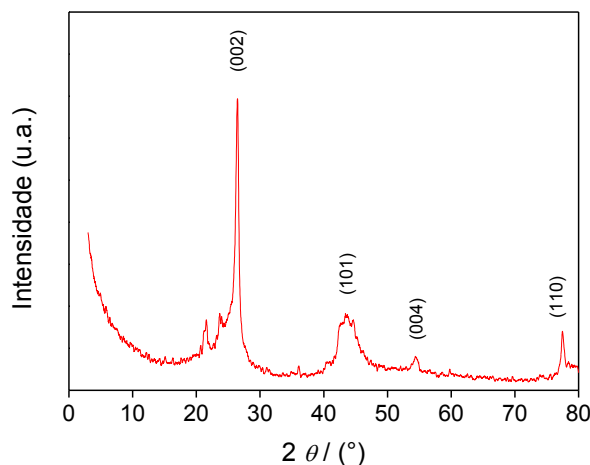
Elemento	% atômica
Carbono (C)	$99,79 \pm 0,12$
Ferro (Fe)	$0,04 \pm 0,008$
Enxofre (S)	$0,14 \pm 0,04$
Cálcio (Ca)	$0,03 \pm 0,02$

A partir dos resultados das análises de EDS, foi possível obter informações qualitativas sobre a composição elementar da amostra, identificando as impurezas residuais. Verifica-se que

o eletrodo é de elevada pureza, pois a porcentagem de contaminantes é muito pequena em relação à porcentagem atômica de carbono 99%.

Uma das estratégias que pode ser utilizada para a identificação da cristalinidade dos materiais carbonáceos, é a difração de raios X (Figura 31).¹⁶⁷

Figura 31 Difratomogramas de raios X referentes ao pó do eletrodo de CG.



Fonte: O autor.

Analisando o difratograma, verifica-se que amostra apresentou um conjunto de planos cristalográficos (002), (101), (004) e (110), os quais segundo a literatura,^{167,165} são característicos de materiais grafiticos. Dentre os vários planos, o (002) o qual refere-se ao pico em $26,45^\circ$, pode ser utilizado juntamente com a Equação 9 para estimar a distância interlamelar entre as camadas grafiticas.¹⁶⁴

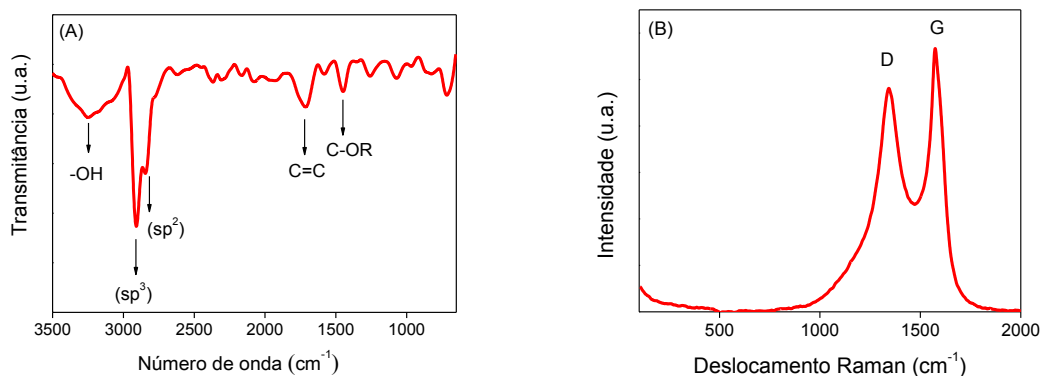
$$d = \lambda / 2 \sin \theta \quad \text{Eq. 9}$$

Na Equação 9, d é a distância entre as camadas adjacentes, λ é o comprimento de onda incidente (0,154 nm) e 2θ é o ângulo de Bragg ($26,45^\circ$). Utilizando os dados cristalográficos foi estimado o espaço entre as camadas de 0,34 nm. De acordo com a literatura¹⁴⁶ o espaçamento entre duas camadas grafiticas perfeitamente orientadas de uma amostra de grafite pirolítico altamente orientado (HOPG) é de 0,33 nm. Comparando o espaçamento estimado com o de uma amostra perfeitamente orientada, conclui-se que o GC apresenta uma estrutura cristalina.

Os materiais grafiticos apresentam hibridização do tipo sp^2 , mas podem apresentar defeitos, em função destes defeitos, estes também podem apresentar hibridização do tipo sp^3 .¹⁶⁷

Com o intuito de investigar os possíveis defeitos na estrutura do eletrodo, foram realizadas caracterizações pelas técnicas de absorção na região do infravermelho (FTIR) e por espectroscopia Raman, as quais são apresentadas na Figura 32.

Figura 32 (A) Espectros de FTIR obtidos da superfície do cilindro de CG pelo modo refletância. (B) Espectro Raman obtido do pó do cilindro de CG.



Fonte: O autor.

Analisando o espectro de FTIR, verifica-se a presença de uma banda na região de 3.250 cm^{-1} , a qual pode ser atribuída ao estiramento de grupos hidroxílicos. O espectro também apresenta absorções na região de 2.915 e 2.847 cm^{-1} , as quais correspondem aos modos de estiramentos grupos CH com hibridizações sp^2 e sp^3 , respectivamente. As bandas observadas em 1.690 cm^{-1} e 1.413 cm^{-1} podem ser devido aos estiramentos das ligações duplas entre átomos de carbono e aos estiramentos de grupos ésteres, respectivamente.^{168,169,170}

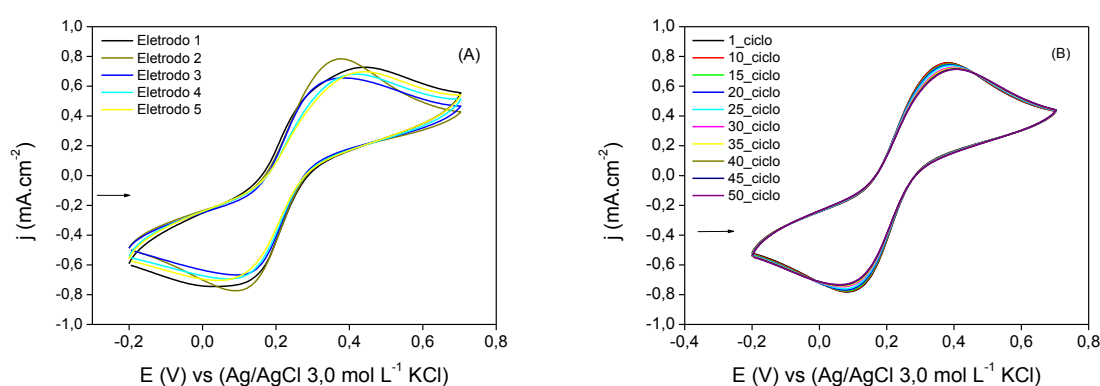
O espectro Raman do eletrodo de CG apresentou as bandas características de materiais carbonáceos.^{171,172} A primeira, chamada de banda D em 1.340 cm^{-1} pode ser atribuída à presença de desordens na estrutura, tais como a presença de grupos funcionais e carbonos com hibridização sp^3 . Já a banda em 1.572 cm^{-1} é denominada de G, é atribuída ao modo de estiramento de ligações duplas entre átomos de carbono com hibridação do tipo sp^2 .^{171,172}

A partir da razão das intensidades das bandas I_D e I_G , é possível estimar o grau de desordem da estrutura da amostra, quanto menor for a razão entre elas, maior é a organização e menor o número de defeitos.¹⁷¹ Analisando as intensidades entre as bandas D e G, foi possível estimar a razão entre elas, o valor encontrado foi de 0,84. De acordo com a literatura, para folhas de grafeno esfoliadas de grafite pirolítico altamente orientado (HOPG) a razão entre as bandas é $0,05 < I_G/I_D < 0,3$.¹⁷³ Segundo Datsyuk et al.¹⁷⁴ a razão entre as bandas D e G estimada para nanotubos de carbono é de 0,81, após tratamento oxidativo a razão estimada foi de 1,11.

Portanto, analisando os espectros e a razão entre as intensidades das bandas, é evidente a presença de defeitos e de heteroátomos na estrutura da amostra.

A partir das análises espectroscópicas e microscópicas, verificou-se que os eletrodos de carbono apresentam defeitos na estrutura, grupos funcionais e pequenas porcentagens de contaminantes. Portanto, foi necessário avaliar a influência destes defeitos na resposta eletroquímica. Para isto foi utilizada a técnica de voltametria cíclica e os resultados desta análise são apresentados na Figura 33.

Figura 33 (A) Voltamogramas cíclicos obtidos de eletrodos CG, obtidos de diferentes pilhas e (B) Repetibilidade de medida proveniente do eletrodo 2. Os voltamogramas foram obtidos em KCl 0,1 mol. L⁻¹ na presença de 5,0 mmol. L⁻¹ de [Fe(CN)₆]^{3-/4-}, $v = 50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

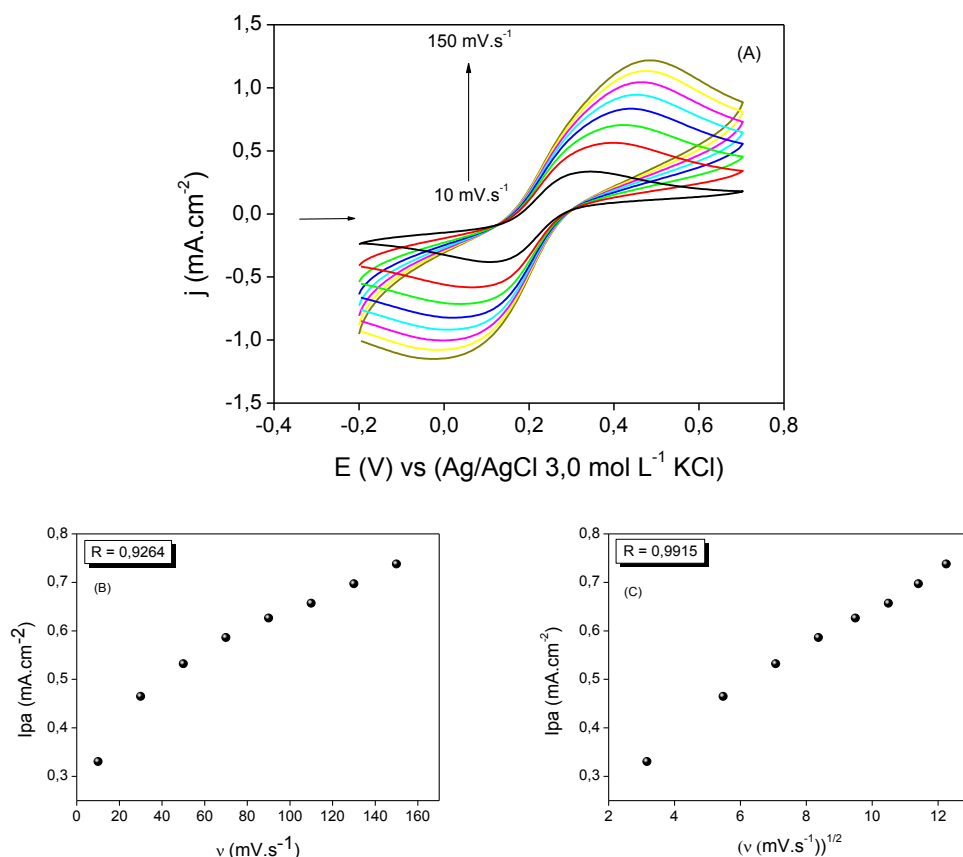


Fonte: O autor.

Analisando os voltamogramas da Figura 33 A, verifica-se que o perfil voltamétrico manteve-se constante para os diferentes eletrodos, com valor médio de $E_{pa} 0,34 \pm 0,06 \text{ V}$. A partir das intensidades de corrente de pico anódica, foi estimado o valor médio de $I_{pa} 0,70 \pm 0,05 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$. Portanto, é possível concluir que os defeitos na estrutura e as impurezas não interferem significativamente nas respostas voltamétricas. A estabilidade do eletrodo também foi avaliada, e verificou-se que o eletrodo é estável, pois este manteve 93,93% da corrente inicial, após 50 ciclos de varredura consecutivos na presença de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} (Figura 33 B).

Com o intuito de averiguar o processo de transporte de massa na superfície do eletrodo, foram realizados estudos variando a velocidade de varredura e os resultados desta análise são apresentados na Figura 34.

Figura 34 (A) Voltamogramas cíclicos do eletrodo CG, obtidos em diferentes velocidades de varredura. As medidas foram realizadas em KCl 0,1 mol. L⁻¹ na presença de 5,0 mmol. L⁻¹ de [Fe(CN)₆]^{3-/4-}. (B) Correlação entre *I*_{pa} vs *v*, (C) Correlação entre *I*_{pa} vs *v*^{1/2}.



Fonte: O autor.

A partir dos voltamogramas obtidos em diferentes velocidades de varredura apresentados na Figura 34 A, foi possível correlacionar a *I*_{pa} com *v* e *v*^{1/2}, e verificou-se que a velocidade da reação é controlada pela difusão das espécies em solução,¹⁷⁵ pois a *I*_{pa} aumentou linearmente com raiz quadrada do aumento da velocidade de varredura apresentando coeficiente de correlação de 0,9915. Utilizando a equação de Randles-Sevick (Equação 9), foi determinada a área eletroativa dos eletrodos CG.^{176,177}

$$I_{pa} = 2,69 \times 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot C \cdot v^{1/2} \quad \text{Eq. 9}$$

Nesta equação, *I*_{pa} é a corrente de pico em Amperes determinada na velocidade de varredura (*v*) em V. s⁻¹ (0,05 V. s⁻¹), *n* é o número de elétrons envolvidos na reação, *A* é a área eletroquímica a ser determinada em cm², *D* é o coeficiente de difusão da molécula sonda [Fe(CN)₆]³⁺ em KCl 0,1 mol. L⁻¹ a 25°C é 7,6 x 10⁻⁶ cm². s⁻¹.^{149,177} O termo *C* refere-se a concentração da espécies na

solução em mol. cm^{-3} . A área eletroativa estimada para o eletrodo de CG não modificado foi de $0,119 \text{ cm}^2$.

4.2 Eletrodeposição de microestruturas de Au

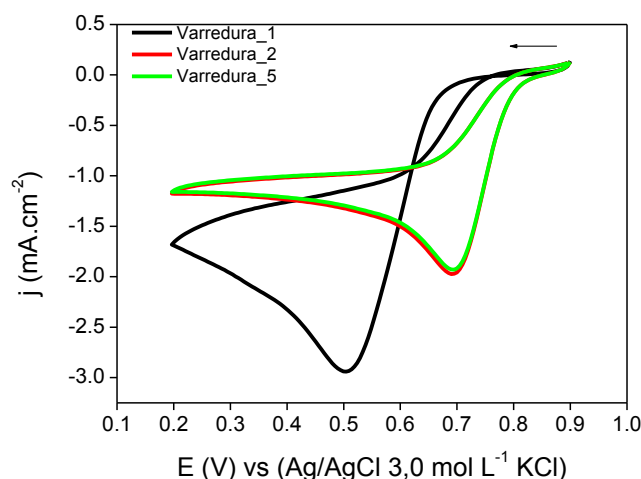
A utilização de materiais microestruturados, tais como micropartículas e estruturas dendríticas no desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos, em função do aumento da área eletroativa e das propriedades eletrocatalíticas.¹⁵⁵

A técnica de eletrodeposição de ouro é utilizada na modificação de eletrodos, pois além de ser um excelente condutor, dependendo das condições de síntese é possível obter materiais com diferentes formas e tamanhos, o quais podem influenciar na atividade eletrocatalítica.^{155,178}

Tendo em vista o baixo custo, a versatilidade do eletrodo de CG aliado às propriedades físico químicas das microestruturas de ouro, a possibilidade de construir sensores eletroquímicos utilizando substrato de CG modificados com microestruturas de ouro foi avaliada.

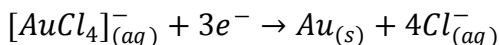
Primeiramente, com o intuito de averiguar o potencial de pico de catódico do $[\text{AuCl}_4]^-$ sobre a superfície do eletrodo de CG, o eletrodo foi submetido às varreduras catódicas em solução de $[\text{AuCl}_4]^-$. O perfil voltamétrico é apresentado na Figura 35.

Figura 35 Voltamogramas cíclicos obtidos do eletrodo de CG na presença de $[\text{AuCl}_4]^-$ $10,0 \text{ mmol. L}^{-1}$ em KH_2PO_4 $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$, $v = 50 \text{ mV. s}^{-1}$.



Fonte: O autor.

Analisando os voltamogramas, verifica-se na primeira varredura, a presença de um potencial de pico catódico em $0,52 \text{ V}$, o qual pode ser atribuído a redução dos íons $[\text{AuCl}_4]^-$. Esta reação é representada pela equação química seguinte.^{179,180,181}



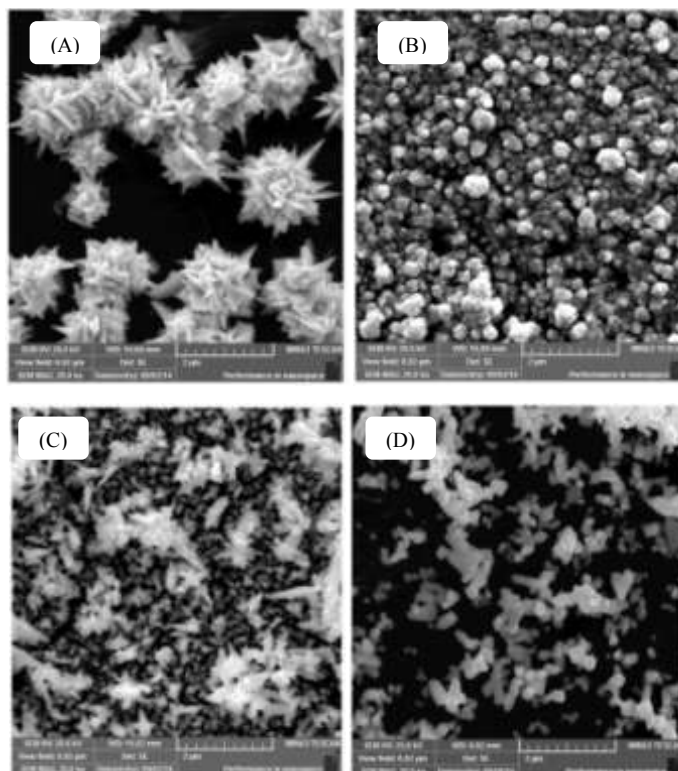
Também é possível verificar que na varredura reversa em aproximadamente 0,62 V ocorre o cruzamento do voltamograma, indicando que os íons reduzidos durante a varredura direta foram nucleados sobre a superfície do eletrodo de carbono.¹⁸²

Comparando a primeira varredura com as sucessivas, verifica-se que há a redução da intensidade de corrente de pico. Esta redução na intensidade de corrente de pico ocorre em função do consumo dos íons $[AuCl_4]^-$ presentes na camada de difusão.¹⁸² Também verifica-se que há o deslocamento do potencial de +0,5 V para potenciais mais positivos +0,7 V nas varreduras seguintes. Isto ocorre porque, nas varreduras seguintes o processo de nucleação ocorre sobre os sítios remanescentes sobre a superfície do eletrodo de carbono e também sobre a camada de ouro depositada durante a primeira varredura. Termodinamicamente a nucleação de ouro sobre a superfície de ouro já depositada é mais favorável.¹⁸³ Resultado semelhante é relatado por Hezard et al.¹⁸², neste trabalho os autores eletrodepositaram sobre a superfície de eletrodo de carbono vítreo nanopartículas de ouro. Durante o processo de eletrodeposição, observaram durante a primeira varredura um Epc em 0,48 V vs Ag|AgCl, proveniente da redução dos íons $[AuCl_4]^-$, no entanto nas varreduras seguintes o potencial de pico foi deslocado para 0,78 V vs Ag|AgCl. Segundo os autores, este deslocamento ocorre porque nas varreduras seguintes os grãos crescem sobre os núcleos já formados durante a primeira varredura, o que requer menos energia, comparada à deposição sobre a superfície de carbono, pois o potencial de redução do ouro sobre a primeira camada depositada, observado em 0,78 V se aproxima do potencial padrão de redução (1,0 V vs SHE) do íon $[AuCl_4]^-$.

4.2.1 Efeito do potencial de eletrodeposição

De acordo com a literatura,^{155,184} tanto a morfologia quanto o tamanho das partículas eletrodepositadas podem ser alteradas em função do potencial aplicado. Neste sentido, a influência do potencial foi avaliada na faixa de +0,6 a -0,6 V, com tempo de eletrodeposição de 700 s e concentração de $[AuCl_4]^-$ de 10,0 mmol. L⁻¹ (Figura 36).

Figura 36 Imagens de MEV-FEG das microestruturas de Au eletrodepositadas com concentração fixa de $[\text{AuCl}_4]^-$ $10,0 \text{ mmol. L}^{-1}$ e tempo de 700 s, em diferentes potenciais (A) $E = +0,6 \text{ V}$, (B) $E = +0,3 \text{ V}$, (C) $E = -0,3 \text{ V}$ e (D) $E = -0,6 \text{ V}$. A escala da barra inserida na figura corresponde a $2 \mu\text{m}$, com magnificação de $20.000 \times$.

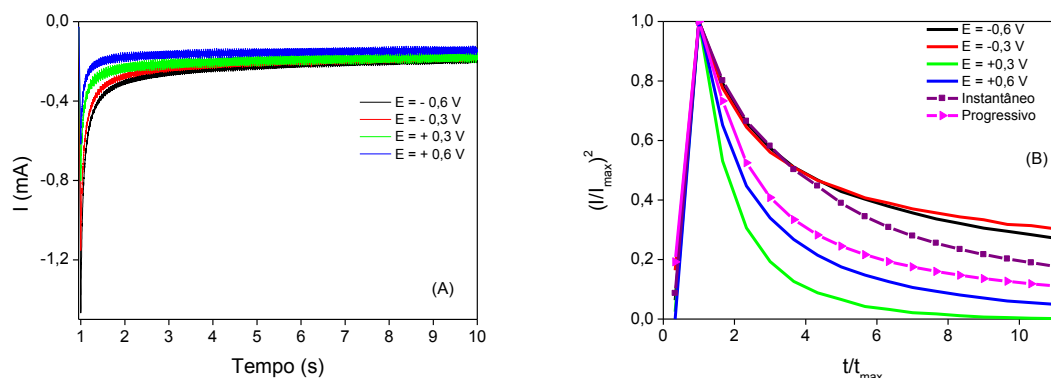


Fonte: O autor.

Analisando a imagem da Figura 36 A verifica-se que aplicando um potencial de $+0,6 \text{ V}$, foram produzidas microestruturas denominadas de “flowers”¹⁸⁵ com diâmetro médio de $1,8 \mu\text{m} \pm 0,45$, porém pode ser observado que as estruturas não recobriram totalmente a superfície. Isso deve ter ocorrido, pois o tempo utilizado neste potencial não foi suficiente para que mais íons migrassem em direção aos núcleos já formados. Portanto para um maior recobrimento, seria necessário utilizar tempos superiores a 700 s. Aplicando o potencial de $+0,3 \text{ V}$ (Figura 36 B), verifica-se a formação de microestruturas semelhante a esferas, dispersas homogeneamente sobre a superfície, com diâmetro médio de $420 \text{ nm} \pm 0,09$. Diminuindo o potencial de eletrodeposição para $-0,3 \text{ V}$, verifica-se o surgimento de estruturas dendríticas¹⁵⁵ com diâmetros variados (Figura 36 C). Reduzindo o potencial para $-0,6 \text{ V}$ (Figura 36 D) foi observado a presença de bastonetes, e durante o experimento foi verificado a presença de uma grande quantidade de bolhas sobre a superfície do eletrodo, provavelmente devido à evolução de H_2 ,¹⁸⁶ as quais dificultaram o crescimento das microestruturas.^{155,194} Estes resultados demonstram claramente, que o potencial aplicado tem influência direta no tamanho e na morfologia das microestruturas de ouro. Segundo a literatura,^{187,188} esta variação no tamanho e na morfologia em função do potencial aplicado,

pode estar relacionada com o processo de nucleação e crescimento dos grãos, pois este processo pode ser instantâneo ou progressivo. Portanto utilizando o modelo proposto por Scharifker e Hills,¹⁶⁰ o mecanismo de crescimento foi averiguado. Os resultados são apresentados na Figura 37.

Figura 37 (A) Cronoamperogramas obtidos em diferentes potencial de eletrodeposição na faixa de -0,6 a +0,6 V vs Ag|AgCl, com concentração fixa de $[\text{AuCl}_4]^-$ de 10,0 mmol. L⁻¹, (B) Curvas de $(I/I_{\text{max}})^2$ vs (t/t_{max}) teóricas e experimentais referentes aos processos de eletrodeposição realizados em diferentes potenciais.

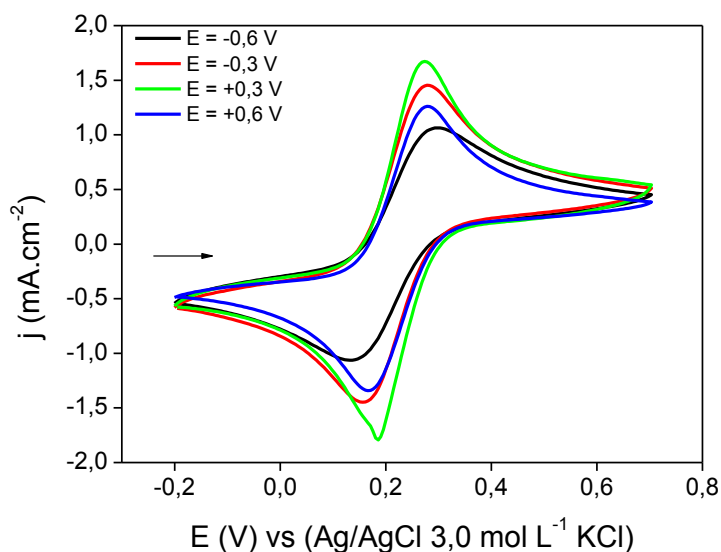


Fonte: O autor.

Comparando as curvas teóricas com as experimentais, verifica-se que as deposições realizadas nos potenciais de -0,3 e -0,6 V, o processo apresentou características de processos instantâneos. No entanto, utilizando os potenciais de +0,6 e +0,3 V o processo de nucleação e crescimento tem tendências a ser progressivo. Resultado semelhante é relatado por Dudin et al.¹⁸¹ neste trabalho foi avaliado o potencial aplicado na deposição de ouro na faixa de -0,2 a +0,2 V, sobre nanotubos de carbono. Utilizando o modelo de Scharifker e Hills verificou-se que as deposições em potenciais negativos (-0,2 V) o processo de nucleação das partículas de ouro foi instantâneo, no entanto, com o aumento do potencial para potenciais positivos (+0,2 V) ocorreu a transição de instantâneo para progressivo.

Com o intuito de avaliar a influência das diferentes morfologias na resposta eletroquímica, foram realizados estudos voltamétricos na presença da molécula sonda. Os resultados deste estudo são apresentados na Figura 38.

Figura 38 Voltamogramas cíclicos obtidos dos eletrodos de CG modificados com diferentes potenciais de eletrodeposição, na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol. L^{-1} , em KCl 0,1 mol. L^{-1} , $\nu = 50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.



Fonte: O autor.

Como pode ser visto na (Figura 38) os perfis voltamétricos dos eletrodos modificados com diferentes potenciais de deposição permaneceram inalterados, porém apresentaram valores de intensidades de corrente de pico e separação de potenciais de pico diferentes. Estes dados estão resumidos na Tabela 14.

Tabela 14 Comparação do desempenho analítico dos eletrodos CG/Au obtidos com diferentes potenciais de deposição.

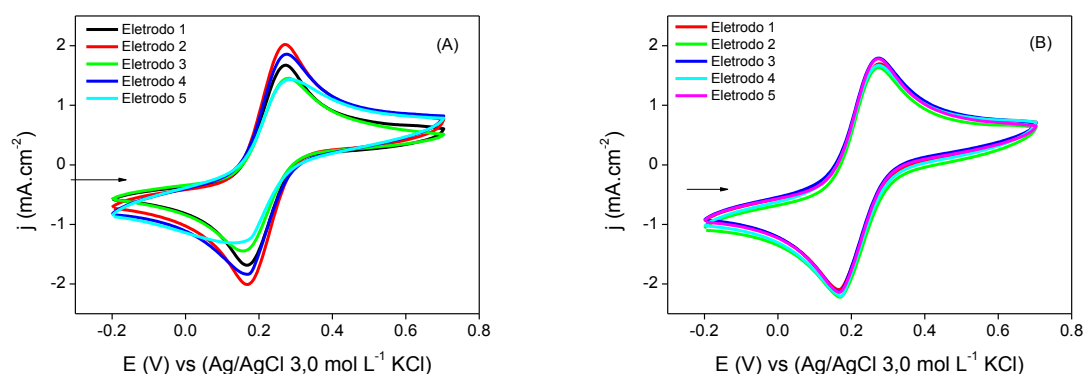
Potencial (V)	ΔE_p (mV)	I_{pa} ($\text{mA} \cdot \text{cm}^{-2}$)	I_{pc} ($\text{mA} \cdot \text{cm}^{-2}$)	Área eletroativa (cm^2)
E = +0,6	120	1,52	1,33	0,18
E = +0,3	90	1,69	1,78	0,25
E = -0,3	130	1,57	1,45	0,21
E = -0,6	150	1,07	1,09	0,16

Comparando os valores de intensidade de corrente de pico e separação de potenciais de picos verifica-se que o eletrodo CG/Au obtido no potencial de -0,6 V apresentou a menor intensidade de I_{pa} e a maior ΔE_p . Este resultado está de acordo com os resultados de MEV, pois verificou-se que o recobrimento da superfície do eletrodo de carbono pelas partículas neste potencial é prejudicada devido à formação de bolhas provenientes da evolução de gás hidrogênio.¹⁸⁹ A área eletroativa calculada pela Equação 9 foi de $0,16 \text{ cm}^2$. Aplicando um potencial de -0,3 V, verificou-se a presença de estruturas dendríticas, as quais melhoraram o

processo eletrocatalítico, pois as intensidades de I_{pa} aumentaram e ΔE_p reduziu. Esta redução na separação do potencial de pico e o aumento da densidade de corrente de pico se devem ao aumento da área eletroativa, pois neste potencial o eletrodo apresentou área de $0,21 \text{ cm}^2$. O eletrodo CG/Au obtido no potencial de $+0,3 \text{ V}$ apresentou a menor ΔE_p e a maior intensidade I_{pa} . Este aumento na intensidade de corrente e redução da separação do potencial de pico ocorreu devido ao recobrimento homogêneo da superfície pelas partículas de ouro e aumento da área eletroativa para $0,25 \text{ cm}^2$. Aumentando o potencial para $+0,6 \text{ V}$, verifica-se que houve a redução da intensidade de corrente de picos, comparada ao eletrodo modificado com potencial de $+0,3 \text{ V}$, a qual pode ser atribuída à redução da área eletroativa ($0,18 \text{ cm}^2$).

Analisando as intensidades de corrente de picos, verifica-se que as superfícies modificadas utilizando os potenciais de $-0,3 \text{ V}$ e $+0,3 \text{ V}$, apresentaram as maiores intensidades de corrente. Como os valores de foram próximos, estudos de reprodutibilidade da resposta de cinco eletrodos na presença da molécula sonda foram realizados (Figura 39).

Figura 39 Voltamogramas cíclicos obtidos dos eletrodos de CG modificados com concentração de fixa de $[\text{AuCl}_4]$ em 10 mmol. L^{-1} , e tempo de eletrodeposição de 700 s , com diferentes potenciais aplicados (A) $E = -0,3 \text{ V}$, (B) $E = +0,3 \text{ V}$, na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol. L}^{-1}$, em KCl $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$, $v = 50 \text{ mV. s}^{-1}$.



Fonte: O autor.

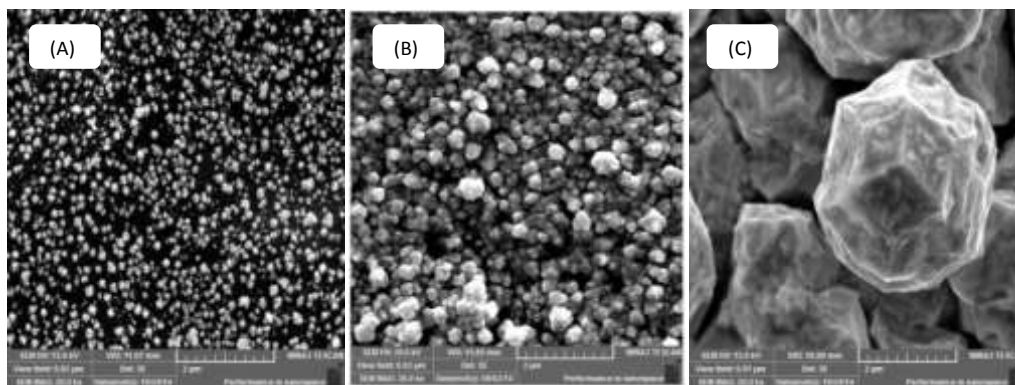
Analisando os voltamogramas apresentados na Figura 39 A, estimou-se a densidade de I_{pa} média de $1,88 \text{ mA. cm}^{-2}$, porém o desvio padrão foi de $0,37 \text{ mA. cm}^{-2}$. Para os eletrodos preparados com potencial de $+0,3 \text{ V}$ (Figura 39 B) a densidade de I_{pa} média foi de $1,69 \text{ mA. cm}^{-2}$, com desvio padrão de $0,05 \text{ mA. cm}^{-2}$. Os resultados demonstram que a reprodutibilidade do eletrodo modificado com as estruturas dendríticas ($E = -0,3 \text{ V}$) é menor, comparada as microestruturas esféricas ($E = +0,3 \text{ V}$). Os resultados eletroquímicos são condizentes com caracterizações morfológicas, pois foi constatado que as respostas mais reprodutíveis são obtidas para os eletrodos modificados com as microestruturas esféricas, as quais estão distribuídas homogeneamente sobre a superfície, diferente do observado para as

microestruturas dendríticas. Portanto, o potencial de +0,3 V foi mantido constante para as etapas posteriores.

4.2.2 Efeito da concentração do precursor no processo de eletrodeposição

De acordo com a literatura,^{155,190} a concentração do precursor metálico pode influenciar a morfologia, a dispersão e o tamanho das partículas eletrodepositadas. Neste sentido, foi avaliada a influência da concentração de $[\text{AuCl}_4]^-$ na faixa de 1,0 a 100,0 mmol. L⁻¹. As caracterizações morfológicas dos eletrodos construídos em diferentes concentrações são apresentadas na Figura 40.

Figura 40 Imagens de MEV-FEG das microestruturas eletrodepositadas com diferentes concentrações de $[\text{AuCl}_4]^-$, (A) 1,0 mmol. L⁻¹, (B) 10,0 mmol. L⁻¹ e (C) 100,0 mmol. L⁻¹. Com potencial fixo em +0,3 V e tempo de deposição de 700 s. A escala da barra inserida na figura corresponde a 2 μm , com magnificação de 20.000 x.



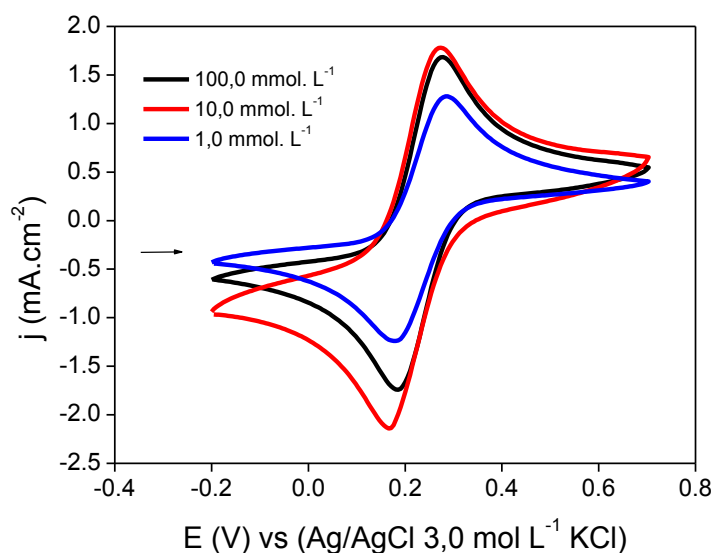
Fonte: O autor.

Analisando as imagens, verifica-se que utilizando a concentração de 1,0 mmol. L⁻¹ (Figura 40 A) ocorre à formação de nanopartículas com tamanho médio de 150 nm, porém a distribuição de partículas sobre a superfície não é uniforme, diferente do que ocorre quando se utiliza a concentração de 10,0 mmol. L⁻¹, onde se observa microestruturas com tamanho médio de 420 nm (Figura 40 B). Neste caso é possível verificar que há uma distribuição densa e relativamente uniforme por toda a superfície do substrato. Porém utilizando uma concentração de 100,0 mol. L⁻¹, o tamanho médio das microestruturas foi de 2,4 μm (Figura 40 C). Resultado semelhante é relatado por Hu et al.¹⁹⁰ para a modificação de um eletrodo de carbono vítreo modificado com grafeno por drop coating, sobre o qual foram eletrodepositadas nanopartículas de ouro. A concentração do precursor $[\text{AuCl}_4]^-$ no processo de eletrodeposição foi avaliada e as imagens de MEV mostraram que utilizando concentrações baixas do precursor (0,1 mmol. L⁻¹), foram formadas partículas dendríticas tridimensionais com diâmetros em torno de 250 a 300 nm. Quando a concentração foi aumentada para 1,0 mmol. L⁻¹ foram obtidas partículas com formato

esférico, com diâmetro médio em torno de $1,3 \mu\text{m}$. Enquanto que o aumento para $10,0 \text{ mmol. L}^{-1}$ resultou na formação de partícula com forma de “couve flor”, e diâmetro médio variando entre 15 e $20 \mu\text{m}$. Os eletrodos modificados com as partículas obtidas em diferentes concentrações foram avaliados eletroquimicamente na presença de glucose e O_2 . Foi constatado que o eletrodo modificado com as partículas de Au obtidas em $10,0 \text{ mmol. L}^{-1}$ apresentou a maior densidade de corrente anódica, devido à estrutura “flowerlike” e maior densidade de partículas sobre a superfície.

Na Figura 41 são mostrados os estudos de voltametria cíclica dos eletrodos modificados com as partículas de Au obtidas em diferentes concentrações de $[\text{AuCl}_4]^-$.

Figura 41 Voltamogramas cíclicos obtidos na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol. L}^{-1}$, $v = 50 \text{ mV. s}^{-1}$, provenientes dos eletrodos de CG modificados com diferentes concentrações de $[\text{AuCl}_4]^-$, com tempo e potencial de eletrodeposição fixo em 700 s e $+0,3 \text{ V}$.



Fonte: O autor.

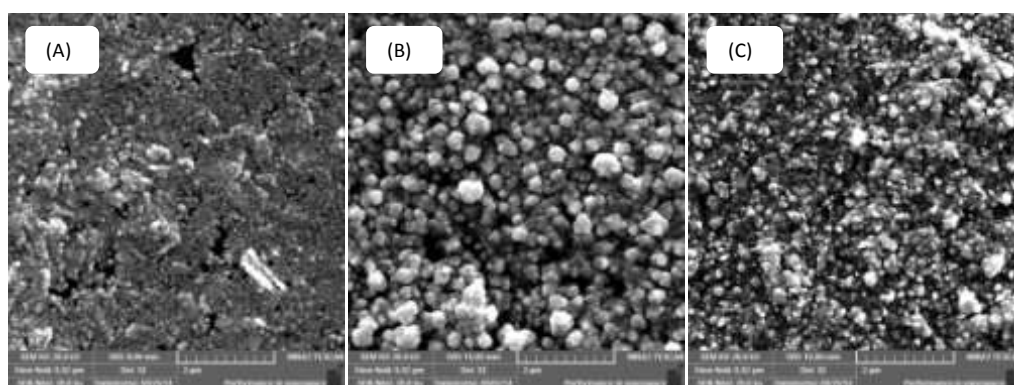
Como pode ser visto o eletrodo CG modificado com as partículas de ouro obtidas com concentração $1,0 \text{ mmol. L}^{-1}$ do precursor apresentou as seguintes densidades de corrente de picos $I_{pa} = 1,25$ e $I_{pc} = 1,08 \text{ mA. cm}^{-2}$. A área eletroativa apresentada pelo eletrodo foi de $0,18 \text{ cm}^2$. Aumentando a concentração do precursor para $10,0 \text{ mmol. L}^{-1}$ verificou-se o aumento da densidade de corrente de picos para $I_{pa} = 1,71$ e $I_{pc} = 1,78 \text{ mA. cm}^{-2}$. Este aumento da corrente de pico é acompanhado pelo aumento da área eletroativa $A = 0,25 \text{ cm}^2$. No entanto, aumentando a concentração do precursor para $100,0 \text{ mmol. L}^{-1}$ verificou-se que a densidade de corrente de picos diminuiu para $I_{pa} = 1,58$ e $I_{pc} = 1,64 \text{ mA. cm}^{-2}$ assim como a área eletroativa $0,22 \text{ cm}^2$. Estes resultados estão associados ao recobrimento superficial e também ao tamanho das

partículas eletrodepositadas, as quais podem diminuir a área eletroativa e consequentemente a densidade de corrente de pico. Portanto a concentração de 10 mmol. L⁻¹ foi mantida constante para os demais estudos.

4.2.3 Efeito do tempo de eletrodeposição

Após otimizar as variáveis, potencial de eletrodeposição e a concentração do precursor, a influência do tempo de eletrodeposição foi avaliada, pois de acordo com a literatura,¹⁹¹ este pode alterar a distribuição e a densidade de partículas eletrodepositadas sobre a superfície. As Figuras 42 e 43 mostram a influência do tempo de eletrodeposição na dispersão e a morfologia das partículas depositadas e as respectivas respostas eletroquímicas, foram avaliadas.

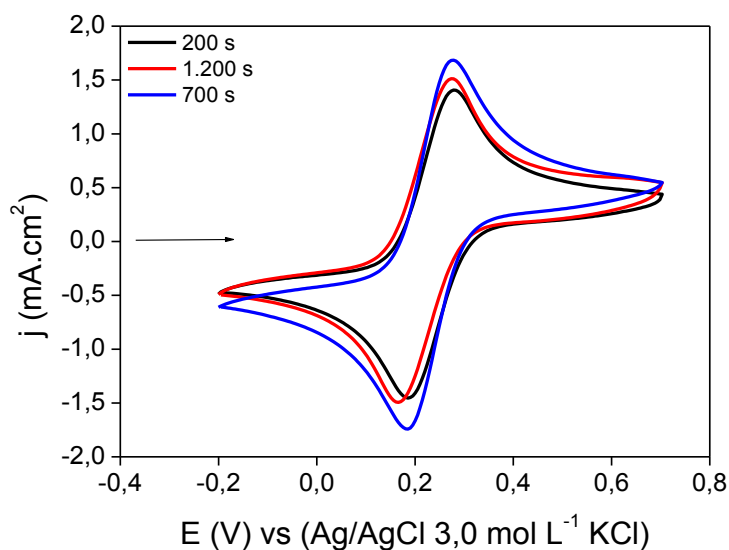
Figura 42 Imagens de MEV-FEG, dos eletrodos modificados com diferentes tempos de eletrodeposição (A) 200 s, (B) 700 s e (C) 1.200 s, com potencial de eletrodeposição de +0,3 V e concentração de 10 mmol. L⁻¹ de [AuCl₄]⁻. A escala da barra inserida na figura corresponde a 2 µm, com magnificação de 20.000 x.



Fonte: O autor.

Como pode ser visto na Figura 42 A, mesmo utilizando tempos de deposição curtos como 200 s ocorre a deposição de micropartículas, no entanto a superfície apresentou vários defeitos, os quais poderão influenciar na resposta eletroquímica, além de diminuir a reprodutibilidade de resposta. Aumentando o tempo de deposição (Figura 42 B) para 700 s verifica-se que as partículas foram homogeneamente depositadas por toda a superfície do eletrodo de CG. Quando o tempo de eletrodeposição foi prolongado para 1.200 s, às partículas foram depositadas de forma homogênea, entretanto, a estrutura do eletrodepósito é mais compacta, pois novos núcleos surgem entre e sobre as partículas já depositadas, fenômeno que é característico do processo de eletrodeposição progressivo.¹⁹² Os eletrodos modificados com diferentes tempos de eletrodeposição foram avaliados eletroquimicamente e os resultados desta análise são apresentados na Figura 43.

Figura 43 Voltamogramas cíclicos obtidos dos eletrodos modificados mantendo fixo o potencial em +0,3 V e a concentração de $[\text{AuCl}_4]^-$ em $10,0 \text{ mmol. L}^{-1}$, com diferentes tempos de eletrodeposição na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol. L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol. L}^{-1}$, $v = 50 \text{ mV. s}^{-1}$.



Fonte: O autor.

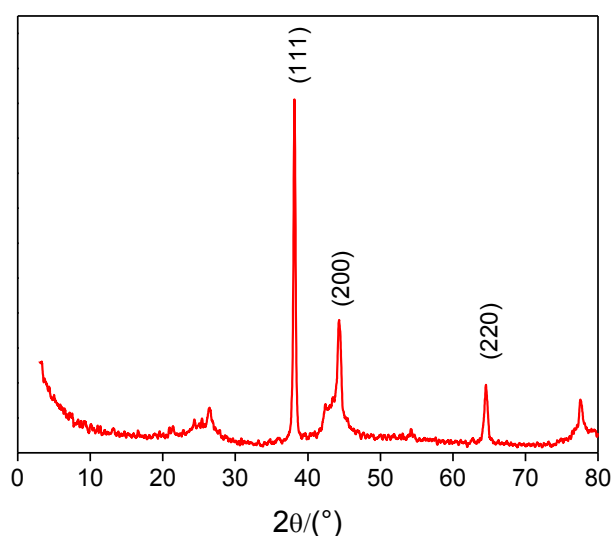
Comparando os voltamogramas dos eletrodos modificados com diferentes tempos de eletrodeposição, verifica-se que os potenciais de pico anódico e catódico são constantes ($E_{pa} = 0,27 \text{ V}$ e $E_{pc} = 0,18 \text{ V}$). Porém o eletrodo modificado com 200 s apresentou as menores intensidade de corrente de picos $I_{pa} = 1,36 \text{ mA. cm}^{-2}$ e $I_{pc} = 1,45 \text{ mA. cm}^{-2}$. Este resultado era esperado, pois as imagens mostram uma superfície com vários defeitos. Portanto, para um maior recobrimento superficial é necessário um maior tempo de deposição. O eletrodo modificado com tempo de 700 s apresentou os maiores valores de corrente de pico, $I_{pa} = 1,69 \text{ mA. cm}^{-2}$ e $I_{pc} = 1,73 \text{ mA. cm}^{-2}$. Este resultado é condizente com as imagens de MEV-FEG, onde se verifica uma homogeneidade tanto do tamanho quanto da distribuição das partículas eletrodepositadas. No entanto, o aumento do tempo para 1.200 s causou a redução das intensidades de correntes de pico ($I_{pa} = 1,51 \text{ mA. cm}^{-2}$ e $I_{pc} = 1,49 \text{ mA. cm}^{-2}$) comparado ao eletrodo construído com tempo de 700 s. Esta redução nas intensidades de corrente pode ser associada ao crescimento dos grãos, pois como o processo é progressivo, novos núcleos surgem em função do aumento do tempo de deposição sobre a camada já formada, como os núcleos estão próximos ocorre o fenômeno de coalescência, reduzindo a área superficial.¹⁹³

As melhores condições para a eletrodeposição de ouro sobre eletrodo de CG foram às seguintes: potencial de eletrodeposição de +0,3 V, concentração de $[\text{AuCl}_4]^-$ de $10,0 \text{ mmol. L}^{-1}$ e tempo de deposição de 700 s. As condições otimizadas estão em concordância com o reportado previamente na literatura para eletrodeposição de ouro sobre eletrodo de carbono vítreo.^{155,190}

4.3 Caracterização das microestruturas eletrodepositadas por DRX

O eletrodo modificado com as microestruturas de Au foi caracterizado utilizando a técnica de difração de raios X, para identificar a estrutura cristalina do eletrodepósito formado nas condições otimizadas. O resultado desta caracterização é apresentado na Figura 44.

Figura 44 Difratoograma do eletrodo de CG modificado com as microestruturas de ouro eletrodepositadas com as condições otimizadas (potencial de eletrodeposição de +0,3 V, concentração de $[\text{AuCl}_4^-]$ de 10,0 mmol. L^{-1} e tempo de deposição de 700 s).

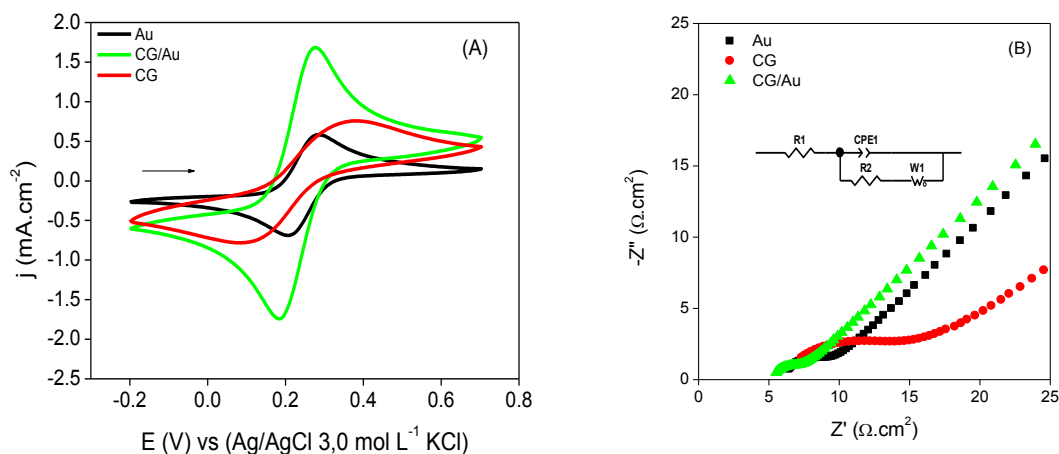


Fonte: O autor.

Analisando o difratograma verifica-se a presença dos picos em 38,15 °, 44,30° e 64,84°, os quais correspondem respectivamente aos planos cristalográficos (111), (200) e (220), que corresponde a estrutura cúbica de face centrada do Au.¹⁹⁴ Além dos picos mencionados, é possível identificar outros picos em 26° e 77°, os quais são provenientes da superfície do eletrodo CG. Porém nenhum outro pico característico de outras fases de estruturas de ouro foi identificado, indicando que o produto obtido consiste em uma fase pura.

A superfície do eletrodo CG foi modificada com microestruturas de ouro, pois estas podem aumentar a área eletroativa e facilitar a transferência de elétrons. Portanto, após determinar as melhores condições de eletrodeposição, as respostas voltamétricas e de EIE do eletrodo de CG modificado com as microestruturas, foi comparada com a dos eletrodos não modificados de CG e ouro. Os resultados desta análise são apresentados na Figura 45.

Figura 45 (A) Voltamogramas cíclicos, (B) Diagrama de Nyquist dos eletrodos CG, Au e CG/Au em KCl 0,1 mol. L⁻¹ na presença de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 5,0 mmol. L⁻¹, $\nu = 50$ mV. s⁻¹.



Fonte: O autor.

Comparando as respostas voltamétricas dos três eletrodos, verifica-se que o eletrodo CG/Au, apresentou as maiores intensidades de corrente de pico, e menor ΔE_p comparado ao CG não modificado, fato relevante, pois as partículas provavelmente aumentaram a área superficial e a eletroatividade. Portanto, utilizando a Equação 9, a área eletroativa dos eletrodos Au, CG e CG/Au foi determinada. Os valores dos parâmetros voltamétricos obtidos dos voltamogramas apresentados na Figura 45 e das áreas eletroativas estão resumidos na Tabela 15.

Tabela 15 Parâmetros voltamétricos e áreas eletroativas dos eletrodos CG, Au e CG/Au.

Eletrodo	I_{pa} (mA.cm ⁻²)	I_{pc} (mA.cm ⁻²)	ΔE_p (mV)	Área eletroativa (cm ²)	Área geométrica (cm ²)
CG	0,63	0,62	292	0,12	0,12
Au	0,51	0,60	81	0,02	0,03
CG/Au	1,69	1,70	87	0,25	0,12

Analisando a Tabela 15, verifica-se que as microestruturas de ouro eletrodepositadas aumentaram a área superficial em aproximadamente 2 vezes. Este aumento na área é desejável, pois facilita a transferência eletrônica na interface eletrodo/solução, propriedade que é confirmada pelo aumento das intensidades de corrente de picos e redução da ΔE_p em 205 mV comparado ao eletrodo de CG não modificado. O eletrodo de ouro apresentou a menor ΔE_p , mas as intensidades de corrente de picos foram menores do que o eletrodo CG e CG/Au, pois o eletrodo de Au apresentou a menor área eletroativa.

Utilizando a metodologia dos circuitos equivalentes (Figura 45 B), os dados de EIE foram ajustados. De acordo com este modelo, o circuito equivalente proposto para CG/Au consiste em um resistor (R1) representado a resistência da solução, um elemento (R2)

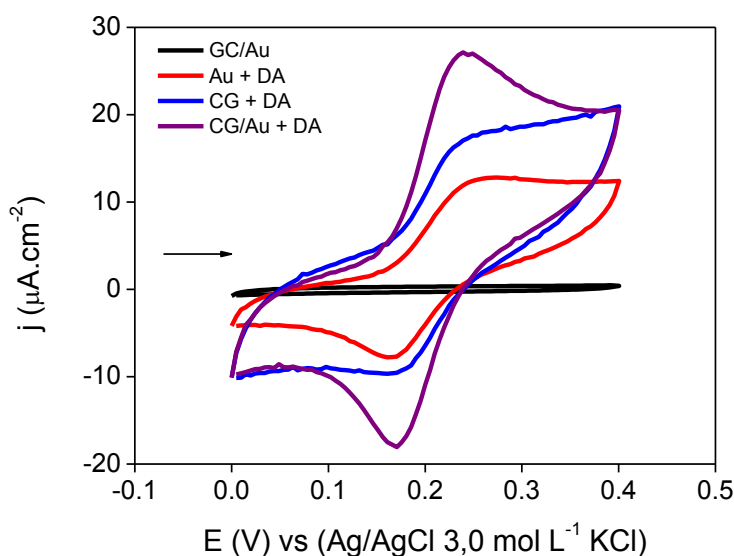
representando a resistência do processo faradaico, um elemento de fase constante (CPE) representando a capacitância da interface eletrodo/solução e um elemento (W1) representando a difusão semi-finita.

As medidas de impedância mostram que o eletrodo CG apresentou a maior resistência ($R_{ct} = 7,22 \, \Omega \cdot \text{cm}^2$) comparada aos eletrodos CG/Au e Au. Entretanto, o eletrodo CG/Au apresentou a menor R_{ct} $1,83 \, \Omega \cdot \text{cm}^2$ comparada ao eletrodo Au ($R_{ct} = 3,05 \, \Omega \cdot \text{cm}^2$). Esta redução de R_{ct} pode ser atribuída à boa condutividade eletrônica do Au e ao aumento da área eletroativa proporcionada pelas partículas de ouro eletrodepositadas, facilitando o processo de transferência eletrônica na interface eletrodo/solução.^{195,196}

4.4 Detecção eletroquímica de Dopamina

A atividade eletrocatalítica dos eletrodos CG, Au e CG/Au foram avaliadas na presença de dopamina. Os resultados voltamétricos são apresentados na Figura 46.

Figura 46 Voltamogramas cíclicos obtidos na presença de DA $1,0 \, \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,0$ $v = 50 \, \text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$, sobre os eletrodos CG, Au e CG/Au.



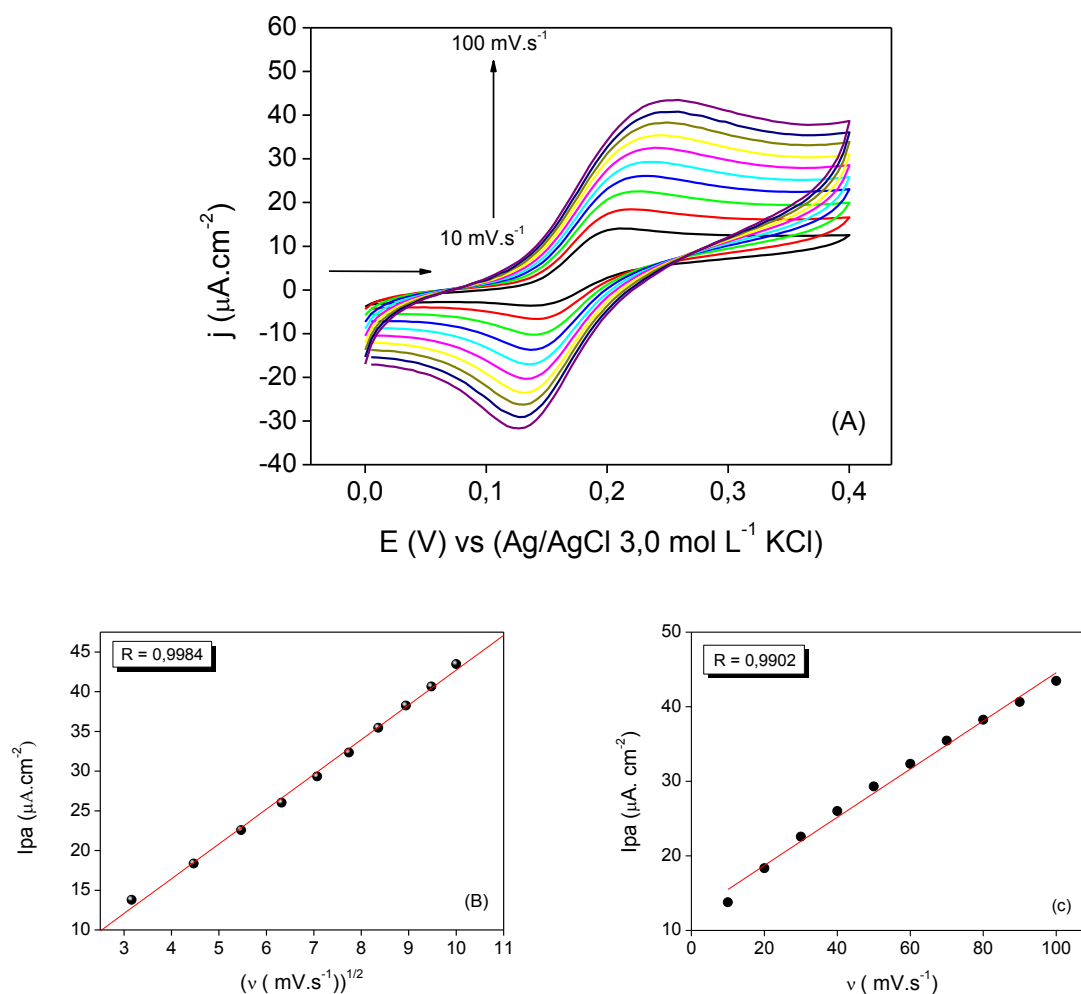
Fonte: O autor.

Os eletrodos CG/Au, CG e Au na presença de dopamina apresentaram as seguintes densidades de correntes de pico anódicas $I_{pa} = 27,2 \, \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$, $I_{pa} = 18,0 \, \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ e $I_{pa} = 12,6 \, \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ respectivamente. O eletrodo CG/Au além de apresentar a maior intensidade de corrente de pico também exibiu a menor separação de potencial de pico $\Delta E_p = 0,06 \, \text{V}$, comparado aos eletrodos de CG, $\Delta E_p = 0,10 \, \text{V}$ e de ouro, $\Delta E_p = 0,11 \, \text{V}$. O significativo

aumento na intensidade de corrente de pico e o menor valor de separação de potencial de pico para o eletrodo CG/Au são atribuídos a grande área superficial e atividade eletrocatalítica promovida pelas partículas depositadas.

A influência da velocidade de varredura no processo de oxidação da DA sobre CG/Au foi avaliada pela técnica de voltametria cíclica (Figura 47).

Figura 47 (A) Voltamogramas cíclicos do eletrodo CG/Au em diferentes velocidades de varredura na faixa de 10 a 100 $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ na presença de 1,0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de DA em PBS 0,1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH = 7,0. (B) Correlação entre I_{pa} vs $v^{1/2}$. (C) Correlação de entre I_{pa} vs v .



Fonte: O autor.

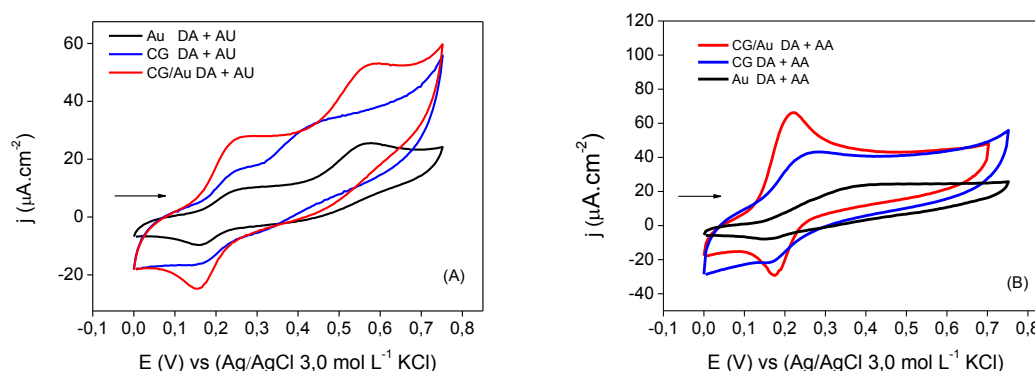
Utilizando os voltamogramas obtidos em diferentes velocidades de varredura foi possível correlacionar I_{pa} em função de v e $v^{1/2}$. Analisando as Figuras 47 A e 47 B, verifica-se que ambas as correlações são lineares, entretanto a correlação entre I_{pa} vs $v^{1/2}$ apresentou um maior coeficiente de correlação linear ($R = 0,9984$). Este fato é um indicativo de que o processo de oxidação da DA na superfície do eletrodo CG/Au é controlado pela difusão das espécies.^{175,197}

De acordo com a literatura,¹⁹⁸ sistemas que tem o processo de transferência de elétrons, limitado pela difusão das espécies, apresentam uma correlação linear entre $\log(I_{pa})$ vs $\log(v)$ com coeficiente angular igual a 0,5. Para o sistema em estudo, obteve-se esta correlação, a qual é descrita pela seguinte equação $y = 0,615 + 0,505x$, com coeficientes de correlação $R = 0,9988$ e angular igual a 0,5. Logo, ambos os resultados confirmam que o processo de oxidação da DA sobre a superfície do eletrodo é controlado pela difusão das espécies.

4.4.1 Detecção simultânea de dopamina na presença de ácido úrico e ácido ascórbico

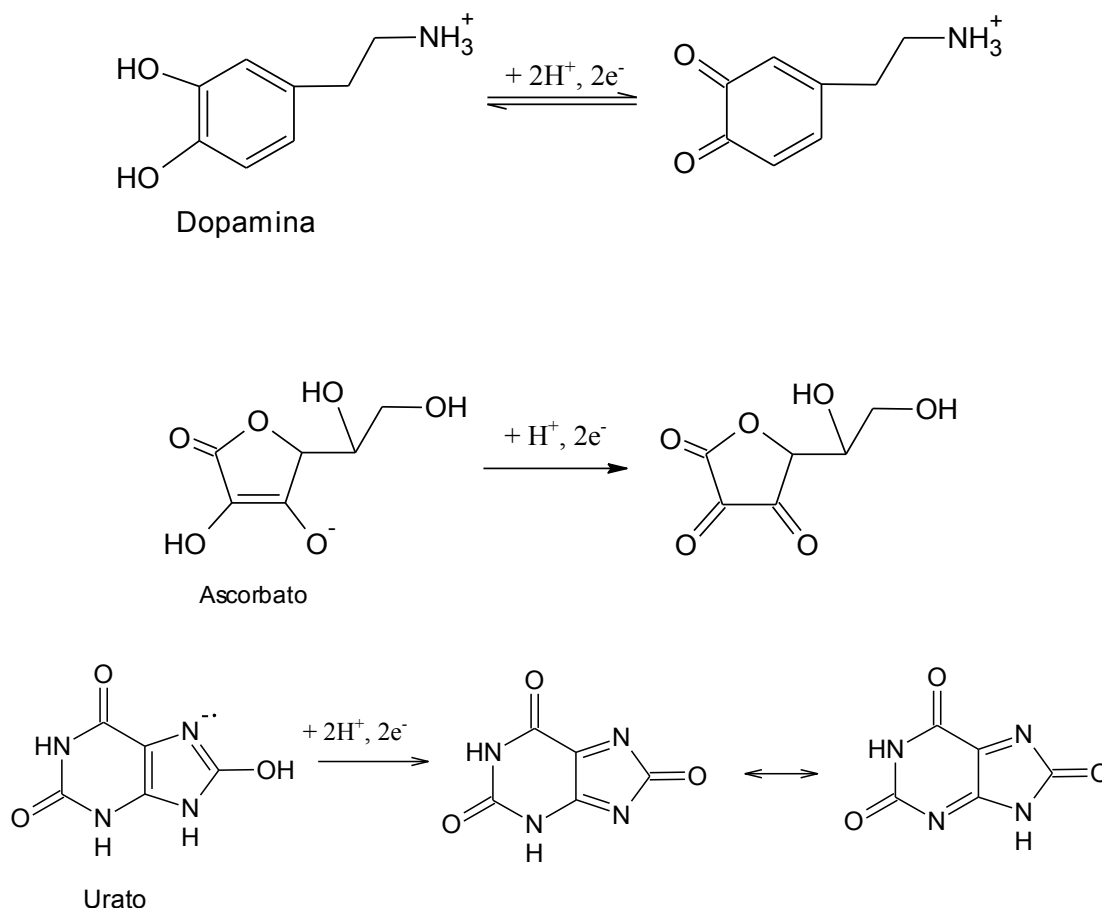
A seletividade do eletrodo GC/Au foi avaliada na detecção simultânea de DA e UA e AA e comparada aos eletrodos não modificados. Os resultados desta análise são apresentados na Figura 48.

Figura 48 Voltamogramas cíclicos obtidos dos eletrodos CG/Au, CG e Au em presença de (A) DA 1,0 mmol. L⁻¹ e AU 10,0 mmol. L⁻¹, (B) DA 1,0 mmol. L⁻¹ e AA 10,0 mmol. L⁻¹, em PBS 0,1 mol. L⁻¹, pH = 7,0, $v = 50$ mV. s⁻¹.



Fonte: O autor.

Analisando os voltamogramas obtidos dos eletrodos CG, Au e CG/Au apresentados na Figura 48A e 48B é possível identificar picos anódicos e catódicos, os quais são atribuídos aos processos redox das espécies DA, AA e AU. As reações eletroquímicas envolvidas nestes processos estão apresentadas no esquema seguinte.



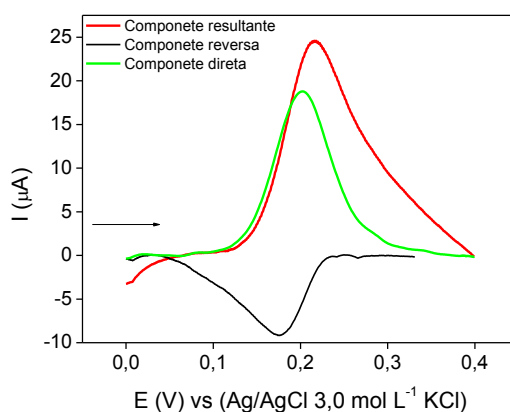
Esquema 1 Mecanismos idealizados dos processos eletroquímicos envolvidos nas reações de oxidação da dopamina a dopamina *orto*-quinona, do ascorbato a desidroascórbico e de urato a diimina, respectivamente.

Como pode ser visto na Figura 48 A, o eletrodo CG/Au na presença de DA apresentou um par redox em $E_{pa} = +0,25$ V e $E_{pc} = +0,15$ V, os quais são atribuídos ao processo redox da dopamina a dopamina *orto*-quinona. O segundo processo anódico irreversível em $E_{pa} = +0,57$ V é referente à oxidação do ânion urato, pois o ácido úrico apresenta $pK_a = 5,4$ na respectiva diimina^{199,200} Como pode-se verificar, o eletrodo CG/Au detectou simultaneamente ambas as espécies, assim como os eletrodos não modificados, entretanto, o eletrodo CG/Au apresentou a maior intensidade de corrente de pico na detecção de DA, $I_{pa} = 27,4 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$, enquanto os eletrodos de CG $I_{pa} = 17,7 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ e de Au $I_{pa} = 11,35 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$. Além disso, o CG/Au apresentou a maior separação de potenciais de pico entre a DA e AU ($\Delta E_p = 320$ mV), comparado aos eletrodos de CG ($\Delta E_p = 180$ mV) e Au ($\Delta E_p = 290$ mV). Entretanto, os resultados apresentados na Figura 48 B mostram que não é possível detectar DA na presença de ânion ascorbato AA (ácido ascórbico apresenta $pK_a = 4,2$ ¹⁹⁹), devido à sobreposição dos potenciais de picos.

4.4.2 Otimização dos parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada

Com o intuito de investigar o comportamento voltamétrico da DA sobre o eletrodo CG/Au, as componentes de corrente, da técnica de voltametria de onda quadrada foram avaliadas como pode ser visto na Figura 49.

Figura 49 Voltamogramas de onda quadrada obtidos em PBS 0,1 mol. L⁻¹ na presença de DA 0,1 mmol. L⁻¹, $f = 20$ Hz, $a = 30$ mV, $\Delta E_s = 1$ mV, sobre eletrodo de CG/Au.

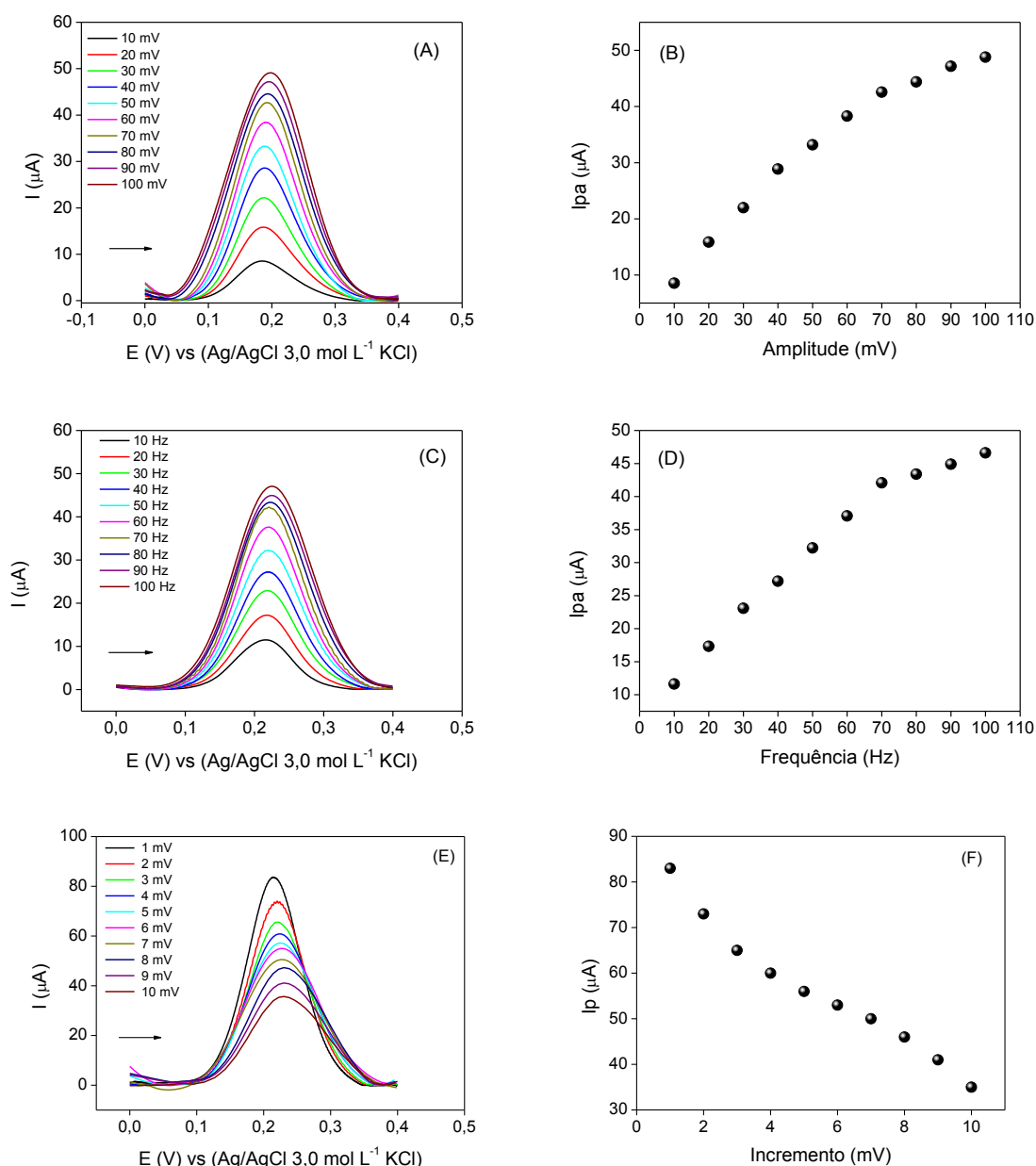


Fonte: O autor.

Como pode ser visto, as componentes de corrente foram separadas e verificou-se que a corrente da componente resultante apresentou a maior intensidade de corrente de pico (24,4 µA), comparada a corrente de pico da componente direta (18,7 µA). Isto se deve ao fato de que a corrente resultante é gerada pela diferença entre as componentes de correntes direta e reversa, quanto mais reversível for o processo, maior será a contribuição da corrente reversa, desta forma verifica-se o aumento significativo da intensidade da corrente resultante.²⁰¹ No entanto, a componente resultante apresentou maior largura de pico a meia altura, comparada a componente direta e como um dos objetivos é detecção simultânea de DA na presença de ácido úrico a largura do pico é um fator importante, portanto foi escolhida para as demais medidas a componente direta.

Como pode ser visto na Figura 50, os parâmetros da VOQ, tais como frequência (f), amplitude de pulso (a) e incremento de varredura (ΔE_s) foram avaliados, pois estes podem interferir na sensibilidade e na seletividade da detecção.²⁰²

Figura 50 Voltamogramas de onda quadrada obtidos na presença de DA 0,1 mmol. L⁻¹, em PBS 0,1 mol. L⁻¹, pH = 7,0. (A) correlação entre a variação da amplitude e a corrente de pico ($f = 100$ Hz e $\Delta E_s = 5$ mV), (B) correlação entre a variação da frequência e a corrente de pico ($a = 70$ mV e $\Delta E_s = 5$ mV), (C) correlação entre a variação do incremento de pulso e a corrente de pico ($f = 70$ Hz, $a = 70$ mV).



Fonte: O autor.

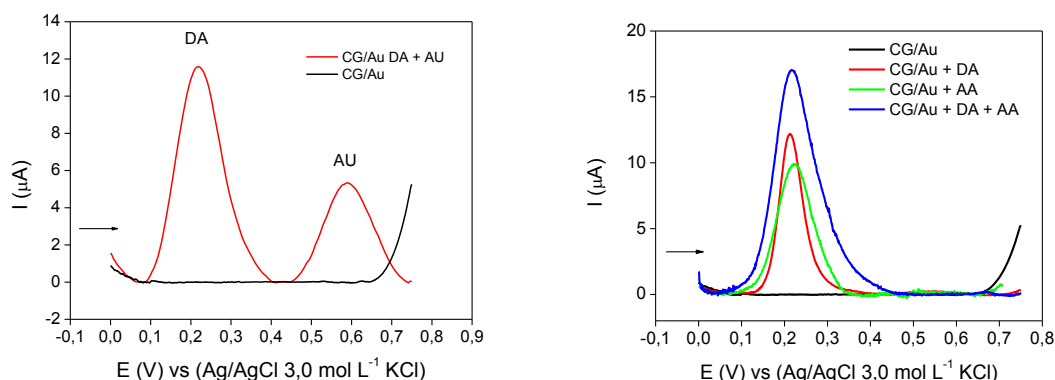
De acordo com a literatura a intensidade da corrente e a largura de pico estão diretamente correlacionadas com a amplitude de pulso. Portanto, deve haver um compromisso ao avaliar a melhor amplitude do pulso, pois valores altos de amplitude implicam em um aumento de corrente e valores baixos de implicam em um ganho em definição do pico.^{201,203} Neste sentido, mantendo constante a f em 100 Hz e o ΔE_s em 5 mV, verificou-se que a intensidade da corrente de pico anódica aumentou em função do aumento da amplitude, entretanto valores superiores a

70 mV não apresentaram influência significativa na intensidade de corrente. Neste sentido, optou-se pela amplitude de 70 mV para os demais estudos. Na voltametria de onda quadrada a velocidade efetiva é dada pelo produto da frequência (f) pelo incremento de varredura de potencial (ΔE_s). De acordo com a teoria, a intensidade da corrente de pico pode aumentar em função do aumento da f . Entretanto, em sistemas que utilizam valores de frequência elevados, o aumento da intensidade de corrente de pico pode não ser proporcional a frequência, pois a velocidade de varredura pode ser mais rápida do que a cinética do processo faradaico.²⁰¹ Neste sentido, mantendo os valores de amplitude (70 Hz) e incremento de pulso (5 mV) constantes, a frequência de pulso foi avaliada na faixa de 10 a 100 Hz, na faixa estudada verificou-se que a corrente de pico aumentou com o aumento da f , entretanto este aumento na intensidade de corrente também é acompanhado pelo aumento da largura de pico, portanto, considerando a intensidade de corrente e a largura do pico, a frequência de 70 mV foi estipulada para as demais caracterizações. A influência do incremento de pulso foi avaliada na faixa de 1 a 10 mV, e verificou-se que a corrente de pico diminuiu em função do aumento do valor de incremento, devido ao aumento da velocidade de varredura efetiva, logo o incremento de 1 mV foi utilizado para as demais medidas. Portanto, as condições otimizadas foram $f = 70$ Hz, $a = 70$ mV e $\Delta E_s = 1$ mV.

4.4.4 Detecção eletroquímica simultânea de DA e AU

Tanto a dopamina quanto o ácido ascórbico e ácido úrico podem coexistir em fluidos biológicos e são associados a doenças, tais como Parkinson, arteriosclerose e artrite.^{204,205} Neste sentido, a determinação destas espécies é de grande importância. O perfil voltamétrico bem como a dificuldade da detecção eletroquímica simultânea destas espécies, já é bem conhecido e relatado na literatura.^{206,207,208} Portanto, estas moléculas foram escolhidas como modelo para averiguar a seletividade do eletrodo na detecção de DA na presença de AA e AU (Figura 51).

Figura 51 Voltamogramas de onda quadrada do eletrodo CG/Au obtidos, em PBS 0,1 mol. L⁻¹, pH = 7,0, (A) na presença de DA 90 μmol. L⁻¹ e AU 100 μmol. L⁻¹ (B) na presença de DA 90 μmol. L⁻¹ e AA 100 μmol. L⁻¹.

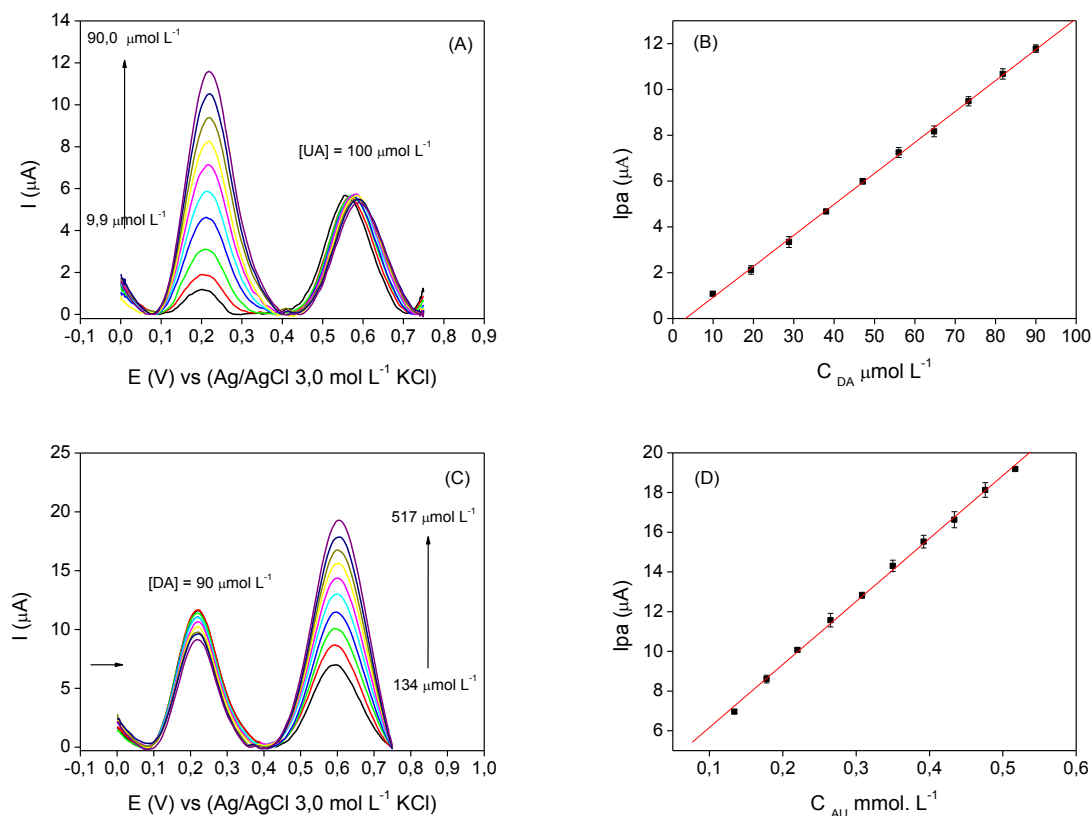


Fonte: O autor.

Os resultados apresentados pelas Figuras 51A e 51B, corroboram com os resultados obtidos com a técnica de voltametria cíclica, os quais mostram que o eletrodo CG/Au é seletivo na detecção simultânea de DA e AU com separação de potenciais de picos de 370 mV. Entretanto as medidas voltamétricas não permitiram a detecção simultânea das espécies DA e AA, devido à sobreposição dos potenciais de picos. Comparando as intensidades de correntes de picos na detecção separada das espécies DA e AA e na mistura destes, verifica-se que ocorre um incremento da intensidade de corrente na detecção simultânea. Este resultado é um indicativo de que pode estar ocorrendo reações acopladas. De acordo com a literatura,^{209,210} a dopamina *orto*-quinona gerada na oxidação da dopamina pode reagir com o ácido ascórbico em solução, o qual pode regenerar a dopamina *orto*-quinona a dopamina novamente.

A resposta do eletrodo CG/Au na detecção simultânea de DA e AU foi avaliada, variando tanto a concentração de DA como de AU, de acordo com o mostrado na Figura 52.

Figura 52 (A) Voltamogramas de onda quadrada do eletrodo CG/Au na presença da mistura contendo diferentes concentrações de DA na faixa de 9,9 to 90 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ e AU com concentração fixa 100 $\mu\text{mol. L}^{-1}$. (B) Curva analítica para a determinação de dopamina. (C) Voltamogramas de onda quadrada do eletrodo CG/Au na presença da mistura contendo diferentes concentrações de AU na faixa de 134 a 517 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ e DA com concentração fixa de 90 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ em 0,1 mol. L^{-1} de PBS, pH = 7,0. (D) Curva analítica para a determinação de ácido úrico. A barra de erro representa o desvio padrão de três medidas, obtidas com o mesmo eletrodo.



Fonte: O autor.

As respostas de corrente em função da variação da concentração tanto de DA (Figura 52 A) como de AU (Figura 52 B) mostram-se linearmente dependentes. As curvas analíticas e os coeficientes de correlação correspondentes as determinações de DA e AU são $y = 4,20 \times 10^{-7} + 0,1350x$, $R = 0,999$, $y = 3,02 \times 10^{-6} + 0,0316x$, $R = 0,998$, respectivamente. Os limites de detecção e quantificação calculados para ambas as espécies foram de LD = 1,8 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ e LQ = 6,1 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ para DA e de LD = 17,6 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ e LQ = 58,9 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ para o AU, os quais foram determinados seguindo-se os critérios definidos pela IUPAC.²¹¹ Os valores dos limites de detecção apresentados por este dispositivo foram comparados aos relatados na literatura,²⁰⁶⁻²¹³ como pode ser visto na Tabela 16.

Tabela 16 Comparação dos limites de detecção dos sensores aplicados na detecção simultânea de dopamina e ácido úrico.

Eletrodos	Faixa avaliada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		ΔE_p mV	Referências
	DA	AU	DA	AU		
CGE ^a /Au-PtNP ^b	103,0 – 165,0	21,0 – 336	24,0	21,0	170	206
ITO ^c /SiPy ⁺ Cl ^{-d} /NiTsPc ^e	10,0 – 99,0	100,0 – 900	2,3	5,2	460	207
CG ^f /PPy ^g /AgNP ^h	0,5 – 155,0	2,0 – 100	0,1	0,5	170	208
CGE/RGO ⁱ /PAMAM ^j /MWCNT ^k /AuNP ^l	10,0 – 320,0	1,0 – 114	3,3	0,3	130	212
CGE/PAYR ^m	83,6 – 488,1	381,6 – 1.118	0,1	9,5	130	213
CG/Au	9,9 – 90,0	134 - 517	1,8	17,6	370	Este trabalho

a_ eletrodo de carbono vítreo; b_ nanopartículas de ouro e platina, c_ óxido de estanho dopado com índio, d_ cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano, e_ ftalocianina tetrasulfonada de níquel, f_ eletrodo de carbono grafite, g_ polipirrol, h_ nanopartículas de prata, i_ óxido de grafeno, j_ dendrímero poliamidoamina, k_ nanotubos de carbono de paredes múltiplas, l_ nanopartículas de ouro, m_ polializarina.

Comparando os valores de LD apresentados na Tabela 16, verifica-se que o sensor proposto apresentou valores semelhantes ou inferiores a outros eletrodos com diferentes transdutores além de apresentar um dos maiores valores de separação de potenciais de pico na detecção simultânea de DA e AU. Vale ressaltar que o eletrodo CG além de apresenta um custo baixo, a técnica de eletrodeposição utilizada no processo de modificação do eletrodo CG, permite ser aplicada em escala industrial, e a quantidade de resíduos gerados durante o processo é mínimo. Portanto o sensor proposto é uma alternativa para o sensoriamento de DA e AU de baixo custo e apresenta potencial para a produção em escala industrial.

5 Conclusões

Neste trabalho, foi demonstrado que o eletrodo de carbono grafite obtido das pilhas modificado com partículas de ouro pela técnica de eletrodeposição potenciostática é um método simples, econômico e eficiente para a detecção de eletroquímica simultânea de dopamina e ácido úrico.

As caracterizações espectroscópicas mostraram a presença de defeitos na estrutura do eletrodo de CG, no entanto as análises de EDS indicaram que mais de 99% da composição do eletrodo, é de carbono. Pela técnica de difração de raios X, foi constatado que o CG apresenta estrutura cristalina hexagonal, com espaçamento interlamelar de 3,4 Å, característica de materiais gráfiticos. Estudos voltamétricos mostraram que dos eletrodos CG são reprodutíveis, com pequena variação da intensidade de corrente de pico para diferentes eletrodos.

A técnica de eletrodeposição é uma ótima estratégia para deposição de microestruturas de metais nobres, tais como o ouro, pois é possível alterar tanto o tamanho como a morfologia das microestruturas a partir da variação de potencial. A otimização das condições utilizadas no

processo de eletrodeposição foram fundamentais para obter as microestruturas, as quais se apresentaram homogeneamente distribuídas sobre a superfície do eletrodo, e dobraram a área eletroativa em comparação ao eletrodo de carbono não modificado. Este aumento da área eletroativa proporcionou ao sensor, uma maior intensidade de corrente de pico, tanto na detecção de DA como na detecção simultânea de DA e AU, comparada aos eletrodos de Au e CG não modificados. Além da seletividade, o eletrodo apresentou limite de detecção semelhante a outros eletrodos reportados na literatura. Entretanto, o eletrodo proposto, além de ser um material alternativo e de baixo custo, a superfície pode ser renovada e a quantidade de resíduos gerada pelo método de modificação é mínima, portanto é uma excelente alternativa para a detecção simultânea de DA e AU.

CAPÍTULO IV

Conclusão Geral e Perspectivas Futuras

Conclusões Gerais

A utilização de eletrodos de ouro e de carbono grafite modificado com microestruturas de ouro, apresentam-se como alternativas promissoras para o desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos, em função de suas propriedades físicas e químicas, tais como condutividade elétrica, biocompatibilidade e estabilidade química.

A funcionalização dos eletrodos de ouro com a monocamada de PAMAM-G4 é uma boa estratégia para a construção de biossensores eletroquímicos, pois a estrutura tridimensional e a grande quantidade de grupos aminos terminais da monocamada propiciam uma estrutura favorável para a imobilização de biomoléculas e contribui na manutenção da estrutura nativa e da função biológica das mesmas. Estas características foram evidenciadas pelos resultados apresentados pelo biossensor Au/PAMAM/AChE. Tais resultados mostraram que independente da metodologia empregada no processo de imobilização da enzima AChE, o biossensor apresentou resposta na detecção do substrato enzimático AChI. Entretanto, o biossensor que teve a enzima imobilizada pela metodologia *dip coating* com auxílio do agente de ligação cruzada (glutaraldeído), foi a configuração que apresentou a maior intensidade de corrente anódica na detecção de AChI, provavelmente devido a maior organização da superfície proporcionada por este método de modificação. Os resultados cronoamperométricos mostraram que o biossensor proposto é sensível a variações de concentração de carbaril, pois apresentou uma correlação linear entre as correntes anódicas ($R = 0,987$) e a concentração de carbaril na faixa estudada, apresentando $LD = 0,0108 \mu\text{mol. L}^{-1}$ e $LQ = 0,032 \mu\text{mol. L}^{-1}$.

Outra estratégia utilizada para modificação da superfície de Au foi a partir da SAM de MPA e os antígenos *T. cruzi* possibilitando a construção do imunossensor Au/MPA/AG/BSA, o qual foi aplicado na detecção qualitativa de anticorpos *T. cruzi* em amostras de soro. As otimizações efetuadas no processo de imobilização do antígeno, bem como o uso de albumina de soro bovino foram importantes, pois minimizaram possíveis diagnósticos falso/positivo. Os resultados de impedância mostraram que o imunossensor proposto é viável para o diagnóstico qualitativo de anticorpos de *T. cruzi* em matrizes complexas, tais como em amostras de soro e na presença de anticorpos *Toxoplasma*, pois estes não interferiram no desempenho do sensor. Portanto, a metodologia proposta é reprodutível e viável para a detecção de anticorpos de *T. cruzi* e pode ser uma alternativa para diagnóstico *in situ*.

Os eletrodos CG obtidos a partir de pilhas esgotadas apresentaram-se como alternativa promissora para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos, em função de suas vantagens, tais como baixo custo, robustez e facilidade de modificação. Além disso, a superfície pode ser

renovada após o processo de polimento. A técnica de eletrodeposição potencioestática é uma ótima estratégia para modificação de superfície com partículas metálicas, pois permite controlar o tamanho e a morfologia das partículas depositadas, variando as condições de deposição, tais como o tempo de eletrodeposição, sobrepotencial e a concentração do precursor. A eletrodeposição de partículas de ouro sobre os eletrodos CG, além de aumentar a área eletroativa promoveu a eletrocatalise da oxidação da dopamina, pois o eletrodo CG/Au apresentou os maiores valores de densidade de corrente anódica e a menor ΔE_p comparada aos eletrodos não modificados CG e Au. Estes resultados podem ser atribuídos aos efeitos sinérgicos entre as partículas de ouro e o eletrodo de carbono grafite. O eletrodo CG/Au apresentou-se seletivo na detecção simultânea de dopamina e ácido úrico, com limites de detecção semelhantes ou inferiores há outros eletrodos já relatados na literatura. Desta forma, pode-se concluir que os eletrodos CG combinados com a técnica de eletrodeposição constituem uma excelente estratégia para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos.

Perspectivas Futuras

Este trabalho de pesquisa abriu algumas perspectivas de estudo, principalmente com relação a utilização de eletrodos de ouro e carbono, no desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos. Neste sentido, as propostas para a continuação do trabalho, são as seguintes:

- Utilizar eletrodos de ouro funcionalizados com tióis que apresentem diferentes tamanhos de cadeias alquílicas, como plataforma para a imobilização de biomoléculas, tais como enzimas, antígenos ou anticorpos, visando o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos;
- Sintetizar dendrímeros de diferentes gerações com núcleo de cistamina, pois estes além de apresentar uma grande quantidade de grupos funcionais terminais e a estrutura tridimensional, os átomos de enxofre permitem a quimissorção direta sobre a superfície de eletrodos de ouro;
- Utilizar eletrodos de ouro impressos, funcionalizados com monocamadas de tióis que apresentem grupos aminos terminais, os quais podem viabilizar a imobilização covalente de anticorpos, visando à detecção eletroquímica de antígenos em amostras de soro;
- Modificar a superfície do eletrodo CG utilizando a técnica de eletrodeposição, com partículas metálicas de diferentes metais, visando à aplicação como sensor eletroquímico;
- Recuperar os metais Manganês e Zinco dos resíduos das pilhas, os quais podem posteriormente ser eletrodepositados sobre a superfície do eletrodo CG, visando o desenvolvimento de supercapacitores.

Referências Bibliográficas

- 1 Zhu, C.; Yang, G.; Li, H.; Du, D.; Lin, Y.; Electrochemical sensors and biosensors based on nanomaterials and nanostructures. **Analytical Chemistry** v. 87, p. 230-249, 2015.
- 2 Justino, C. I. L.; Freitas, A. C.; Pereira, R.; Duarte, A. C.; Santos, T. A. P. R.; Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 68, p. 2-17, 2015.
- 3 Hulanicki, A.; Glab, S.; Ingman, F.; Chemical sensors. Definitions and classification. **Pure Appl. Chem.** v. 63, p. 1247-1250, 1991.
- 4 Das, P.; Das, M.; Chinnadayala, S. R.; Singha, I. M.; Goswami, P.; Recent advances on developing 3rd generation enzyme electrode for biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 79, p. 386-397, 2016.
- 5 Ji, X.; Dong, S.; Wang, E.; Engineering the bioelectrochemical interface using functional nanomaterials and microchip technique toward sensitive and portable electrochemical biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 76, p. 80-90, 2016.
- 6 Scanlon, M. D.; Kosla, U. S.; Belochapkine, S.; MacAodha, D.; Leech, D.; Ding, Y.; Magner, E.; Characterization of nanoporous gold electrodes for bioelectrochemical applications. **Langmuir**, v. 28, p. 2251-2261, 2012.
- 7 Song, Y.; Luo, Y.; Zhu, C.; Li, H.; Du, D.; Lin, Y.; Recent advances in electrochemical biosensors based on graphene two-dimensional nanomaterials. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 76, p. 195-212, 2016.
- 8 Ulman, A.; Formation and structure of self-assembled monolayers. **Chemical Reviews**, v. 96, p. 1533-1554, 1996.
- 9 Zisman, W. A.; Bigelow, W. C.; Pickett D. L.; Oleophobic monolayers films adsorbed from solution in non-polar liquids. **Journal Colloid Interface Science**, v. 1, p. 513. 1946.
- 10 Rosario, C. B.; Fachini, E. R.; Hernandez, J.; Electrochemical and surface characterization of 4-aminothiophenol adsorption at polycrystalline platinum electrodes. **Langmuir**, v. 22, p. 6102-6108, 2006.
- 11 Doubova, L. M.; Electron transfer though single-crystal silver electrode/n-decanthiol monolayer/NaNO₃ solution interfaces. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 46, p. 450-460, 2010.
- 12 Arduini, F.; Guidonea, S.; Amineb, A.; Palleschi, G.; Moscone, D.; Acetylcholinesterase biosensor based on self-assembled monolayer-modified gold-screen printed electrodes for organophosphorus insecticide detection. **Sensors and Actuators B**, v. 179, p. 201-208, 2012.
- 13 Cancino, J.; Machado, S. A. S.; Microelectrode array in mixed alkanethiol self-assembled monolayers: Electrochemical studies. **Electrochimica Acta**, v. 72, p. 108-113, 2012.

- 14 Lehn, R. C. V.; Katz, A. A.; Free energy change for insertion of charged, monolayer-rotected nanoparticles into lipid bilayers. **Soft Matter**, v. 10, p. 648-658, 2014.
- 15 Afkhami, A.; Kafrashi, F.; Ahmadi, M.; Madrakian, T.; A new chiral electrochemical sensor for the enantioselective recognition of naproxen enantiomers using L-cysteine self-assembled over gold nanoparticles on a gold electrode. **RSC Advance**, v. 5, p. 58609-58615, 2015.
- 16 Ren, W.; Zhoua, L. Y.; Zhanga, Y.; Li, N. B.; Luo, H. Q.; A reusable and label-free supersandwich biosensor for sensitive DNA detection by immobilizing target-triggered DNA concatamers on ternary self-assembled monolayer. **Sensors and Actuators B**, v. 223, p. 24-29, 2016.
- 17 Tomalia, D. A.; Dendrons/dendrimers: quantized, nano-element like building blocks for soft-soft and soft-hard nano-compound synthesis. **Soft Matter**, v. 6, p. 456-474, 2010.
- 18 Bahadır, E. B.; Sezgentürk, M. K.; Poly(amidoamine) (PAMAM): An emerging material for electrochemical bio(sensing) applications. **Talanta**, v. 148, 427-438, 2016.
- 19 Lombardo, D.; Modeling dendrimers charge interaction in solution: relevance in biosystems. **Biochemical Research International**, v. 2014, p. 1-10, 2014.
- 20 Niki, Y.; Ogawa, M.; Makiura, R.; Magata, Y.; Kojima, C.; Optimization of dendrimer structure for sentinel lymph node imaging: effects of generation and terminal group. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 11, p. 2119-2127, 2015.
- 21 Diéz, P.; Piuleac, C. G.; Ruiz, P. M.; Romano, S.; Gamella, M.; Villalonga, R.; Pingarrón, J. M.; Supramolecular immobilization of glucose oxidase on gold coated with cyclodextrin-modified cysteamine core PAMAM G-4 dendron/Pt nanoparticles for mediatorless biosensor design. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 3773-3781, 2013.
- 22 Hasanzadeh, M.; Shadjou, N.; Eskandani, M.; Soleymani, J.; Jafari, F.; Guardia, M.; Dendrimer-encapsulated and cored metal nanoparticles for electrochemical nanobiosensing. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 53, p. 137-149, 2014.
- 23 Ning, D.; Zhang, H.; Zheng, J.; Electrochemical sensor for sensitive determination of nitrite based on the PAMAM dendrimer-stabilized silver nanoparticles. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 717, p. 29-33, 2014.
- 24 Zhang, Y.; Liu, X.; Li, L.; Guo, Z.; Xue, Z.; Lu, X.; An electrochemical paracetamol sensor based on layer-by-layer covalent attachment of MWCNTs and a G 4.0 PAMAM modified GCE. **Analytical Methods**, v. 8, p. 2218-2225, 2016.
- 25 Araque, E.; Villalonga, R.; Gamella, M.; Ruiz, P. M.; Reviejo, J.; Pingarrón, J. M.; Crumpled reduced graphene oxide-polyamidoamine dendrimer hybrid nanoparticles for the preparation of an electrochemical biosensor. **Journal Materials Chemistry B**, v. 1, p. 2289-2296, 2013.

- 26 Villalonga, R.; Diez, P.; Gamella, M.; Reviejo, A. J.; Romano, S.; Pingarron, J. M.; Layer-by-layer supramolecular architecture of cyclodextrin-modified PAMAM dendrimers and adamantane-modified peroxidase on gold surface for electrochemical biosensing. **Electrochimica Acta**, v. 76, p. 249-255, 2012.
- 27 Pundir, C. S.; Chauhan, N.; Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. **Analytical Biochemistry**, v. 429, p. 19-31, 2012.
- 28 Ahamed, M.; Latif, N.; Khan, R. A.; Ahmad, A.; Rocha, J. B. T.; Mazzanti, C. M.; Bagatini, M. D.; Morsch, V. M.; Schetinger, M. R. C.; Enzymatic and biochemical characterization of bungarus sindanus snake venom acetylcholinesterase. **Journal Venom Anim Toxins incl Trop Dis**, v. 18, p. 236-243, 2012.
- 29 Amine, A.; Arduini F.; Moscone, D.; Palleschi, G.; Recent advances in biosensors based on enzyme inhibition. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 76, p. 180-194, 2016.
- 30 Cancino, J.; Razzino, C. A.; Zucolotto, V. Z.; Machado, S. A. S.; The use of mixed self-assembled monolayers as a strategy to improve the efficiency of carbamate detection in environmental monitoring. **Electrochimica Acta**, v. 87, p. 717-723, 2013.
- 31 Liu, Q.; Fei, A.; Huan, J.; Mao, H.; Wang, K.; Effective amperometric biosensor for carbaryl detection based on covalent immobilization acetylcholinesterase on multiwall carbon nanotubes/graphene oxide nanoribbons nanostructure. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 740, p. 8-13, 2015.
- 32 Cesarino, I.; Moraes, F. C.; Lanza, M. R. V.; Machado, S. A. S.; Electrochemical detection of carbamate pesticides in fruit and vegetables with a biosensor based on acetylcholinesterase immobilised on a composite of polyaniline-carbon nanotubes. **Food Chemistry**, v. 135, p. 873-879, 2012.
- 33 Carvalhal, R. F.; Feire, R. S.; Kubota, L. T.; Polycrystalline gold electrodes: A comparative study of pretreatment procedures used for cleaning and thiol self-assembly monolayer formation. **Electroanalysis**, v. 17, p. 1251-1259, 2005.
- 34 Bruckenstein, S.; Shay, M.; An in situ weighing study of the mechanism for the formation of the adsorbed oxygen monolayer at a gold electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 188, p. 131-136, 1985.
- 35 Filho, G. T.; Dall'Antonia, L. H.; Jerkiewicz, G.; Growth of surface oxides on gold electrodes under well-defined potential, time and temperature conditions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 578, p. 1-8, 2005.
- 36 Kozlowka, H. A.; Conway, B. E.; Hamelin, A.; Stoicoviciu, L.; Elementary steps of electrochemical oxidation of single crystal plane of Au. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 228, p. 429-453. 1987.
- 37 Burke, L. D.; Nugent, P. F.; The electrochemistry of gold: I the redox behaviour of the metal in aqueous media. **Gold Bulletin**, v. 30, p. 43-53, 1997.

- 38 Trastti, S.; Petri, A.; Real surface area measurements in electrochemistry. **Pure & Applied Chemistry**, v. 63, p. 711-734, 1991.
- 39 Tomalia, D. A.; Huang, B.; Swanson, D. R.; Brothers, H. M.; Klimash, J. W.; Structure control within poly(amidoamine) dendrimers: size, shape and regio-chemical mimicry of globular proteins. **Tetrahedron**, v. 59, p. 3799-3813, 2005.
- 40 Hamer, M.; Carballo, R. R.; Rezzano, I. N.; Electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide by nanostructured bimetallic films of metalloporphyrins. **Electroanalysis**, v. 21, p. 2133-2138, 2009.
- 41 Shervedani, R. K.; Mehrjardi, A. H.; Comparative electrochemical behavior of glucose oxidase covalently immobilized on mono-di and tetra-carboxylic acid functional Au-thiol SAMs via anhydride-derivatization route. **Sensors and Actuators B**, v. 137, p. 195-204, 2009.
- 42 Vidal, J. C.; Espuelas, J.; Castillo, J. R.; Amperometric cholesterol biosensor based on in situ reconstituted cholesterol oxidase on an immobilized monolayer of flavin adenine dinucleotide cofactor. **Analytical Biochemistry**, v. 333, p. 88-98, 2004.
- 43 Schwartz, D. K.; Mechanisms and kinetics of self-assembled monolayer formation. **Annual Review Physical Chemistry**, v. 52, p. 107-137, 2001.
- 44 Wong, E. H. J.; May, G. L.; Wilde, C. P.; Oxidative desorption of thiols as a route to controlled formation of binary self assembled monolayer surfaces. **Electrochimica Acta**, v. 109, p. 67-74, 2014.
- 45 Love, J. C.; Kribel, L. A. E. J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M.; Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 105, p. 1103-1169, 2005.
- 46 Sun, K.; Jiang, B.; Jiang, X.; Electrochemical desorption of self-assembled monolayers and its applications in surface chemistry and cell biology. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 656, p. 223-230, 2011.
- 47 Hager, G.; Brolo, A. G.; Adsorption/desorption behaviour of cysteine and cystine in neutral and basic media: electrochemical evidence for differing thiol and disulfide adsorption to Au (111) single crystal electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 550, p. 291-301, 2003.
- 48 Zhai, C.; Sun, X.; Zhao, W.; Gong, Z.; Wang, X.; Acetylcholinesterase biosensor based on chitosan/prussian blue/ multiwall carbon nanotubes/hollow gold nanospheres nanocomposite film by one-step electrodeposition. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 42, p. 124-130, 2013.
- 49 Milkani, E.; Lambert, C. R.; Gimpsey, W. G.; Direct detection of acetylcholinesterase inhibitor binding with an enzyme-based surface plasmon resonance sensor. **Analytical Biochemistry**, v. 408, p. 212-219, 2011.

- 50 Ajore, R.; Kumar, R.; Kaur, I.; Sobti, R. C.; Bharadwaj, L. M.; DNA immobilization chemical interference due to aggregates study by dip and drop approach. **Journal Biochemistry Biophysical Methods**, v. 70, p. 779-785, 2007.
- 51 Beyene, N. W.; Moderegger, H.; Kalcher, K.; Simple and effective procedure for immobilization of oxidases onto MnO₂-bulk-modified, screen-printed carbon electrodes. **S. Afr. J. Chem**, v. 57, p. 1-7, 2004.
- 52 Ojani, R.; Raoof, J. B.; Babzadeh, R.; Electrocatalytic oxidation of hydrogen peroxide using iodide as mediator; application for its simple and selective determination. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 57, p. 1042-1049, 2010.
- 53 Ferreira, F. C.; Moretto, L. M.; Leo, M.; Zanoni, M. V. B.; Ugo, P.; Gold nanoelectrode ensembles for direct trace electroanalysis of iodide. **Analytica Chimica Acta**, v. 575, p. 16-24, 2006.
- 54 Chen, H.; Zhang, Q.; Dang, Y.; Shu, G.; The effect of glutaraldehyde cross-linking on the enzyme activity of immobilized β -Galactosidase on chitosan bead. **Advance Journal Food Science Technology**, v. 7, p. 932-935, 2013.
- 55 Crespilho, F. N.; Ghica, M. E.; Caridade, C. G.; Oliveira Jr. O. N.; Brett, C. M. A.; Enzyme immobilisation on electroactive nanostructured membranes (ENM): Optimised architectures for biosensing. **Talanta**, v. 76, p. 922-928, 2008.
- 56 Migneaut, I.; Dartiguenave, C.; Bertrand, M. J.; Waldron, K. C.; Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, v. 37, p. 790-802, 2004.
- 57 Atkins, P.; Jones, L.; Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente. 3ª ed., editora Bookman, p. 615-616, 2006.
- 58 Champ, P. C.; Bioquímica. 3ª ed.; editora Artmed, 2006.
- 59 Bowden, A. C.; The origins of enzyme kinetics. **FEBS Letters**, v. 587, p. 2725-2730, 2013.
- 60 Carvalho, N. M. F.; Pires, B. M.; Antunes, O. A. C.; Faria, R. B.; Uso de equações lineares na determinação dos parâmetros de Michaelis-Menten. **Química Nova**, v. 33, p. 1607-1611, 2010.
- 61 Tummeler, K.; Lubitz, T.; Schelker, M.; Klipp, E.; New types of experimental data shape the use of enzyme kinetics for dynamic network modeling. **FEBS Journal**, v. 281, p. 549-571, 2014.
- 62 Pohanka, M.; Hrabínova, M.; Kuca, K.; Simonato, J. P.; Assessment of acetylcholinesterase activity using indoxylacetate and comparison with the standard Ellman's method. **International Journal Molecular Sciences**; v. 12, p. 2631-2640, 2011.
- 63 Marques, P. R. B. O.; Yamanaka, H.; Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 31, p. 1791-1799, 2008.

- 64 Qu, Y.; Sun, Q.; Xiao, F.; Shi, G.; Jin, L.; Layer-by-Layer self-assembled acetylcholinesterase/PAMAM-Au on CNTs modified electrode for sensing pesticides. **Bioelectrochemistry**, v. 77, p. 139-144, 2009.
- 65 Vakurov, A.; Simpson, C. E.; Daly, C. L.; Gibson, T. D.; Millner, P. A.; Acetylcholinesterase-based biosensor electrodes for organophosphate pesticide detection: I modification of carbon surface for immobilization of Acetylcholinesterase. **Biosensors Bioelectronics**, v. 20, p. 1118-1125, 2004.
- 66 Bowden, A. C.; Analysis and interpretation of enzyme kinetic data. **Perspectives in Science**, v. 1, p. 121-125, 2014.
- 67 Bucur, B.; Fournier, D.; Danet, A.; Marty, J. L.; Biosensors based on highly sensitive acetylcholinesterases for enhanced carbamate insecticides detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 562, p. 115-121, 2006.
- 68 Zhou, Q.; Yang, L.; Wang, G.; Yang, Y.; Acetylcholinesterase biosensor based on SnO₂ nanoparticles–carboxylicgraphene–nafion modified electrode for detection of pesticides. **Biosensors and Bioelectronics**; v. 49, p. 25-31, 2013.
- 69 Mocak, J.; Bond, A. M.; Mitchell, S.; Scollary, G. A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: Application to voltammetric and stripping techniques (Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 69, p. 297-328, 1997.
- 70 Pedrosa, V. A.; Caetano, J.; Machado, S. A. S; Bertotti, M.; Determination of parathion and carbaryl pesticides in water and food samples using a self assembled monolayer/acetylcholinesterase electrochemical biosensor. **Sensors**, v. 8, p. 4600-4610, 2008.
- 71 Mehrjardi, A. H.; Bienzyme self-assembled monolayer on gold electrode: An amperometric biosensor for carbaryl determination. **Electrochimica Acta**, v. 114, p. 394-402, 2013.
- 72 Song, Y.; Zhang, M.; Wang, L.; Wan, L.; Xiao, X.; Ye, S.; Wang, J.; A novel biosensor based on acetylcholinesterase/prussian blue–chitosan modified electrode for detection of carbaryl pesticides. **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 7267-7271, 2011.
- 73 Caetano, J.; Machado, S. A. S.; Determination of carbaryl in tomato “in natura” using an amperometric biosensor based on the inhibition of acetylcholinesterase activity. **Sensors and Actuators B**, v. 129, p. 40-46, 2008.
- 74 Hotez, P. J.; Alvarado, M.; Basáñez, M. G.; Bolliger, I.; Bourne, R.; Murray, C. J. L.; Naghavi, M.; The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases. **PLoS Neglected Tropical Disease**; v. 8, p. 2865, 2014.
- 75 Lima, A. C.; Vázquez, M. C. G.; Moralesa, O. R.; Pacheco, L. B.; Encina, J. L. R.; López, P. A. R.; Fonseca, M. A.; Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: An update. **Acta Tropica**, v. 127, 126-135, 2013.

76 WHO Technical report series research priorities for chagas disease, human african trypanosomiasis and leishmaniasis. ISBN978924120975 5, ISSN 0512-3054, 2012.

77 Ferrer, E.; Lares, M.; Viettri, M.; Medina, M.; Comparación entre técnicas inmunológicas y moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. **Enferm Infectious Microbiology Clinics**; p. 31277-31282, 2013.

78 WHO. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases. 2010 [acessado em junho de 2014]. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf

79 Riccardi, C. S.; Costa, P. I.; Yamanaka, H. Imunossensor amperométrico, **Química Nova**, v. 25, p. 316-320, 2002.

80 Kokkinos, C.; Economou, A.; Prodromidis, M. I.; Electrochemical immunosensors: Critical survey of different architectures and transduction strategies. **Trends in Analytical Chemistry**, doi: 10.1016/j.trac.2015.11.020, 2015.

81 Mistry, K. K.; Layek, K.; Mahapatra, A.; Chaudhuri, C. R.; Saha, H.; A review on amperometric-type immunosensors based on screen-printed electrodes. **Analyst**, v. 139, p. 2289-2311, 2014.

82 Bahadır, E. B.; Sezgentürk, M. K.; Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics. **Talanta**, v. 132, p. 162-174, 2015.

83 Landín, A. Y. C.; Martínez, I.; Schabib, M.; Espinoza, B.; High molecular weight proteins of trypanosoma cruzi reduce cross-reaction with leishmania spp. in serological diagnosis tests. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

84 Bottino, C. G.; Gomes, L. P.; Pereira, J. B.; Coura, J. R.; Provance, Jr D. W.; Simone, S. G.; Chagas disease-specific antigens: characterization of epitopes in CRA/FRA by synthetic peptide mapping and evaluation by ELISA-peptide assay. **Infectious Diseases**, v. 13, p. 568, 2013.

85 Kringelum, J. V.; Nielsen, M.; Padkjær, S. B.; Lund, O.; Structural analysis of B-cell epitopes in antibody:protein complexes. **Molecular Immunology**, v. 53, p. 24-34, 2013.

86 Ramaraj, T.; Angel, T.; Dratz, E. A.; Jesaitis, A. J.; Mumey, B.; Antigen-antibody interface properties: Composition, residue interactions, and features of 53 non-redundant structures. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.1824, p. 520-532, 2012.

87 Mian, I. S.; Bradwell, A. R.; Olson, A. J.; Structure, Function and properties of antibody binding sites. **Journal Molecular Biology**, v. 217, p. 133-151, 1991.

88 Alzari, P. M.; Lascombe, M. B.; Poljak, R. J.; (1988) Three dimensional structure of antibodies. **Annual Review Immunology**, v. 6, p. 555-580, 1988.

89 Batalla, P.; Fuentes, M.; Mateo, C.; Grazu, V.; Lafuente, R. F.; Guisan, J. M.; Covalent immobilization of antibodies on finally inert support surfaces through their surface regions having the highest densities in carboxyl groups. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 2230-2236, 2008.

- 90 Zhang, Y.; Chen, H.; Gao, X.; Chen, Z.; Lin, X.; A novel immunosensor based on an alternate strategy of electrodeposition and self-assembly. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 35, p. 277-283, 2013.
- 91 Giannetto, M.; Mori, L.; Mori, G.; Careri, M.; Mangia, A.; New amperometric immunosensor with response enhanced by PAMAM-dendrimers linked via self assembled monolayers for determination of alpha-fetoprotein in human serum. **Sensors and Actuators B**, v. 159, p. 185-192, 2011.
- 92 Lin, D.; Tang, T.; Harrison, D. J.; Lee, W. E.; Jemere, A. B.; A regenerating ultrasensitive electrochemical impedance immunosensor for the detection of adenovirus. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 68, p. 129-134, 2015.
- 93 Martins, M. G. R. P.; Furtado, R. F.; Heneine, L. G. D.; Dias, R. S.; Borges, M. F.; Alves, C. R.; Development of an amperometric immunosensor for detection of staphylococcal enterotoxin type A in cheese. **Journal of Microbiology Methods**, v. 91, p. 138-143, 2012.
- 94 Zhao, J.; Luo, L.; Yang, X.; Wang, E.; Dong S; Determination of surface pKa of SAM using an electrochemical titration method. **Electroanalysis**, v. 11, p. 1108-1111, 1999.
- 95 Zhang, Y.; Xu, J. L.; Yuan, Z. H.; Qi, W.; Liu, Y. Y.; He, M. C.; Artificial intelligence techniques to optimize the EDC/NHS-mediated immobilization of cellulase on eudragit L-100. **International Journal Molecular Science**; v. 13, p. 7952-7962, 2012.
- 96 Braiek, M.; Rokbani, A.; Chrouda, B.; Maaref, A.; Renault, N. J.; An Electrochemical Immunosensor for Detection of Staphylococcus aureus Bacteria Based on Immobilization of Antibodies on Self-Assembled Monolayers-Functionalized Gold. **Biosensors**, v. 2, p. 417-426, 2012.
- 97 Cheng, C.; Peng, Y.; Bai, J.; Zhang, X.; Liu, Y.; Fan, X.; Ning, B.; Gao, Z.; Rapid detection of Listeria monocytogenes in milk by self-assembled electrochemical immunosensor. **Sensors and Actuators B**, v. 190, p. 900-906, 2014.
- 98 Luz, J. G. G.; Souto, D. E. P.; Assis, G. F. M.; Lana, M.; Kubota, L. T.; Luz, R. C. S.; Damos, F. S.; Martins, H. R.; Development and evaluation of a SPR-based immunosensor for detection of anti-Trypanosoma cruzi antibodies in human serum. **Sensors and Actuators B**, v. 212, p. 287-296, 2015.
- 99 Ferreira, A. A. P.; Colli, W.; Costa, P. I.; Yamanaka, H.; Immunosensor for the diagnosis of chagas disease. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, p. 175-181, 2005.
- 100 Bradford, M. M.; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- 101 Johnsson, B.; Lofas, S.; Lindquist, G.; Immobilization of proteins to a carboxymethyldextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. **Analytical Biochemistry**, v. 198, p. 268-277, 1991.

- 102 Liu, L.; Deng, D.; Xing, Y.; Li, S.; Yuan, B.; Chen, J.; Xi, N.; Activity analysis of the carbodiimide-mediated amine coupling reaction on self-assembled monolayers by cyclic voltammetry. **Electrochimica Acta**, v. 89, p. 616-622, 2012.
- 103 Limbut, W.; Kanatharana, P.; Mattiasson, B.; Asawatreratanakul, P.; Thavarungkul, P.; A reusable capacitive immunosensor for carcinoembryonic antigen (CEA) detection using thiourea modified gold electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 561, p. 55-61, 2013.
- 104 Asiaei, S.; Nieva, P.; Vijayan, M. M.; Fast kinetics of thiolic self-assembled monolayer adsorption on gold: modeling and confirmation by protein binding. **Journal Physical Chemistry B**, v. 118, p. 13697-13703, 2014.
- 105 Uehara, T. M.; Aguiar, H. B.; Bergamaski, K.; Miranda, P. B.; Adsorption of alkylthiol self-assembled monolayers on gold and the effect of substrate roughness: a comparative study using scanning tunneling microscopy, cyclic voltammetry, second-harmonic generation, and sum-frequency generation. **Journal Physical Chemistry C**, v. 118, p. 20374-20382, 2014.
- 106 Pedrosa, V. A.; Caetano, J.; Machado, S. A. S.; Freire, R. S.; Bertotti, M.; Acetylcholinesterase immobilization on 3-mercaptopropionic acid self assembled monolayer for determination of pesticides. **Electroanalysis**, v. 19, p. 1415-1420, 2007.
- 107 Tsai, T. C.; Huang, F. H.; Chen, J. J.; Selective detection of dopamine in urine with electrodes modified by gold nanodendrite and anionic self-assembled monolayer. **Sensors and Actuators B**, v. 181, p. 179-186, 2013.
- 108 Kakiuchi, T.; Usui, H.; Hobara, D.; Yamamoto, M.; Voltammetric properties of the reductive desorption of alkanethiol self-assembled monolayers from a metal surface. **Langmuir**, v. 18, p. 5231-5238, 2002.
- 109 Sawaguchi, T.; Sato, Y.; Mizutani, F.; Ordered structures of self-assembled monolayers of 3-mercaptopropionic acid on Au(111): in situ scanning tunneling microscopy study. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 3, p. 3399-3404, 2001.
- 110 Macdonald, D. D.; Reflections on the history of electrochemical impedance spectroscopy. **Electrochimica Acta**, v. 51, p. 1376-1388, 2006.
- 111 Brett, C. M. A.; Kresak, S.; Hianik, T.; Brett, A. M. O.; Studies on self-assembled alkanethiol monolayers formed at applied potential on polycrystalline gold electrodes. **Electroanalysis**, v. 15, p. 557-565, 2003.
- 112 Lasia, A.; Impedance of porous electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 397, p. 27-33, 1995.
- 113 Soboleva, T.; Xie, Z.; Shi, Z.; Tsang, E.; Navessin, T.; Holdcroft, S.; Investigation of the through-plane impedance technique for evaluation of anisotropy of proton conducting polymer membranes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 622, p. 145-152, 2008.

- 114 Mendes, R. K.; Freire, R. S.; Fonseca, C. P.; Neves, S.; Kubota, L. T.; Characterization of self-assembled thiols monolayers on gold surface by electrochemical impedance spectroscopy. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 15, p. 849-855, 2004.
- 115 Carvalho, L. A.; Andrade, A. R.; Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Química Nova**, v. 29, p. 796-804, 2006.
- 116 Orazem, M. E.; Tribollet, B.; Electrochemical impedance spectroscopy. John Wiley & Sons, INC; Publication. ISBN: 978-0-470-04140-6, 2008.
- 117 Douglass, Jr., E. F.; Driscoll, P. F.; Liu, D.; Burnham, N. A.; Lambert, C. R.; McGimpsey, W. G. Effect of electrode roughness on the capacitive behavior of self-assembled monolayers. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 7670, 2008.
- 118 Diao, P.; Jiang, D.; Cui, X.; Gu, D.; Tong, R.; Zhong, B.; Studies of structural disorder of self-assembled thiol monolayers on gold by cyclic voltammetry and ac impedance. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 464, p. 61-67, 1999.
- 119 Brito, R.; Tremont, R.; Feliciano, O.; Cabrera, C. R.; Chemical derivatization of self-assembled 3-mercaptopropionic and 16-mercaptohexadecanoic acids at platinum surfaces with 3-aminopropyltrimethoxysilane: a spectroscopic and electrochemical study. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 540, p. 53-59, 2003.
- 120 Biacore Sensor Surface Handbook. version AA; BR-1005-71; Biacore AB: Uppsala, Sweden, 2003.
- 121 Yang, C.; Enhanced physicochemical properties of collagen by using EDC/NHS-crosslinking. **Bull. Mater. Sci.**, v. 35, p. 913-918, 2012.
- 122 Ravalli, A.; Santos, G. P.; Ferroni, M.; Faglia, G.; Yamanaka, H.; Marrazza, G.; New label free CA125 detection based on gold nanostructured screen-printed electrode. **Sensors and Actuators B**, v. 179, p. 194-200, 2013.
- 123 Martins, M. G. R. P.; Furtado, R. F.; Heneine, L. G. D.; Dias, R. S.; Borges, M. F.; Alves, C. R.; Development of an amperometric immunosensor for detection of staphylococcal enterotoxin type A in cheese. **Journal of Microbiological Methods**, v. 91, p. 138-143, 2012.
- 124 Souto, D. E. P.; Silva, J. V.; Martins, H. R.; Reis, A. B.; Luz, R. C. S.; Kubota, L. T.; Damos, F. S.; Development of a label-free immunosensor based on surface plasmon resonance technique for the detection of anti-Leishmania infantum antibodies in canine serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 46, p. 22-29, 2013.
- 125 Prodromidis, M. I.; Impedimetric immunosensors-A review. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 4227-4233, 2010.
- 126 Cieplak, M.; Szwabinska, K.; Sosnowska, M.; Bikram, C. K. C.; Borowicz, P.; Noworyta, K.; D'Souza, F.; Kutner, W.; Selective electrochemical sensing of human serum albumin by semi-covalent molecular imprinting. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 74, p. 960-966, 2015.

- 127 Ricci, F.; Adornetto, G.; Palleschi, G.; A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. **Electrochimica Acta**, v. 84, p. 74-83, 2012.
- 128 Xie, Y.; Chen, A.; Du, D.; Lin, Y.; Graphene-based immunosensor for electrochemical quantification of phosphorylated p53 (S15). **Analytica Chimica Acta**, v. 699, p. 44-48, 2011.
- 129 Hideshima, S.; Sato, R.; Inoue, S.; Kuroiwa, S.; Osaka, T.; Detection of tumor marker in blood serum using antibody-modified field effect transistor with optimized BSA blocking. **Sensors and Actuators B**, v. 161, p. 146-150, 2012.
- 130 Beatty, J. D.; Beatty, B. G.; Vlahos, W. G.; Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. **Journal of Immunological Methods**, v. 100, p. 173-179, 1987.
- 131 Holford, T. R. J.; Davis, F.; Higson, S. P. J.; Recent trends in antibody based sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 34, p. 12-24, 2012.
- 132 Kapil, M. A.; Herr, A. E.; Binding kinetic rates measured via electrophoretic band crossing in a pseudohomogeneous format. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 2601-2609, 2014.
- 133 Dong, J.; Zhao, H.; Xu, M.; Ma, Q.; Ai, S.; A label-free electrochemical impedance immunosensor based on AuNPs/PAMAM-MWCNT-Chi nanocomposite modified glassy carbon electrode for detection of Salmonella typhimurium in milk. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1980-1986, 2013.
- 134 Canbaz, M. C.; Sezginurk, M. K.; Fabrication of a highly sensitive disposable immunosensor based on indium tin oxide substrates for cancer biomarker detection. **Analytical Biochemistry**, v. 446, p. 9-18, 2014.
- 135 Singh, A.; Park, S.; Yang, H.; Glucose-oxidase label-based redox cycling for an incubation period-free electrochemical immunosensor. **Analytical Chemistry**, v. 85, p. 4863-48-68, 2013.
- 136 Sanghavi, B. J.; Varhue, W.; Rohani, A.; Bazydlo, L. A. L.; Chou, C. F.; Swami, N. S.; Ultrafast immunoassays by coupling dielectrophoretic biomarker enrichment in nanoslit channel with electrochemical detection on graphene. **Lab Chip**, v. 15, p. 4563-4570, 2015.
- 137 Fernandes, H. P.; Cesar, C. L.; Castro, M. L. B.; Electrical properties of the red blood cell membrane and immunohematological investigation. **Revista Brasileira de Hematologia Hemoterapia**, v. 33, p. 297-301, 2011.
- 138 Osajima, T.; Suzuki, M.; Neya, S.; Hoshino, T.; Computational and statistical study on the molecular interaction between antigen and antibody. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 53, p. 128-139, 2014.
- 139 Mattos, A. B.; Freitas, T. A.; Silva, V. L.; Dutra, R. F.; A dual quartz crystal microbalance for human cardiac troponin T in real time detection. **Sensors and Actuators B**, v. 161, p. 439-446, 2012.

- 140 Wang, S.; Wu, Z.; Qu, F.; Zhang, S.; Shen, G.; Yu, R.; A novel electrochemical immunosensor based on ordered Au nano-prickle clusters. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 1020-1026, 2008.
- 141 Reverberi, R.; Reverberi, L.; Factors affecting the antigen-antibody reaction. **Blood Transfusion**, v. 5, p. 227-240, 2007.
- 142 Lin, D.; Tang, T.; Harrison, D.; Lee, W. E.; Jemere, A. B.; A regenerating ultrasensitive electrochemical impedance immunosensor for the detection of adenovirus. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 68, p. 129-134, 2015.
- 143 Fellouse, F. A.; Wiesmann, C.; Sidhu, S.; Synthetic antibodies from a four-amino-acid code: A dominant role for tyrosine in antigen recognition. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 101, p. 12467-12472, 2004.
- 144 Vceláková, K.; Zusková, I.; Kenndler, E.; Gas, B.; Determination of cationic mobilities and pKa values of 22 amino acids by capillary zone electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 309-317, 2004.
- 145 Neves, M. M. P. S.; García, M. B. G.; Matos, C. D.; García, A. C.; Multiplexed electrochemical immunosensor for detection of celiac disease serological markers. **Sensors and Actuators B**, v. 187, p. 33-39, 2013.
- 146 McCreery, R. L.; Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 2646-2687, 2008.
- 147 Mao, X.; Yang, X.; Rutledge, G. C.; Hatton, T. A.; Ultra-wide-range electrochemical sensing using continuous electrospun carbon nanofibers with high densities of states. **Applied Materials Interfaces**, v. 6, p. 3394-3405, 2014.
- 148 Wan, H.; Sun, Q.; Li, H.; Sun, F.; Hu, N.; Wang, P.; Screen-printed gold electrode with gold nanoparticles modification for simultaneous electrochemical determination of lead and copper. **Sensors and Actuators B**, v. 209, p. 336-342, 2015.
- 149 Baio, J. A. F.; Ramos, L. A.; Cavaleiro, É. T. G.; Construção de eletrodo de grafite retirado de pilha comum: Aplicações didáticas. **Química Nova**, v. 37, p. 1078-1084, 2014.
- 150 Silva, R. G.; Silva, C. N.; Afonso, J. C.; Recovery of manganese and zinc from spent Zn-C and alkaline batteries in acid medium. **Química Nova**, v. 33, p. 1957-1961, 2010.
- 151 Silva, P. S.; Schmitz, E. P. S.; Spinelli, A.; Garcia, J. R.; Electrodeposition of Zn and Zn-Mn alloy coatings from an electrolytic bath prepared by recovery of exhausted zinc-carbon batteries. **Journal of Power Sources**, v. 210, p. 116-121, 2012.
- 152 Asadian, E.; Irajizad, A.; Shahrokhian, S.; Voltammetric studies of Azathioprine on the surface of graphite electrode modified with graphene nanosheets decorated with Ag nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 1098-1104, 2016.

153 Silva, I. S.; Araújo, M. F. A.; Ferreira, H. A.; Tanaka, S. M. C. N.; Tanaka, A. A.; Angnes, L.; Quantification of N-acetylcysteine in pharmaceuticals using cobalt phthalocyanine modified graphite electrodes. **Talanta**, v. 83, p. 1701-1706, 2011.

154 Sağlam, Ö.; Kızılkaya, B.; Uysal, H.; Dilgin, Y.; Biosensing of glucose in flow injection analysis system based on glucose oxidase-quantum dot modified pencil graphite electrode. **Talanta**, v. 147, p. 315-321, 2016.

155 Shu, H.; Cao, L.; Chang, G.; He, H.; Zhang, Y.; He, Y.; Direct electrodeposition of gold nanostructures onto glassy carbon electrodes for non-enzymatic detection of glucose. **Electrochimica Acta**, v. 132, p. 524-532, 2014.

156 You, H.; Yang, S.; Dinga, B.; Yang, H.; Synthesis of colloidal metal and metal alloy nanoparticles for electrochemical energy applications. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 2880-2904, 2013.

157 Paunovic, M.; Schlesinger, M.; Fundamentals of electrochemical deposition, John Wiley & Sons, INC., Publication, segunda edição. ISBN:978-0-471-71221-3. 2006.

158 Gurrappa, I.; Binder, L.; Electrodeposition of nanostructured coatings and their characterization-a review. **Science Technology Advanced Materials**, v. 9, p. 43001-43012, 2008.

159 Brett, C. M. A.; Brett, A. M. O.; Electrochemistry: principles, methods, and applications. Oxford University Press, Oxford, ISBN: 9780198553885.

160 Scharifker, B.; Hills, G.; Theoretical and experimental studies of multiple nucleation. **Electrochim. Acta**, v. 28, p. 879-889, 1983.

161 Sheridan, E.; Hjelm, J.; Forster, R. J.; Electrodeposition of gold nanoparticles on fluorine-doped tin oxide: Control of particle density and size distribution. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 608, p. 1-7, 2007.

162 Gu, S.; Wang, X. P.; Wei, Y. Z.; Fang, B. Z.; Mechanism for nucleation and growth of electrochemical deposition of palladium(II) on a platinum electrode in hydrochloric acid solution. **Science China Chemistry**, v. 57, p. 755-762, 2014.

163 German, N.; Ramanavicius, A.; Ramanaviciene, A.; Electrochemical deposition of gold nanoparticles on graphite rod for glucose biosensing. **Sensors and Actuators B**, v. 203, p. 25-34, 2014.

164 Chowdhury, D. R.; Singh, C.; Paul, A.; Role of graphite precursor and sodium nitrate in graphite oxide synthesis. **RSC Advance**, v. 4, p. 15138-15145, 2014.

165 Zhou, Z.; Bouwman, W. G.; Schut, H.; Pappas, C.; Interpretation of X-ray diffraction patterns of (nuclear) graphite. **Carbon**, v. 69, p. 17-24, 2014.

166 Wang, Q.; Han, X. H.; Sommers, A.; Park, Y.; Joen, C. T.; Jacobi, A.; A review on application of carbonaceous materials and carbon matrix composites for heat exchangers and heat sinks. **International Journal of Refrigeration**, v. 35, p. 7-26, 2012.

167 Milev, A.; Wilson, M.; Kannangara, G. S. K.; Tran, N.; X-ray diffraction line profile analysis of nanocrystalline graphite. **Materials Chemistry and Physics**, v. 111, p. 346-350, 2008.

168 Naebe, M.; Wang, J.; Amini, A.; Khayyam, H.; Hameed, N.; Li, L. H.; Chen, Y.; Fox, B.; Mechanical property and structure of covalent functionalised graphene/epoxy nanocomposites. **Scientific Reports**, v. 4, p. 4375, 2014.

169 Singh, C.; Srivastava, S.; Ali, M. A.; Gupta, T. K.; Sumana, G.; Srivastav, A.; Mathur, R. B.; Malhotra, B. D.; Carboxylated multiwalled carbon nanotubes based biosensor for aflatoxin detection. **Sensors and Actuators B**, v. 185, p. 258-264, 2013.

170 Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C.; Spectrometric Identification of Organic Compounds, 5 ed., John Wiley & Sons: New York, 1991.

171 Dresselhaus, M. S.; Jorio, A.; Saito, R.; Characterizing graphene, graphite, and carbon nanotubes by Raman spectroscopy. **Annual Review of Condensed Matter Physics**, v. 1, p. 89-108, 2010.

172 Ammar, M. R.; Rouzaud, J. N.; Vaudey, C. E.; Toulhoat, N.; Moncoffre, N.; Characterization of graphite implanted with chlorine ions using combined Raman microspectrometry and transmission electron microscopy on thin sections prepared by focused ion beam. **Carbon**, v. 48, p. 1244-1251, 2010.

173 Malarda, L. M.; Pimenta, M. A.; Dresselhaus, G.; Dresselhaus, M. S.; Raman spectroscopy in graphene. **Physics Reports**, v. 473, p. 51-87, 2009.

174 Datsyuk, V.; Kalyva, M.; Papagelis, K.; Parthenios, J.; Tasis, D.; Siokou, A.; Kallitsis, I.; Galiotis, C.; Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes. **Carbon**, v. 46, p. 833-840, 2008.

175 Zhou, Y.; Tang, W.; Wang, J.; Zhang, G.; Chai, S.; Zhang, L.; Liu, T.; Selective determination of dopamine and uric acid using electrochemical sensor based on poly(alizarin yellow R) film-modified electrode. **Analytical Methods**, v. 6, p. 3474-3481, 2014.

176 Mahanthesha, K. R.; Swamy, B. E. K.; Pretreated/carbon paste electrode based voltammetric sensors for the detection of dopamine in presence of ascorbic acid and uric acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 703, p. 1-8, 2013.

177 Gowda, J. I.; Nandibewoor, S. T.; Electrochemical behavior of paclitaxel and its determination at glassy carbon electrode. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, p. 42-49, 2014.

- 178 Ma, Y.; Di, J.; Yan, X.; Zhao, M.; Lu, Z.; Tu, Y.; Direct electrodeposition of gold nanoparticles on indium tin oxide surface and its application. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 1480-1483, 2010.
- 179 Gotti, G.; Fajerweg, K.; Evrard, D.; Gros, P.; Electrodeposited gold nanoparticles on glassy carbon: Correlation between nanoparticles characteristics and oxygen reduction kinetics in neutral media. **Electrochimica Acta**, v. 128, p. 412-419. 2014.
- 180 Dudin, P. V.; Unwin, P. R.; Macpherson, J. V.; Electrochemical nucleation and growth of gold nanoparticles on single-walled carbon nanotubes: New mechanistic insights. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, p. 13241-13248, 2010.
- 181 Kohl, P. A.; Electrodeposition of gold, Modern Electroplating, John Wiley & Sons, Inc. v. 5 p. 115-130, 2011.
- 182 Hezard, T.; Fajerweg, K.; Evrard, D.; Collière, V.; Behra, P.; Gros, P.; Gold nanoparticles electrodeposited on glassy carbon using cyclic voltammetry: Application to Hg(II) trace analysis. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 664, p. 46-52, 2012.
- 183 O'Mullane, A. P.; Ippolito, S. J.; Sabri, Y. M.; Bansal, V.; Bhargava, S. K.; Premonolayer oxidation of nanostructured gold: An important factor influencing electrocatalytic activity. **Langmuir**, v. 25, p. 3845-3852, 2009.
- 184 Pagnanelli, F.; Altimari, P.; Bellagamba, M.; Granata, G.; Moscardini, E.; Schiavi, P. G. L. T.; Pulsed electrodeposition of cobalt nanoparticles on copper: influence of the operating parameters on size distribution and morphology. **Electrochimica Acta**, v. 155, p. 228-235, 2015.
- 185 Yi, S.; Sun, L.; Lenaghan, S. C.; Wang, Y.; Chong, X.; Zhang, Z.; Zhang, M.; One-step synthesis of dendritic gold nanoflowers with high surface-enhanced Raman scattering (SERS) properties. **RSC Advances**, v. 3, p. 10139-10144, 2014.
- 186 Chen, F.; Liu, J.; Chen, H.; Yan, C.; Study on hydrogen evolution reaction at a graphite electrode in the all-vanadium redox flow battery. **International of Journal Electrochemical Science**, v. 7, p. 3750-3764, 2012.
- 187 Bicelli, L. P.; Bozzini, B.; Mele, C.; Urzo, L. D.; A review of nanostructural aspects of metal electrodeposition. **International of Journal Electrochemical Science**, v. 3, p. 356-408, 2008.
- 188 Dudin, P. V.; Unwin, P. R.; Macpherson, J. V.; Electrochemical nucleation and growth of gold nanoparticles on single-walled carbon nanotubes: New mechanistic insights. **Journal of Physics Chemistry C**, v. 114, p. 13241-13248, 2014.
- 189 Liu, Y.; Yu, H.; Quan, X.; Chen, S.; Zhao, H.; Zhang, Y.; Efficient and durable hydrogen evolution electrocatalyst based on nonmetallic nitrogen doped hexagonal carbon. **Scientific reports**, v. 4, p. 6843, 2014.
- 190 Hu, Y.; Jin, J.; Wu, P.; Zhang, H.; Cai, C.; Graphene-gold nanostructure composites fabricated by electrodeposition and their electrocatalytic activity toward the oxygen reduction and glucose oxidation. **Electrochimica Acta**, v. 56. p. 491-500, 2010.

- 191 El-Deab, M. S.; On the preferential crystallographic orientation of Au nanoparticles: effect of electrodeposition time. **Electrochimica Acta**, v. 54, p. 3720-3725, 2009.
- 192 Lai, S. C. S.; Lazenby, R. A.; Kirkman, P. M.; Unwin, P. R.; Nucleation, aggregative growth and detachment of metal nanoparticles during electrodeposition at electrode surfaces. **Chemical Science**, v. 6, p. 1126-1138, 2015.
- 193 Thanh, N. T. K.; Maclean, N.; Mahiddine, S.; Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution. **Chemical Reviews**, v. 114, p. 7610-7630, 2014.
- 194 Elias, J.; Gizowska, M.; Brodard, P.; Widmer, R.; Hazan, Y.; Graule, T.; Michler, J.; Philippe, L.; Electrodeposition of gold thin films with controlled morphologies and their applications in electrocatalysis and SERS. **Nanotechnology**, v. 23, p. 255705-255712, 2012.
- 195 Fan, M.; Ren, B.; Yu, L.; Liu, Q.; Wang, J.; Song, D.; Facile growth of hollow porous NiO microspheres assembled from nanosheet building blocks and their high performance as a supercapacitor electrode. **CrystEngComm**, v. 16, p. 10389-10394, 2014.
- 196 Viga, A.; Berbel, X. M.; Radoi, A.; Cortina-Puig, M.; Marty, J. L.; Characterization of the gold-catalyzed deposition of silver on graphite screen-printed electrodes and their application to the development of impedimetric immunosensors. **Talanta**, v. 80, p. 942-946, 2009.
- 197 Nezhad, G. K.; Hasanzadeh, M. L.; Saghatforoush, N.; Shadjou, S.; Earshadb, B.; Khalilzadeh, **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 141-151, 2009.
- 198 Baranowska, I.; Koper, M.; Electrochemical behavior of propranolol and its major metabolites, 4-hydroxypropranolol and 4-hydroxypropranolol sulfate, on glassy carbon electrode. **Journal Brazilian Chemical Society**; v. 22, p.1601-1609, 2011.
- 199 Oh, J. W.; Yoon, Y. W.; Heo, J.; Yu, J.; Kim, H.; Kim, T. H.; Electrochemical detection of nanomolar dopamine in the presence of neurophysiological concentration of ascorbic acid and uric acid using charge-coated carbon nanotubes via facile and green preparation. **Talanta**, v. 147, p 453-459, 2016.
- 200 The effect of acidity, hydrogen bond catalysis and auxiliary electrode reaction on the oxidation peak current for dopamine, uric acid and tryptophan. **Anal. Methods**, v. 7, p. 2636-2644, 2015.
- 201 Souza, D.; Machado, S. A. S.; Avaca, L. A.; Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teórico. **Química Nova**, v. 26, p. 81-89, 2003.
- 202 Fonseca, W. T.; Santos, R. F.; Alves, J. N.; Ribeiro, S. D.; Takeuchi, R. M.; Santos, A. L.; Assunção, R. M. N.; Filho, G. R.; Muñoz, R. A. A.; Square-wave voltammetry as analytical tool for real-time study of controlled naproxen releasing from cellulose derivative materials. **Electroanalysis**, v. 27, p. 1847-1854, 2015.
- 203 Mirceski, V.; Laborda, E.; Guziejewski, D.; Compton, R. G.; New approach to electrode kinetic measurements in square-wave voltammetry: amplitude-based quasireversible maximum. **Analytical Chemistry**, v. 85, p. 5586-5594, 2013.

- 204 Moccia, M.; Pappat, S.; Erro, R.; Picillo, M.; Vitale, C.; Amboni, M.; Longo, K.; Palladino, R.; Barone, P.; Pellecchia, M. T.; Uric acid relates to dopamine transporter availability in Parkinson's disease. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 131, p. 127-131, 2015.
- 205 Lapsia, V.; Johnson, R. J.; Dass, B.; Shimada, M.; Ejaz, N.; Arif, A.; Elevated uric acid increases the risk for acute kidney injury. **The American Journal of Medicine**, v. 125, p. 302-310, 2012.
- 206 Soundappan, T.; Shen, M. C.; Preparation and characterization of PtAu hybrid film modified electrodes and their use in simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid. **Talanta**, v. 74, p. 212-222, 2007.
- 207 Santos, C. S.; Ferreira, R. T.; Calixto, C. M. F.; Rufino, J. L.; Garcia, J. R.; Fujiwara, S. T.; Wohnrath, K.; Pessoa, C.A.; The influence of organization of LbL films containing a silsesquioxane polymer on the electrochemical response of dopamine. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 44, p. 1047-1058, 2014.
- 208 Khadijeh, G.; Nahid, H.; Simultaneous electrochemical determination of dopamine, uric acid and ascorbic acid using silver nanoparticles deposited on polypyrrole nanofibers. **Journal of Polymer Research**, v. 22, p. 152, 2015.
- 209 Shervedani, R. K.; Bagherzadeh, M.; Mozaffari, S. A.; Determination of dopamine in the presence of high concentration of ascorbic acid by using gold cysteamine self-assembled monolayers as a nanosensor. **Sensors and Actuators B**, v. 115, p.614-621, 2006.
- 210 He, H.; Ali, S. R.; Parajuli, R. R.; Ma, Y.; Balogun, Y.; Interference of ascorbic acid in the sensitive detection of dopamine by a nonoxidative sensing approach. **J Phys Chem B**, v. 111, p.12275–12281, 2007.
- 211 Mocak, J.; Bond, A. M.; Mitchell, S.; Scollary, G. A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: Application to voltammetric and stripping techniques (Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 69, p. 297-328, 1997.
- 212 Siyuan, W.; Wen, Z.; Xia, Z.; Y, C.; Ruo, Y.; Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid using a multi-walled carbon nanotube and reduced graphene oxide hybrid functionalized by PAMAM and Au nanoparticles. **Analytical Methods**, v. 7, p. 1471-1477, 2015.
- 213 Yuanzhen, Z. Weimin, T.; Jing, W.; Guo, Z.; Shouning, C.; Liang, Z.; Ting, L.; Selective determination of dopamine and uric acid using electrochemical sensor based on poly(alizarin yellow R) film-modified electrode. **Analytical Methods**, v. 6, p. 3474-3481, 2014.