

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

CRISTIANE ANDREIA ERDMANN

DESENVOLVIMENTO DE SENSORES BIOELETROQUÍMICOS PARA O
DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS HUMANAS.

PONTA GROSSA
2013

CRISTIANE ANDREIA ERDMANN

DESENVOLVIMENTO DE SENSORES BIOELETROQUÍMICOS PARA O
DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS HUMANAS.

Dissertação apresentada para obtenção
do título de Mestre em Química Aplicada
no Programa de Pós-Graduação em
Química Aplicada da Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Jarem Raul Garcia

Co-Orientador: Prof.^a Dra. Karen Wohnrath

PONTA GROSSA
2013

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

E66 Erdmann, Cristiane Andreia
Desenvolvimento de sensores
bioeletroquímicos para o diagnóstico de
doenças infecciosas humanas/ Cristiane
Andreia Erdmann. Ponta Grossa, 2013.
76f.

Dissertação (Mestrado em Química
Aplicada - Área de Concentração: Química),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientador: Prof. Dr. Jarem Raul
Garcia.
Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Karen
Wohnrath.

1.Imunosensor. 2.Chagas. 3.Técnica LbL.
4.Nanopartículas de Prata. I.Garcia, Jarem
Raul. II. Wohnrath, Karen. III.
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Mestrado em Química Aplicada. IV. T.

CDD: 574.92

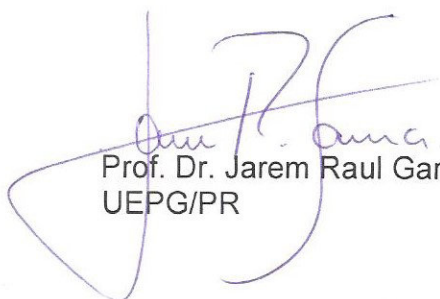
TERMO DE APROVAÇÃO

CRISTIANE ANDREIA ERDMANN

“[DESENVOLVIMENTO DE SENSORES BIOELETROQUÍMICOS PARA O DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS HUMANAS].”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientador:



Prof. Dr. Jarem Raul Garcia
UEPG/PR



Prof. Dr. Sérgio Toshio Fujiwara
UEPG/PR



Prof. Dr. Luiz Henrique Dall'Antonia
UEL/PR

Ponta Grossa, 10 de abril de 2013.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus.

A meu Professor Orientador Dr. Jarem Raul Garcia, por guiar-me na realização deste trabalho, pelo apoio, ensinamentos e confiança demonstrados durante a realização deste projeto.

Ao meu esposo Weidy Silva, meus pais Jorge Augusto Erdmann e Beatriz Inês Erdmann pelo apoio em todos os momentos.

A Prof.^a Dra. Karen Wohnrath e Prof.^a Dra. Christiana Andrade Pessôa, pela amizade e inúmeras contribuições com sugestões e conhecimentos.

Ao Prof. Sérgio Toshio Fujiwara, pelo fornecimento do polieletrólito usado.

Ao Prof. Adriano Viana e Prof.^a Dra. Juliana Inaba pelas contribuições e conhecimentos em relação as etapas bioquímicas do projeto.

Aos colegas de laboratório, Cliciane Guadalupe de Jesus, Bianca Sandrino, Wagner Santos, Cleverson Santos, Rosana Mossanha e Gisele Calaça pelo auxílio, pelos momentos de descontração e amizade.

Ao Grupo de Polímeros do IFSC, pelo apoio durante as medidas de Potencial Zeta e DLS.

À rede NanoBioTecnologia-CAPES e ao INCT/INEO-CNPQ pelo auxílio financeiro para a realização das atividades de pesquisa.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos professores e colegas do mestrado em Química Aplicada.

RESUMO

Neste presente trabalho preparou-se um imunossensor para doença de Chagas. Este sensor foi construído por meio da imobilização do Antígeno (AG) da doença de chagas sob um filme LbL entre o sulfonato de polivinil (PVS) e nanopartículas de prata incorporadas na matriz inorgânica cloreto de 3-n-propilpiridíneo silsesquioxano ($\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-$) usando como transdutor eletroquímico o ITO. As nanopartículas de prata foram sintetizadas via redução química, com o uso de NaBH_4 e AgNO_3 . Medidas de DLS mostraram que a suspensão de $\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-$ era composta por partículas na ordem de 20 nm. Espectros de UV-Vis comprovaram o crescimento das bicamadas por meio da técnica LbL como uso do PVS e da suspensão $\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-$, por meio das bandas em 200 e 260 nm referentes ao SiPy^+Cl^- e uma banda próxima a 400 nm referente a nanopartículas de prata. Este crescimento também foi comprovado por meio da técnica de AFM, que mostrou que o aumento no número de bicamadas leva ao aumento na rugosidade e espessura do filme. Os filmes modificados com O AG forma submetidos à técnica de impedância eletroquímica e mostraram uma mudança de impedância pronunciada quando na presença do anticorpo (AB) da doença de Chagas, indicando que este tipo de filme pode ser utilizado num dispositivo para o diagnóstico da doença de Chagas. Foram feitos testes com diferentes diluições das amostras contaminadas com o AB da doença de Chagas e o imunossensor proposto mostrou-se mais sensível em relação ao teste laboratorial para determinação qualitativa e semi-quantitativa da doença de Chagas (Gold Analisa Diagnóstica Ltda).

Palavras-chaves: Imunossensor, Chagas, Técnica LbL, Nanopartículas de Prata

ABSTRACT

In this work prepared an immunosensor for Chagas disease. This sensor was constructed by immobilizing the antigen (AG) of Chagas disease under an LbL film between the polyvinyl sulfonate (PVS) and silver nanoparticles incorporated in an inorganic matrix, 3-n-propilpiridíneo silsesquioxane chloride($\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-$) using ITO as the electrochemical probe. The silver nanoparticles were synthesized through chemical reduction using NaBH_4 and AgNO_3 . DLS measurements showed that the suspension of $\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-$ consisted of particles on the order of 20 nm. UV-Vis spectra confirmed the growth of bilayers through the LbL technique using PVS and the suspension $\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-$ by means of bands at 200 and 260 nm which is referring to the SiPy^+Cl^- and a band near 400 nm which is referring to the silver nanoparticles. This growth was also demonstrated by AFM technique, which showed that the increase in the number of bilayers leads to an increase in surface roughness and film thickness. The modified films with AG were submitted to the technique electrochemical impedance spectroscopy and showed a pronounced change in impedance in the presence of the antibody (AB) of Chagas disease, indicating that this type of film can be used in a device for the diagnosis of Chagas. Were made tests with different dilutions the samples contaminated with antibody (AB) of Chagas disease and the immunosensor proposed was more sensitive compared to the laboratory test for the qualitative and semi-quantitative of Chagas disease (Gold analyzes Diagnostic Ltd.)

Keywords: Immunosensor, Chagas, LbL Technique, Silver Nanoparticles

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Componentes Básicos de um Imunosensor	20
Figura 2: Um substrato sólido carregado, por exemplo, com cargas negativas, é inicialmente imerso em uma solução catiônica (1). Posteriormente (a) o excesso das moléculas pode ser removido numa solução de lavagem (2), sendo seco posteriormente. O substrato contendo a camada catiônica é imerso (b) na solução com o polieletrólito aniônico (3). As moléculas que não adsorveram são removidas (c) em uma solução de lavagem (4)	23
Figura 3: Síntese de nanopartículas de ouro incorporadas a PAMAM.....	25
Figura 4: Figura idealizada mostrando os grupos cloreto de 3-n-propilpiridínio ligados a um esqueleto de silsesquioxano	26
Figura 5: Ilustração da molécula de Poli (cloreto de dialildimetilamônio).....	27
Figura 6: a) célula eletroanalítica típica para uso em EIS: 1) Eletrodo auxiliar, 2) Eletrodo de referencia, 3) Eletrodo de trabalho: b) diagrama esquemático de um circuito Randles superimposto á interface eletrodo/eletrólito. c) diagrama de Impedância (diagrama de Nyquist) referente ao circuito equivalente apresentado na figura, d) diagrama de Bode correspondente ao diagrama de Nyquist apresentado	35
Figura 7: Esquema da modificação da superfície do eletrodo.....	40
Figura 8: Sobreposição dos espectros de UV-Vis de a) solução de SiPy^+Cl^- 3 mg mL^{-1} , NaBH_4 e AgNO_3 . b) Sobreposição das condições de síntese usando como estabilizante o SiPy^+Cl^- 3 mg mL^{-1}	43
Figura 9: Sobreposição dos espectros de UV-Vis de a) PDDA 4 mg mL^{-1} , NaBH_4 e AgNO_3 . b) Sobreposição das condições de síntese usando como estabilizante o PDDA 4 mg mL^{-1}	44
Figura 10: Espectro de UV-Vis para o filme (a) 20 bicamadas da suspensão de SiPy^+Cl^- e AgNPs com o poliânion PVS, com tempo de imersão de 2 minutos em cada polieletrólito, (b) relação dos picos com o numero de bicamadas, em 260 nm referente ao SiPy^+Cl^- (linha vermelha) e em 418 nm referente ao pico da banda plasmon de nanopartículas de prata (linha preta).....	48

Figura 11: Estudo comparativo do Tempo de imersão e aumento no numero de bicamada entre o PVS e Suspensão de AgNPs em SiPy^+Cl^- , (a) para filmes com 12 bicamadas com tempos de imersão de 1, 2, 3, 5 e 10 minutos e (b) média das medidas absorbâncias dos filmes de 12 bicamadas com variação no tempo de imersão de 1, 2, 3, 5 e 10 minutos	49
Figura 12: Espectro de FTIR do polícatión SiPy^+Cl^- em pastilha de KBr	50
Figura 13: Espectros de FTIR de filmes <i>casting</i> do $\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-$ e PVS, bem como do filme LbL com 30 bicamadas de $(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)$	51
Figura 14: Voltamogramas cíclicos para branco (ITO), filme <i>casting</i> SiPy^+Cl^- sob o ITO e filme <i>casting</i> $\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-$. Figura inserida: Voltamogramas cíclicos para branco (ITO), filme <i>casting</i> SiPy^+Cl^- sob o ITO. Eletrólito de suporte HNO_3 $0,01\text{mol L}^{-1}$, $\nu = 30\text{ mV s}^{-1}$, vs Ag/AgCl	53
Figura 15: Voltamogramas cíclicos do eletrodo com várias camadas $(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ sobre ITO (n = diferentes números de bicamadas), (a) $n=0$, (b) $n=1$, (c) $n=2$, (d) $n=3$, (e) $n=4$, (f) $n=5$, (g) $n=6$, na presença de $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ $0,1\text{mol L}^{-1}$, em tampão PBS pH 6,8, $\nu = 30\text{ mV s}^{-1}$, vs Ag/AgCl	54
Figura 16: Voltamogramas cíclicos para (a) filmes $(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_2$, com as biomoléculas BSA, AG, AB e (b) $(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4$, com as biomoléculas BSA, AG, AB. Eletrólito de suporte PBS pH 6,8 $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ $0,1\text{mol/L}$, $\nu = 30\text{ mV s}^{-1}$, vs Ag/AgCl	56
Figura 17: Espectro de Impedância Eletroquímica para filmes com 2, 4 e 6 bicamadas para os filmes $(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)$	58
Figura 18: Espectro de impedância para os filmes $(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4$, $(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4/\text{AG/BSA}$, $(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4/\text{AG/BSA/AB}$ e $(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4/\text{AG/BSA/TN}$	59
Figura 19: Espectro de Impedância eletroquímica para filmes de $(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4$ com adsorção das biomoléculas e variação do tempo de imersão em (a) 15, 3 e 45 minutos do antígeno e anticorpo, com tempo de imersão na BSA de 5 minutos e (b) tempo de imersão no AG e Ab de 15 minutos e variação no tempo de imersão na BSA de 15 e 30 minutos	61
Figura 20: Espectro de impedância para filmes $(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4$ incubado por 5 minutos no AG, 15 minutos no BSA, 5 minutos no AC ou TN, com tempo de lavagem em PBS pH 6,8 por 5 minutos por 3x	64

Figura 21: Espectros de impedância eletroquímica para filmes (PVS/Ag-SiPy⁺Cl⁻)₄, (a) com AG e sem AgNPs e (b) sem AgNPs e AG.....65

Figura 22: Espectro de impedância eletroquímica para o filme PVS/Ag-SiPy⁺Cl⁻)₄/AG/BSA (sensor) incubado nas diluições 1:5, 1:10, 1:20 e 1:40 das amostras de soro contendo o anticorpo da doença de Chagas e para o teste negativo (TN=amostra de soro sem a presença do anticorpo da doença de Chagas) durante 15 minutos e posteriormente imersos por 5 minutos em tampão PBS pH 6,8 por 3X.....67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição de Tamanho de Partícula de prata para as diferentes concentrações de Ag e NaBH ₄ usadas nas sínteses com os estabilizantes SiPy ⁺ Cl ⁻ e PDDA usados	45
Tabela 2: Espessura dos filmes automontados (PVS/Ag-SiPy ⁺ Cl ⁻) _n obtidos com diferentes números de camadas, 1 μm ² e por 5 μm ²	52
Tabela 3: Parâmetros obtidos a partir dos dados de impedância (Diagramas de Nyquist) dos eletrodos (PVS/Ag-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₄ , (PVS/Ag-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₄ /AG/BSA, (PVS/Ag-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₄ /AG/BSA/AB e (PVS/Ag-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₄ AG/BSA/TN (Figura 18)	59
Tabela 4: Parâmetros obtidos a partir dos dados de impedância (Diagramas de Nyquist) dos diferentes eletrodos da FIGURA 19a.....	61
Tabela 5: Parâmetros obtidos a partir dos dados de impedância (Diagramas de Nyquist) dos diferentes eletrodos da Figura 19b	62
Tabela 6: Parâmetros obtidos a partir dos dados de impedância (Diagramas de Nyquist) dos diferentes eletrodos da Figura 21a	65
Tabela 7: Parâmetros obtidos a partir dos dados de impedância (Diagramas de Nyquist) dos diferentes eletrodos da Figura 21b	66

LISTA DE SIGLAS

ΔE	- diferença de potencial
A	- absorbância
AB	- anticorpo
AFM	- microscopia de força atômica
AG	- antígeno
AgNPs	- nanopartículas de prata
Ag-SiPy⁺Cl⁻	- suspensão do híbrido de nanopartículas de prata com o 3-n-propilpiridínio silsesquioxano
b	- caminho óptico
BSA	- albumina de soro bovino
c	- concentração
DLS	- <i>dynamic light scattering</i>
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
Epa	- potenciais de oxidação
Epc	- potenciais de redução
EQM	- eletrodo quimicamente modificado
FTIR	- <i>Fourier Transform Infrared Spectrophotometer</i>
FTO	- óxido de estanho dopado com flúor
GA	- glutaraldeído
HRP	- <i>enzyme horseradish peroxidase</i>
Ipa	- correntes de pico anódica
Ipc	- correntes de pico catódica.
ITO	- óxido de estanho dopado com índio
K_A	- constante de Afinidade
LB	- Langmuir-Blodgett
LbL	- <i>Layer by Layer</i>

n	- número de bicamadas
NPs	- nanopartículas
OMS	- organização mundial da saúde
PAMAM	- poliamidoamina
PBS	- <i>phosphate buffered saline</i>
PDDA	- poli (cloreto de dialildimetilamônio)
PVS/Ag-SiPy⁺Cl⁻	- filme LbL com o polieletrólito PVS e a suspensão do híbrido de nanopartículas de prata com o 3-n-propilpiridínio silsesquioxano
R_w	- Resistência
SBZA	- 4-(metilmercapto)-benzaldeído
SiPy⁺Cl⁻	- 3-n-propilpiridínio silsesquioxano
<i>T. cruzi</i>	- <i>Trypanossoma cruzi</i>
TN	- teste negativo
<i>v</i>	- velocidade de varredura
VC	- voltametria cíclica
α	- coeficiente de carga
ϵ	- coeficiente de extinção molar
R	- coeficiente de correlação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 APRESENTAÇÃO	14
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.2.1 Doenças Parasitárias	15
1.2.2 Sensores Eletroquímicos	17
1.2.3 Biossensores	19
1.2.4 Filmes Automontados	21
1.2.5 Técnica <i>Layer by Layer</i>	22
1.2.6 Nanocompósito de Nanopartículas	24
1.2.7 Imunosensores para diagnóstico da doença de Chagas	27
1.3 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DE FILMES FINOS	29
1.3.1 Espectroscopia de Absorção na Região do UV-Vis	29
1.3.2 Caracterização espectroscópica por FTIR (<i>Fourier Transform Infrared Spectrophotometer</i>)	30
1.3.3 Caracterização Morfológica por Microscopia de Força Atômica	30
1.4 MÉTODO DE POTENCIAL ZETA E DLS	31
1.5 MÉTODOS ELETROQUÍMICOS	32
1.5.1 Voltametia Cíclica (VC)	32
1.5.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica	34
2.0 OBJETIVOS	36
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3.0 PARTE EXPERIMENTAL	37
3.1 REAGENTES UTILIZADOS	37
3.2 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA	37
3.3 MEDIDAS DE POTENCIAL ZETA E DLS	37
3.4 CONSTRUÇÃO DE FILMES FINOS PELA TÉCNICA LbL	38
3.5 ADSORÇÃO DO ANTÍGENO E ANTICORPO SOBRE OS FILMES FINOS	38
3.6 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA NA REGIÃO DO UV-Vis	40
3.7 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA NA REGIÃO DO FTIR	41
3.8 ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS FILMES POR AFM	41

3.9 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS	41
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA	42
4.2 ESTUDO CINÉTICO: CRESCIMENTO DE FILMES LbL	47
4.3 CARACTERIZAÇÃO DO SiPy^+Cl^- POR FTIR	50
4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES POR FTIR	51
4.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA POR AFM	52
4.6 CARACTERIZAÇÃO VOLTAMÉTRICA	53
4.6.1 Nanopartículas de prata	53
4.6.2 Caracterização dos filmes LbL	54
4.6.3 Interação com AG com AB	55
4.7 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA	57
4.7.1 Variação no número de bicamadas	57
4.7.2 Interação entre antígeno e anticorpo.....	58
4.7.3 Estudo do tempo de imersão no antígeno, BSA e anticorpo	60
4.7.4 Efeito da presença das nanopartículas de prata e do antígeno nas respostas do filme	64
4.7.5 Estudo de Diluição das amostras de soro contendo anticorpo.....	66
5.0 CONCLUSÕES	68
6.0 PERSPECTIVAS FUTURAS	69
7.0 REFERÊNCIAS.....	70

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 APRESENTAÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) mais de um bilhão de pessoas estão infectadas com uma ou mais doenças parasitárias endêmicas, o que representa um sexto da população mundial, algumas dessas doenças são conhecidas como negligenciadas. Essas doenças não só prevalecem em condições de grande pobreza, mas também proporcionam a conservação no quadro de desigualdade social. Um dos motivos do alto índice de incidência e óbitos provocados pelas doenças negligenciadas é a falta de ferramentas adequadas para seu diagnóstico e tratamento.¹

Um diagnóstico correto para doenças infecciosas humanas é indispensável para orientar ações corretas em relação ao tratamento dos pacientes tanto em epidemias de uma ou mais doenças ou em casos isolados. Para que se tornem bem sucedidos os métodos de diagnóstico devem apresentar baixo custo, serem de fácil uso e de preferência apresentar portabilidade. Sendo assim uma nova forma de abordagem para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico dessas doenças faz-se necessário, a fim de atender a essas necessidades.

Os biossensores apresentam-se como uma ferramenta promissora na detecção de doenças negligenciadas. Biossensores são dispositivos que fornecem informações quanto à composição ao meio em que operam, transformando uma informação química em um sinal analítico. Podem ser constituído por um reconhecedor sendo um componente biológico ativo, que pode ser uma enzima, DNA, antígeno, anticorpo, proteína, entre outros. Isso fornece aos biossensores características como alta seletividade com relação a um determinado analito.

Uma das técnicas de obtenção destes dispositivos é a formação de filmes sobre a superfície de eletrodos pela técnica de automontagem por camadas alternadas conhecida como LbL, do inglês *Layer-by-Layer*.

Neste trabalho foi preparado um eletrodo modificado, por meio da técnica LbL, capaz de detectar doenças negligenciadas tal como a Doença de Chagas.

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1 Doenças Parasitárias.

Cerca de três mil pessoas morrem a cada dia vítimas de doenças parasitárias, sendo mais de 1 milhão de mortes ao ano.² Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2010) mais de um bilhão de pessoas estão infectadas com uma ou mais doenças negligenciadas, o que representa um sexto da população mundial. Essas doenças não só prevalecem em condições de grande pobreza, mas também proporcionam a conservação no quadro de desigualdade social.¹

As características comuns das doenças negligenciadas são a elevada endemicidade em áreas rurais, urbanas menos favorecidas de países em desenvolvimento e também a falta de incentivo em pesquisas para o desenvolvimento de novas formas de diagnóstico e tratamento. Essas doenças podem prejudicar o crescimento infantil, o desenvolvimento intelectual e a produtividade do trabalho. Sendo assim não apresentam atrativos econômicos para o desenvolvimento de fármacos, por sua baixa prevalência em países desenvolvidos e por atingir população em região de baixo nível de desenvolvimento.³

Nos últimos 30 anos inúmeros avanços médicos nos países desenvolvidos proporcionaram um ganho substancial na expectativa de vida, porém doenças tropicais, que muitas vezes são fatais e que podem ser prevenidas, tratadas e curadas continuam a assolar comunidades pobres nos países em desenvolvimento, devido em grande parte às falhas nas políticas públicas desses países e pouco investimento neste tipo de mercado.

Estas doenças são um problema global de saúde pública por motivos como: a orientação industrial estar direcionada ao lucro, focalizando sua produção e pesquisa em medicamentos que podem ser comercializados de forma lucrativa, os pacientes atingidos com essas doenças possuem baixo poder aquisitivo, pouco apoio e influência política para pesquisas na área e devido aos medicamentos que são destinados ao tratamento de doenças negligenciadas não geram o retorno financeiro esperado pela maior parte das empresas, dificultando assim o desenvolvimento das pesquisas nessa área.

A doença de Chagas é uma doença parasitária endêmica crônica que ocorre em maior parte na América Latina. Pelos altos índices de prevalência e morbidade ela é considerada um dos maiores problemas de saúde pública em toda América Latina. De acordo com a OMS estima-se que 16 milhões de pessoas estão infectadas e que cerca de 100 milhões de indivíduos, vivendo em áreas endêmicas, possuem altos riscos de contaminar-se com a doença⁴. Pode ser considerada como uma infecção causada por um protozoário chamado de *T. cruzi* (*Trypanossoma cruzi*). Historicamente a transmissão vetorial tem sido identificada como a principal causa da transmissão da doença de Chagas no Brasil. Quando ocorre esse tipo de transmissão, após picar o indivíduo, o popularmente conhecido como barbeiro, (da família dos Reduviídeos, pertencentes aos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*), deposita sobre a pele fezes infectadas com o *T. cruzi*, que podem entrar em contato com a corrente sanguínea, contaminando assim o paciente. Os sintomas podem ser febre prolongada, cefaleia, edema de face ou membros, manchas na pele, aumento do fígado ou baço, cardiopatia aguda, dentre outros.⁵ A confirmação da doença é atualmente feita por exame parasitológico e sorológico, conforme orientação médica.

A doença de Chagas e outras doenças afetam as populações mais empobrecidas nos países menos desenvolvidos, o interesse das indústrias farmacêuticas é pequeno, por não apresentar-se como um mercado lucrativo.⁵ Devido a estes motivos algumas doenças como a malária, leishmaniose visceral, esquistossomose, doença de Chagas e doença do sono são chamadas de doenças negligenciadas.

Um dos motivos do alto índice de incidência e óbitos provocados pelas doenças negligenciadas é a falta de ferramentas adequadas para o diagnóstico e tratamento. Portanto um diagnóstico rápido e preciso é fundamental para o controle e tratamento dessas doenças, manifestando-se unicamente em um paciente como também em casos onde há epidemias de uma ou mais doenças em vários indivíduos.⁴

A infraestrutura médica e os sistemas de serviço referentes à saúde pública nos países desenvolvidos apresentam de uma forma geral, recursos alinhados para a detecção e prevenção de doenças negligenciadas. Dispõem de grandes

instalações laboratoriais capazes de realizar testes em milhares de amostras de pacientes por dia. Já nos países em desenvolvimento os pacientes, em sua maioria, contam apenas com o atendimento em postos de saúde pequenos e com infraestrutura ultrapassada e inadequada para a maioria dos casos de emergência.

Sendo assim a maioria das tecnologias tradicionalmente empregadas para o diagnóstico dessas doenças em países em desenvolvimento falha, pois são sistemas de diagnóstico dispendiosos, complexos e que necessitam de uma grande infraestrutura física para sua implementação e pessoal treinado para sua realização. Para que se tornem bem sucedidos os métodos de diagnóstico devem apresentar baixo custo, serem de fácil uso e de preferência apresentar portabilidade. Sendo assim uma nova forma de abordagem para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico dessas doenças faz-se necessário, a fim de atender a essas necessidades.

Uma das alternativas mais promissoras no que se refere ao desenvolvimento de tecnologias para a aplicação clínica em diagnóstico e monitoramento de doenças infecciosas humanas está relacionada com a preparação e uso sensores eletroquímicos mais especificamente no uso de biossensores.⁶

1.2.2 Sensores Eletroquímicos.

Na medicina há a necessidade de detectar determinadas substâncias em amostras complexas e em baixas concentrações, uma das ferramentas poderosas para essas análises são as técnicas eletroquímicas, pois apresentam vantagens como elevada sensibilidade, seletividade, baixo custo e portabilidade.⁷

O desenvolvimento de sensores eletroquímicos tem se apresentado de forma mais evidente nos últimos anos, devido à crescente necessidade de testes analíticos simples, rápidos e baratos para a determinação de importantes compostos químicos e biológicos em concentrações muito baixas. Os principais sensores eletroquímicos podem ser classificados como: potenciométricos, amperométricos e condutimétricos.⁸

Os sensores potenciométricos baseiam-se na diferença de potencial entre dois eletrodos em condições onde a corrente elétrica mantém-se constante;

enquanto que nos sensores condutimétricos as mudanças são observadas nas medidas de condutância, resultante de produtos de uma reação catalítica. Os sensores amperométricos são baseados na medida de corrente elétrica, resultante de alterações de oxidação ou redução de espécies eletroativas.⁹ Estes apresentam fácil manipulação e também uma relação proporcional entre concentração do analito e alteração na corrente elétrica. Durante as análises, o potencial é mantido constante e as alterações de corrente verificadas são correlacionadas diretamente com a concentração das espécies eletroativas presentes, com a sua produção ou com a taxa de consumo na camada biocatalítica.^{9,10,11,12}

Em anos anteriores os atributos requeridos em experimentos eletroquímicos usando eletrodos eram a boa condutividade, estabilidade química e larga faixa de potencial de trabalho. Desde então, essas premissas passaram a ter um significado menos importante uma vez que, para determinados sistemas químicos, percebeu-se a necessidade do trabalho com superfícies seletivamente reativas, as quais proporcionavam resultados favoráveis em razão da melhoria da atividade química, surgindo assim os eletrodos quimicamente modificados.⁸

Eletrodo quimicamente modificado (EQM) é um termo que indica eletrodos com espécies quimicamente ativas imobilizadas em sua superfície. Várias vantagens surgem com a modificação da superfície de um eletrodo como a maior seletividade, sensibilidade, estabilidade do eletrodo, aumento na reatividade, eletrocatalise, entre outros, possibilitando o desenvolvimento de diversos eletrodos para inúmeras aplicações.^{8,13,14}

Os primeiros trabalhos que envolviam a modificação na superfície de eletrodos surgiram no início da década de 70, sendo que até esta data usava-se somente eletrodos que eram considerados “inertes” como ouro, platina, mercúrio e carbono.⁸ Entre os diversos materiais que hoje são usados em eletrodos quimicamente modificados podemos citar o ouro, platina, carbono vítreo, mercúrio na forma de filme, fibras de carbono, pasta de carbono, carbono vítreo reticulado, plástico condutor, vidros condutores como o ITO e FTO (óxidos de estanho dopado com índio e flúor, respectivamente).¹⁵

A forma mais comum de modificar a superfície de um eletrodo tem sido o uso de modificadores sobre a superfície do eletrodo, dentre os modificadores mais

usados podemos citar nanopartículas metálicas, substâncias orgânicas, materiais inorgânicos, materiais compósitos, mediadores redox, biomoléculas, filmes poliméricos, nanotubos de carbono.¹⁵ De forma geral as técnicas mais utilizadas para se modificar a superfície de um eletrodo é a imobilização por adsorção, adsorção irreversível direta, ligação covalente a sítios específicos da superfície do eletrodo, recobrimento com filmes poliméricos ou ainda a preparação de eletrodos á base de pasta de carbono.¹⁵

1.2.3 Biossensores.

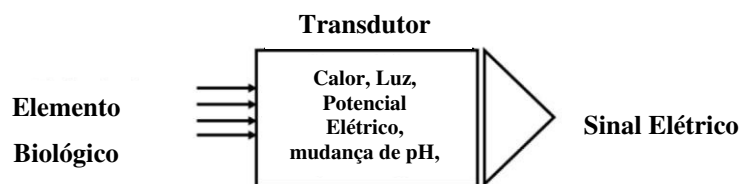
Biossensores são dispositivos que possuem imobilizados em transdutores adequados materiais de origem biológica tais como enzimas, tecido animal ou vegetal, antígenos ou anticorpos, ácidos nucleicos, entre outros.¹² Estes dispositivos convertem uma resposta biológica em um sinal mensurável, ou seja, fornecem informações quanto á composição ao meio em que operam, transformando uma informação química ou física em um sinal analítico. São compostos basicamente de dois componentes, um elemento biológico e um elemento transdutor.¹⁶ O elemento biológico pode ser um tecido, células vivas, enzimas, anticorpo (AB) ou antígeno (AG), ácido nucleico, proteína, organelas, micro-organismos, entre outros. A escolha por determinada biomolécula depende da especificidade dos componentes biológicos para determinado analito, tornando determinada biomolécula atraente para compor o biossensor.^{12,16,17} Assim uma das características dos biossensores, é a sua alta seletividade com relação a um determinado analito.⁸

A espécie de transdutor usado determina a resposta obtida, portanto os biossensores podem ser classificados de acordo com o transdutor, como por exemplo, eletroquímicos (potenciométricos, amperométrico e condutimétrico), óptico (quando a medida que se faz é de luminescência, fluorescência, etc.) detector de massa (relaciona a oscilação da frequência dos cristais piezelétricos com a variação da massa).^{6,16}

A construção de um biossensores baseia-se na comunicação de duas partes: o componente biológico ativo (o reconhecedor) e um transdutor, como ilustra a Figura 1. A primeira faz o reconhecimento de uma determinada substância por meio

de uma reação bioquímica específica, gerando uma variação na concentração de prótons, a liberação de gases, a emissão ou a absorção de luz, a emissão de calor, uma variação de massa, uma mudança no estado de oxidação do analito, etc; e a segunda, converte a energia destes eventos numa forma mensurável, como uma variação de corrente, potencial, temperatura e outros.¹¹

Figura 1- Componentes básicos de um Biossensor



Fonte: Biosensors, Bioelectronics, v. 19, p. 285–293, 2011

Assim como nos EQM vários métodos podem ser utilizados para imobilizar biomoléculas no transdutor, dentre eles os mais utilizados são os que envolvem processos de adsorção, ligação covalente, ligação cruzada, filmes poliméricos, formação de materiais compósitos.^{8,15,14}

Quando se trata de um biossensor em que a resposta bioquímica está baseada em uma reação imunológica entre um antígeno e um anticorpo este é classificado como imunossensor.^{12,15}

Em um imunoensaio, um anticorpo combina-se com seu correspondente antígeno, formando assim um imunocomplexo, conforme a Equação 1, que é caracterizada pela constante de afinidade, K_A , definida pelas concentrações do imunocomplexo (AG, AB), do antígeno livre (AG) e dos sítios livres dos anticorpos (AB) no equilíbrio, de acordo com a Equação 2.¹²



$$K_A = \frac{[ABAG]}{[AB][AG]} \quad (2)$$

A formação do imunocomplexo pode ser monitorada, sob o ponto de vista analítico, por dois métodos, o método direto ou o indireto (com o uso de

marcadores). No método indireto tanto o AG ou o AB podem ser marcados com moléculas chamadas de marcadoras. As moléculas marcadoras hoje usadas são compostos fluorescentes ou enzimas. As enzimas por sua vez tem sido usadas amplamente em imunossensores amperométricos.^{12,18}

1.2.4 Filmes Automontados.

A fabricação de filmes finos tem atraído grande atenção devido à necessidade de se obter estruturas com alta organização, com controle de espessura, propriedades em escala molecular e emprego de diversos materiais, solúveis ou insolúveis em meio aquoso. As pesquisas envolvendo filmes finos englobam profissionais nas mais diversas áreas, como química, física, biologia, engenharia de materiais, o que tem promovido ainda mais o seu desenvolvimento.

O termo **filme** refere-se à matéria condensada restrita a duas dimensões (no caso de filmes finos), disposta em camadas inserida em uma superfície, os filmes podem ser classificados de acordo com seu tamanho, nanométricos, micrométricos e milimétricos.¹⁹ O substrato é considerado como a superfície que suporta fisicamente o filme, fornecendo um adequado suporte mecânico sem influenciar ou interferir nas características do filme sobre ele depositado. Há muitos tipos diferentes de substratos usados com diferentes finalidades, dentre os mais utilizados encontram-se os vidros modificados, metais, cerâmicas e óxidos metálicos, tais como FTO e ITO, materiais de carbono, entre outros.¹¹

O processo de crescimento de filmes foi inicialmente descrito por Iler colaboradores onde a adsorção de partículas coloidais de cargas alternadas foi realizada.²⁰

Nos últimos anos inúmeras técnicas têm sido empregadas com o fim de obter filmes ultrafinos, dentre elas pode-se destacar a técnica Langmuir-Blodgett (LB), a técnica de automontagem camada por camada do inglês *Layer-by-layer* (LbL), *casting*, *spin coating*, *dip coating*, entre outras. As técnicas LbL e LB se destacam pois permitem organizar as moléculas individualmente em estruturas alternadas com alto controle de espessura mantendo-se na ordem de nanômetros.^{21,22} Além do mais técnica LbL apresenta grande simplicidade experimental e baixo custo.²³

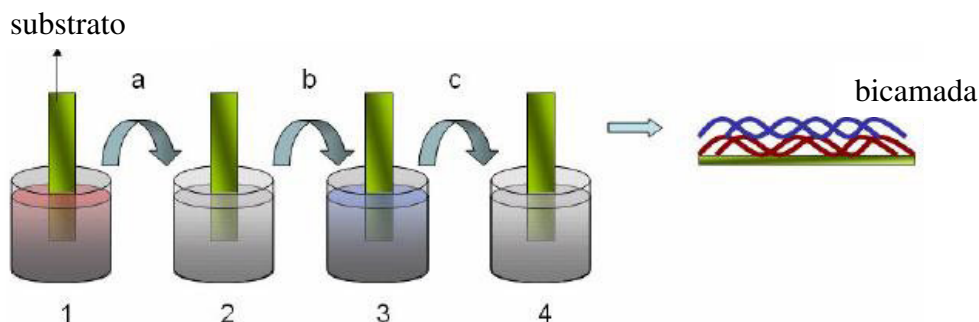
1.2.5 Técnica Layer-by-Layer

A técnica LbL tornou-se uma das principais escolhas para a construção de filmes nanoestruturados pois a sinergia entre materiais distintos pode ser alcançada de forma simples e com baixo custo. Com esta técnica uma ampla gama de materiais podem ser empregados e também seu procedimento é realizado sob brandas condições, o que é particularmente importante para preservação das biomoléculas, no caso de imunossensores.²⁴

Esta técnica foi baseada em dois trabalhos iniciais. Primeiramente Iller colaboradores com a idéia de adsorção alternada usando partículas coloidais com cargas alternadas, posteriormente Savig e colaboradores aplicaram o termo *self-assembly* para a construção de sistemas que se baseavam em interações químicas entre multicamadas (geralmente covalentes), porém este processo requeria a funcionalização de algumas moléculas a serem utilizadas na construção das camadas, o que é considerado algo limitante na técnica. Decher e colaboradores propuseram um novo método para construção de filmes automontados que superava tais limitações onde se empregava materiais com cargas opostas na construção dos filmes, ou seja, entre as camadas a interação que ocorria era física. Desta forma pode-se adsorver alternadamente espécies aniônicas e catiônicas sobre substratos sólidos.^{23,25}

Na maioria dos casos a interação predominante na técnica LbL é a interação eletrostática. A Figura 2 ilustra esquematicamente o mecanismo de formação de bicamadas através da técnica LbL. No que diz respeito ao substrato usado esta é uma técnica muito versátil permitindo a utilização de materiais como vidros hidrofílicos e hidrofóbicos, mica, silício, polímeros entre outros.^{20,21}

Figura 2- Um substrato sólido carregado, por exemplo, com cargas negativas, é inicialmente imerso em uma solução catiônica (1). Posteriormente (a) o excesso das moléculas pode ser removido numa solução de lavagem (2), sendo seco posteriormente. O substrato contendo a camada catiônica é imerso (b) na solução com o polieletrólito aniônico (3). As moléculas que não adsorveram são removidas (c) em uma solução de lavagem (4).²⁴



Fonte: *Electrochemistry Science*, v. 1, p.194-214, 2006.

Inúmeros materiais podem ser usados na construção de filmes LbL, entre eles, polímeros sintéticos, nanopartículas, biomoléculas como ácidos nucleicos, proteínas entre outros. Assim esta técnica apresenta uma vasta gama de aplicações em diversos tipos de dispositivos.

Os filmes LbL podem receber quatro classificações de acordo com o mecanismo de adsorção que ocorre na formação dos filmes; filmes automontados via interações eletrostáticas a partir de polieletrólitos altamente carregados, filmes automontados via interações eletrostáticas a partir de polieletrólitos parcialmente carregados, via interações secundárias e via interações específicas.²¹

a) Filmes automontados via interações eletrostáticas a partir de polieletrólitos altamente carregados.

A interação que governa este tipo de mecanismo de adsorção de filmes é a iônica (eletrostática) obtendo assim camadas altamente estáveis. Neste caso o mecanismo de adsorção é limitado, pois se encerra quando o equilíbrio entre as forças resultantes da interação eletrostática entre a camada que é depositada e a nova camada que é adsorvida é alcançado. Estes filmes apresentam formação de camadas muito finas, na ordem de 1 nm de espessura, pois existe uma grande repulsão entre as cargas do mesmo polieletrólito presentes nos materiais. A

formação de multicamadas ocorre devido a forte compensação de cargas quando uma camada de polieletrólito é depositada sobre outra de sinal contrário.²¹

b) Filmes Automontados contendo polieletrólitos parcialmente carregados.

Neste caso a interação que ocorre durante a adsorção também é iônica, porém a utilização de polieletrólitos fracos faz com que a espessura das camadas varie. Essa variação ocorre porque o número de cargas ao longo das macromoléculas pode variar quando o pH das soluções de polieletrólitos fracos é ajustado.²¹

c) Filmes Automontados adsorvidos via interações secundárias

Neste tipo de mecanismo outras interações podem ocorrer na formação do filme além das interações iônicas, mas também podem ocorrer inteiramente através de interações de hidrogênio, interação de Van der Waals ou hidrofóbicas.²⁶

d) Filmes Automontados adsorvidos via interações específicas

O mecanismo que governa a adsorção das bicamadas neste tipo de filme é muito distinta dos demais mecanismos, pode ocorrer pela funcionalização de substâncias permitindo a adsorção alternada e o crescimento das multicamadas.²³

Os filmes automontados podem ser aplicados em muitas áreas como a nanotecnologia, diodos emissores de luz, óptica eletrônica, eletrocatalise, sensores analíticos, biossensores.^{14,21}

1.2.6 Nanocompósito de Nanopartículas

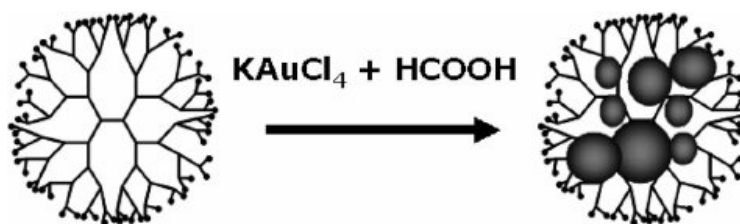
Dentre as novas estratégias para a produção de biossensores está o uso de nanopartículas (NPs), pois apresentam excelente biocompatibilidade entre as nanopartículas e biomoléculas, tais como antígenos e anticorpos^{27,28}, e área superficial elevada. Sabe-se que nanopartículas de ouro, por exemplo, apresentam boa compatibilidade com biomoléculas sendo, portanto amplamente usadas nos campos de imunoensaios para reter a bioatividade entre o anticorpo imobilizado e melhorando a cinética de transferência eletrônica.²⁹

Quando em escala nano, as partículas apresentam propriedades físico-químicas diferentes dos materiais que encontram-se em proporções maiores como os efeitos causados pelo aumento da área superficial, especialmente em catálises

heterogêneas e sensores, já os efeitos referentes ao tamanho podem ser observados por meio de medidas de propriedades mecânicas, ópticas, elétricas, magnéticas, etc.³⁰

Dentre os métodos químicos para obtenção de nanopartículas pode-se citar os que estão baseados em reações realizadas em solução, levando à formação de colóides (sóis), onde as NPs ficam dispersas ou imobilizadas em um solvente adequado. Uma das formas de se obter essa suspensão de nanopartículas é por meio de um sal metálico, que neste caso é o provedor das nanopartículas, um agente redutor e um “solvente” capaz de imobilizar as nanopartículas. Como exemplo pode-se citar a síntese de nanopartículas de ouro incorporadas ao dendrímero poliamidoamina (PAMAM), que utiliza o ácido fórmico para converter os íons áuricos presentes no sal em nanopartículas metálicas de ouro³¹, como ilustra a Figura 3.

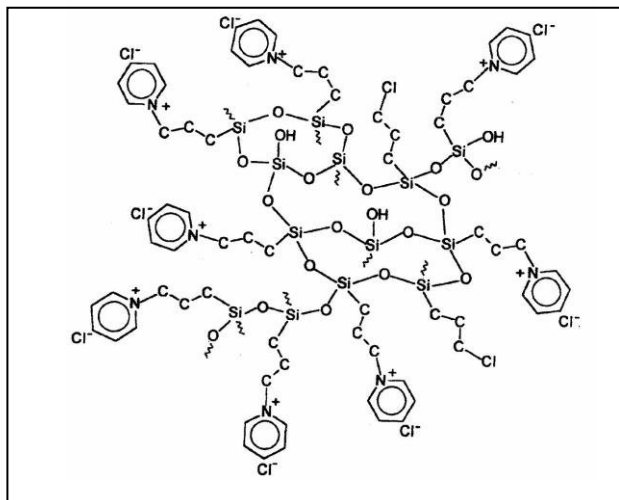
FIGURA 3: Síntese de nanopartículas de ouro incorporadas a PAMAM ³¹



FONTE: Electroanalysis, v. 9, p. 805-812, 2007

Um dos materiais que pode ser tanto empregado na construção de filme LbL como também servir para estabilização de nanopartículas metálicas é o polímero cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano, SiPy^+Cl^- , cuja estrutura está ilustrado na Figura 4.

FIGURA 4: Figura idealizada mostrando os grupos cloreto de 3-n-propilpiridínio ligados a um esqueleto de silsesquioxano.³² Patente: BR9803053-A



FONTE: Sens. Actuators B, v.66, p.125, 2000.

Quando imobilizadas no SiPy⁺Cl⁻, as nanopartículas metálicas podem interagir com o SiPy⁺Cl⁻ de forma que o mesmo passa a comportar-se como uma gaiola, favorecendo a estabilização das nanopartículas em suspensão.³³

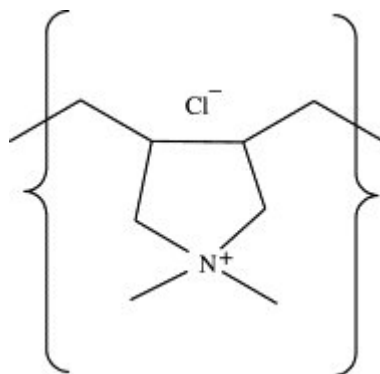
Este polieletrólito apresenta alta capacidade de troca iônica, solubilidade em água e capacidade de formação de filmes.^{33,34,35} Foi primeiramente sintetizado pelo Laboratório de Química de Superfícies do instituto de Química da UNICAMP.³⁶ Este polímero apresenta o íon cátion piridínio fixo a estrutura de um polímero do tipo silsesquioxano, e tem sido amplamente utilizado na produção de sensores eletroquímicos pela imobilização de espécies iônicas.

Um sensor eletroquímico foi construído por Fujiwara e colaboradores (2002)³⁵ a base de ftalocianina tetrassulfonada de cobre juntamente com o polieletrólito SiPy⁺Cl⁻ sob uma matriz polimérica de SiO₂/Al₂O₃, para a determinação de ácido ascórbico.³⁷ Muxel e colaboradores (2008)³⁸ também usaram o SiPy⁺Cl⁻ na preparação de um eletrodo modificado. O eletrodo era formado por um bastão de grafite recoberto pelo polímero com o intuito de determinar a presença de Cr(VI) em amostras de águas residuárias de indústrias de galvanoplastia e de couro, este eletrodo apresentou limite de detecção de $2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (0,15 ppm).

Estes e muitos outros trabalhos demonstram que o emprego do polímero SiPy^+Cl^- , puro ou com outras substâncias como nanopartículas, na construção de filmes pode ser uma potencial ferramenta para a obtenção de sensores eletroquímicos.

Outro polímero que pode ser utilizado na estabilização de nanopartículas é o Poli (cloreto de dialildimetilamônio) (PDDA), ilustrado na Figura 5, que é um polieletrólito catiônico amplamente utilizado tanto em aplicações industriais e como um polímero carregado na construção de filmes entre outros.³⁹ É um polímero solúvel em água e que possui a capacidade de gerar e/ou estabilizar colóides metálicos, como o ouro, a partir de um precursor específico. Na formação de nanopartículas, por meio de uma redução química, o PDDA pode agir tanto na redução como na estabilização de nanopartículas metálicas (NPs).⁴⁰

FIGURA 5: Ilustração da molécula de Poli (cloreto de dialildimetilamônio)⁴⁰



FONTE: Polymer, v. 47, p. 763–766, 2006

1.2.7 Imunosensores para diagnóstico da doença de Chagas.

Imunosensores podem ser definidos como dispositivos analíticos capazes de detectar a ligação de um anticorpo ao seu antígeno específico por meio de uma reação imunoquímica na superfície de um dispositivo como um transdutor.^{41,42} Muitos imunosensores fazem uso de nanopartículas metálicas como o sensor amperométrico desenvolvido para a detecção de antígeno carcinoembrionário, usando a técnica LBL, nanopartículas de ouro e nanotubos de

carbono.²⁹ A literatura traz alguns trabalhos onde o foco é o diagnóstico da doença de Chagas usando as mais diversas técnicas de análise.

Ferreira et. al. (2005) desenvolveram um imunossensor amperométrico para a detecção da doença de Chagas. Para isso usaram proteínas antigênicas da doença imobilizadas em um eletrodo de ouro, tratado com cisteína e glutaraldeído, além do uso de um antígeno marcado com HRP (*enzyme horseradish peroxidase*). Os anticorpos presentes no soro de pacientes contaminados com a doença de Chagas foram capturados pelos antígenos imobilizados e a interação entre esses antígenos e os anticorpos da doença foi monitorizada por cronoamperometria a um potencial de -400 mV (vs Ag/AgCl).⁴³

Foguel e colaboradores (2011)⁴² descrevem o desenvolvimento de um imunossensor amperométrico para determinação da doença de Chagas por meio de um eletrodo de ouro obtido a partir de um disco compacto gravável modificado com 4-metilmercapto-benzaldeído para a imobilização da proteína Tc85 de *T. Cruzi*. Os imunoensaios foram efetuados utilizando soros positivos e negativos de anticorpos da doença de Chagas e soros com imunoglobulina conjugado com a enzima peroxidase. O imunossensor foi aplicado em amostras de soro.⁴² Depois de devidamente tratada a superfície do eletrodo de ouro proveniente dos CD-R foram incubados em uma solução de etanol contendo 4-(metilmercapto)-benzalaldeído (SBZA). O eletrodo foi novamente incubado em uma solução contendo proteínas antigênicas da doença. Este trabalho usou anticorpos marcados com HRP. A aplicação do imunossensor em soros positivos e negativos para doença de Chagas foram realizadas usando a técnica de cronoamperometria, num potencial - 0,400 V em 0,1 mol L⁻¹ solução de tampão fosfato a PH 6,8,0, contendo o substrato e mediador.⁴⁴

Outro trabalho relata o desenvolvimento de um imunossensor amperométrico para o diagnóstico da doença de Chagas utilizando uma glicoproteína específica que pertence à família Tc85-11 da proteína de *T. Cruzi*. Uma superfície de ouro *screen-printed* foi funcionalizada com cistamina e depois ativada com glutaraldeído (GA), que foi usado para formar ligações covalentes com o antígeno recombinante purificado (Tc85-11). O antígeno reage com o anticorpo a partir do soro, e a reação foi monitorizada por afinidade, utilizando a microscopia de força atômica ou

amperômetria através de um anticorpo secundário marcado com HRP. As imagens da superfície permitiram diferenciar as etapas de modificação e de interação antígeno-anticorpo distinguindo assim as reações de afinidade. O imunossensor foi aplicado a soros de pacientes chagásicos e pacientes com diferentes doenças sistêmicas.⁴⁵

1.3 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DE FILMES FINOS

1.3.1 Espectroscopia de Absorção na Região do UV-Vis.

A espectroscopia de absorção na região do UV-Vis compreende a faixa 200 a 760 nm. O espectro de UV-Vis é dado pela irradiação da luz UV e/ou visível em determinado comprimento de onda através em determinada amostra, ao passar por ela, provoca excitação dos elétrons para um nível de maior energia, o espectrofotômetro mede quanto dessa energia foi absorvida pela amostra e a referencia no comprimento de onda específico da absorção, ou seja a amostra é inserida no caminho óptico do aparelho, então a luz UV e/ou visível passa pela amostra e o aparelho mede quanto de luz foi absorvida pela amostra.⁴⁶

No caso de filmes finos a técnica pode ser usada para confirmar a presença de espécies de interesse e/ou monitorar o crescimento das camadas.³⁷ Quando se trata de um filme com muitas camadas pode-se observar o crescimento das mesmas, ou seja, a cada camada depositada percebe-se um aumento na absorbância das bandas características ao material usado, obedecendo assim a lei de Beer que diz que a absorbância é proporcional a concentração da amostra:

$$A = \epsilon.b.c \quad (3)$$

Onde A é a absorbância em unidades arbitrárias (u.a.), ϵ é a absortividade molar ou coeficiente de extinção molar intrínseco de cada material, b é o caminho óptico percorrido pelo feixe de luz, e c é a concentração do material de análise (mol L^{-1}).⁴⁶

As nanopartículas metálicas apresentam uma banda na região do UV-Vis denominada banda plasmon, que decorre da formação de momentos de dipolos pelo carregamento da superfície. Isso ocorre, pois, além da excitação dos elétrons formadores da casca da nanopartículas, outra interação com a radiação eletromagnética ocorre pelo fato de que em escala nanométrica o caminho livre dos elétrons excede o raio da partícula fazendo com que os elétrons possam ser excitados pela luz visível. Ocorre então uma oscilação coletiva dos elétrons de condução em decorrência da interação com a radiação eletromagnética, formando assim os momentos de dipolo pelo carregamento da superfície. Uma força de restauração nas nanopartículas tenta compensar essa carga, resultando em um comprimento de onda ressonante único, gerando a banda plasmon de superfície.⁴⁷

1.3.2 *Caracterização espectroscópica por FTIR (Fourier Transform Infrared Spectrophotometer)*

A radiação infravermelha corresponde à parte do espectro eletromagnético que engloba a faixa de 400 a 4000 cm^{-1} . Muitos estudos utilizam-se desta técnica para comprovar a existência e as interações entre as espécies constituintes do filme, observando modificações (encurtamento, deslocamento) de bandas característica das substâncias presentes no filme.⁴⁸ Isso pode ser observado, pois os espectros de infravermelho são provocados pelos diferentes modos de vibração e rotação de uma molécula.⁴⁶

1.3.3 *Caracterização Morfológica por Microscopia de Força Atômica*

Esta é uma técnica muito importante quando se pretende estudar a superfície de um material sólido, pois pode permitir, em alguns casos, resoluções em escala nanométrica.

Os microscópios de força atômica são compostos basicamente de uma pequena ponta fixa à extremidade de uma haste flexível (cantilever), registrando-se as forças de atração e repulsão que esta sofre. Através de deflexões sofridas na

ponteira ocasionadas por forças de atração e/ou repulsão entre a ponteira e o material, o equipamento traça um mapa morfológico da superfície a ser analisada.

O equipamento pode operar de dois modos: o contato e não contato. No modo contato o equipamento gera forças repulsivas devido a proximidade entre a ponteira e a amostra. A ponta do equipamento mantém uma distancia da superfície mantendo a força de repulsão na ordem de 10^{-6} a 10^{-8} N. Já no modo não contato surgem forças atrativas entre a ponteira e o material analisado. Estas forças são fracas, na ordem de 10^{-12} N.³³

Esta técnica pode ser utilizada para estudo das superfícies dos filmes possibilitando a aquisição das seguintes informações: rugosidade, espessura dos filmes, tamanho dos grãos, entre outras características morfológicas.⁴⁹

1.4 MÉTODO DE POTENCIAL ZETA E DLS

Praticamente todos os materiais particulados adquirem carga elétrica em sua superfície quando em contato com um líquido. Essa carga pode aparecer de várias maneiras como na dissociação de grupos ionogênicos na superfície da partícula ou na adsorção de íons presentes na solução à superfície da partícula. A carga líquida presente na superfície da partícula afeta toda a distribuição de íons na sua vizinhança, formando assim uma dupla camada elétrica da partícula com o líquido.⁵⁰

Este potencial, o potencial zeta, pode ser medido experimentalmente sendo um indicador útil da carga superficial e pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais.

A avaliação do tamanho de partícula pode ser realizada utilizando a técnica de difração a laser. Esse método parte do princípio de que o ângulo de difração do laser é inversamente proporcional ao tamanho da partícula por ele incidida, sendo assim, o tamanho de partícula é calculado com base na intensidade de luz recebida pelo detector. Essa técnica é indicada para suspensões, por permitir a recirculação da amostra em frente ao feixe do laser, possuindo a vantagem de ser rápida e ter boa reprodutibilidade.⁵¹

1.5 MÉTODOS ELETROQUÍMICOS

1.5.1 Voltametria Cíclica (VC)

Através da técnica Voltametria Cíclica de podem-se obter informações qualitativas e quantitativas sobre as espécies químicas como a termodinâmica dos processos redox, cinética das reações de transferência de elétrons e reações químicas acopladas a processos adsorptivos, que são representadas em uma curva de corrente-potencial chamado de voltamograma, que consiste num gráfico de corrente em função do potencial.^{9,10}

Aplica-se primeiramente uma varredura linear no sentido direto até um valor de potencial já estabelecido, quando este ponto é atingido inverte-se o sentido da varredura até o potencial inicial. Este ciclo pode-se repetir de acordo com o número de ciclos pré-determinados.

Os parâmetros que são analisados nesta técnica são os potenciais de oxidação (E_{pa}) e redução (E_{pc}), correntes de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}). A corrente total é dada pela soma da corrente capacitiva com a corrente faradaica. A corrente faradaica ocorre devido à reação no eletrodo e a capacitiva ocorre devido à contribuição da carga da dupla camada elétrica. Quando as velocidades de varredura são elevadas, a corrente capacitiva deve ser subtraída de modo a obter valores exatos das constantes de velocidade⁵²

Quando há adsorção no eletrodo os picos catódicos e anódicos crescem a cada varredura, crescimento que é interrompido quando há saturação na superfície do eletrodo. Se o sistema for reversível, isto é, se a quantidade de cargas envolvidas nas varreduras catódicas e anódicas forem iguais, o crescimento irá ocorrer no mesmo potencial, fornecendo um voltamograma que apresenta os picos nas varreduras direta e inversa. Além do perfil do voltamograma outros parâmetros são observados em processos reversíveis:

a) Quando a corrente de pico varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura.

b) A razão da corrente de pico anódico e catódico é igual a 1 ($I_{pa}/I_{pc}=1$), independente de v , desde que não haja variação no potencial de pico com a velocidade de varredura de potencial.^{48,52}

c) A diferença de potencial entre o pico anódico e catódico ΔE ($E_{pa} - E_{pc}$) deve ser igual a 59 mV dividido pelo número de elétrons envolvidos no processo ($\Delta E = 59 \text{ mV}/n$).^{9,52}

A técnica possibilita a avaliação dos processos de oxidação, redução, reversibilidade, mecanismos de reações redox, formação de intermediários e adsorção sobre eletrodos.⁵²

Em processos irreversíveis a velocidade de transferência de elétron é menor do que a velocidade de varredura, e as concentrações das espécies oxidadas e reduzidas não estão apenas em função do potencial, considera-se assim o coeficiente de carga (α). Os voltamogramas desse tipo de processo normalmente apresentam apenas um dos picos, ou o anódico ou catódico, sendo que há um deslocamento com o aumento da velocidade de varredura dependendo de α ⁵², neste caso a equação que descreve a corrente de pico (I_{pc}) é dada por:

$$I_{pc} = (2,99 \cdot 10^{-5}) n (\alpha n)^{1/2} A C_0 D_0^{1/2} v^{1/2} \quad (4)$$

Além do pico reverso, os processos irreversíveis também seguem alguns parâmetros como:

- a) $I_{pc} \propto v^{1/2}$
- b) E_{pc} desloca $-30 \text{ mV}/n$ por década de aumento de $v^{1/2}$
- c) $|E_p - E_{p/2}| = 48 \text{ mV}/\alpha n$

Há também os processos quase reversíveis onde a corrente é controlada pela etapa de transferência de massa e de carga. A equação de Nernst é apenas aproximadamente satisfeita. Neste tipo de sistema a cinética de oxidação e redução da reação deve ser considerada simultaneamente. Em conclusão, na medida que aumenta a velocidade de varredura aumenta a irreversibilidade, enquanto que ao mesmo tempo há uma diminuição da corrente de pico relativa ao processo reversível e uma crescente separação entre os picos anódicos e catódicos.

1.5.2 *Espectroscopia de Impedância Eletroquímica*

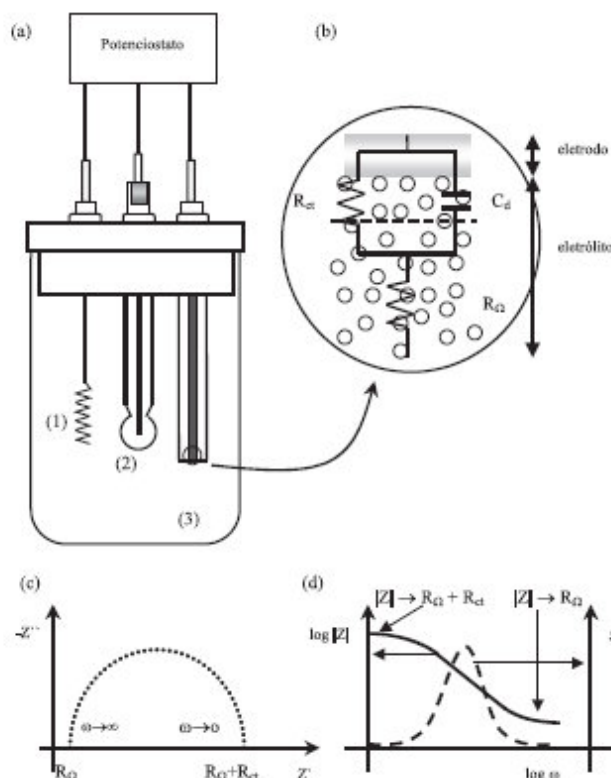
Esta técnica envolve a aplicação de uma perturbação de potencial ou corrente no sistema em que se está trabalhando. Essa perturbação é feita por meio de uma aplicação de potencial contínuo sobre o qual é imposto uma variação senoidal de potencial com uma amplitude muito pequena, na ordem de milivolts, tornando possível a investigação de processos eletroquímicos próximos ao estado de equilíbrio. Pode-se também perturbar o sistema usando diferentes valores de frequência, pois a onda de potencial assume um comportamento senoidal.⁵³

Em decorrência do potencial senoidal aplicado ao sistema surge uma corrente também de natureza senoidal. Monitorando-se o potencial aplicado e a corrente pode-se obter a impedância do sistema e o ângulo de fase, ou a defasagem da corrente em relação ao potencial aplicado.

A impedância foi originalmente introduzida para descrever a resposta de sistemas compostos por capacitâncias, resistências e indutâncias, estendeu-se aos sistemas eletroquímicos, uma vez que inúmeros processos podem contribuir para a relação entre a corrente e o potencial do sistema. Portanto pode-se, partindo de medidas da impedância e ângulo de fase, avaliar processos como transporte de carga (incluindo estimativa de velocidade de transferência), condutividade de filmes, capacitância redox e de dupla camada, coeficientes de difusão de portadores de carga, entre outros.⁵⁴

Para obtenção de informações a partir de dados de impedância eletroquímica faz-se uso de modelos matemáticos ou circuitos equivalentes. A aplicação de circuitos equivalentes tem como fundamento as similaridades entre o comportamento da célula eletroquímica. A Figura 6a mostra um circuito elétrico de resistores, capacitores e indutores. Uma equivalência típica entre um circuito equivalente e um sistema eletroquímico é apresentada na Figura 6b.

FIGURA 6: a) célula eletroanalítica típica para uso em EIS: 1) Eletrodo auxiliar, 2) Eletrodo de referencia, 3) Eletrodo de trabalho; b) diagrama esquemático de um circuito Randles superimposto á interface eletrodo/eletrolito. c) diagrama de Impedância (diagrama de Nyquist) referente ao circuito equivalente apresentado na figura, d) diagrama de Bode correspondente ao diagrama de Nyquist apresentado.⁵³



FONTE: Química Nova, v.27, no.6, p. 970-979. 2004

A dupla camada elétrica é similar a um capacitor de placas paralelas, a resistência a transferência de carga na interface eletrodo/ solução a um resistor. Isso possibilita a associação em paralelo entre um resistor e um capacitor. Uma vez que a corrente que passa na interface eletrodo/solução é dirigida pelos íons em solução, o efeito resistivo na solução sobre a migração dos íons é representado por uma resistência R_W . Por outro lado, a introdução de elementos capacitivos em um circuito promove uma defasagem entre a corrente e o potencial. Desta forma, pode-se representar comumente a impedância em sistemas compostos por resistores e capacitores sendo através de um diagrama de fases no qual a impedância apresenta uma componente real (resistiva) e imaginária (capacitiva).⁵³

A partir dos dados de impedância, o sistema pode ser modelado como um circuito elétrico que contém capacitores, indutores e resistores, que representam cada um dos fenômenos eletroquímicos que ocorrem na célula eletroquímica. Assim pode-se, por exemplo, quantizar a resistência do eletrólito ou a capacitância de dupla camada presente junto ao eletrodo de trabalho.⁵⁴

2.0 OBJETIVOS

Visando contribuir para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico para doenças infecciosas endêmicas do Brasil, com métodos mais baratos, rápidos, portáteis e eficientes, o objetivo principal deste trabalho é a preparação de um imunossensor para a detecção da doença de Chagas baseado nanopartículas de prata incorporadas a matrizes orgânica (PDDA) e inorgânica (SiPy^+Cl^-).

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Sintetizar e caracterizar nanopartículas de prata incorporadas a matrizes orgânica (PDDA) e inorgânica (SiPy^+Cl^-).
- b) Preparar um eletrodo modificado por meio da imobilização do anticorpo relativo a essa doença sobre um substrato de vidro condutor (ITO). Tal Imobilização será dada através da técnica LbL usando nanopartículas de Prata incorporadas a matriz SiPy^+Cl^- intercalando com o polímero PVS, formando assim quantas camadas forem necessárias, após a formação das bicamadas será imobilizado o antígeno, e posteriormente uma camada de BSA. Investigar os processos de adsorção dos compostos estudados em filmes.
- c) Caracterizar os filmes obtidos através de técnicas espectroscópicas, eletroquímicas e morfológicas.
- d) Estudar a potencialidade dos filmes obtidos como sensores eletroquímicos para a doença de Chagas, através de técnicas eletroquímicas.

3.0 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 REAGENTES UTILIZADOS

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de pureza analítica sem purificação prévia. O AgNO_3 , NaBH_4 , PDDA, PVS, BSA foram obtidos comercialmente (Sigma-Aldrich).

As biomoléculas usadas neste trabalho (antígeno e anticorpo referente à doença de Chagas) foram adquiridos por meio de um KIT laboratorial para a determinação qualitativa e semi-quantitativa da doença de Chagas (Gold Analisa Diagnóstica Ltda).

3.2 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A síntese de nanopartículas de prata foi realizada utilizando o polímero cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano (SiPy^+Cl^-) como nanoreator e estabilizante e também com o poli (cloreto de dialidimetilamônio) (PDDA). O híbrido da nanopartícula metálica com o SiPy^+Cl^- ou PDDA foi obtido via redução química do nitrato de Prata (AgNO_3) usado como o fornecedor de prata. Borohidreto de sódio (NaBH_4) foi usado como agente redutor, a reação foi mantida sob agitação durante 1 hora. A concentração de SiPy^+Cl^- usada em todas as reações foi de 3 mg mL^{-1} e 4 mg mL^{-1} , quando o nanoreator utilizado foi o PDDA. Variou-se as concentrações de prata em 2 e 5% em relação a quantidade de estabilizante usada (m/m), a concentração de redutor variou de 10 e 100% em relação a concentração de prata usada (m/m). As soluções foram preparadas com água destilada.

3.3 MEDIDAS DE POTENCIAL ZETA E DLS

As medidas de potencial zeta e distribuição de tamanho de partículas para todas as condições de síntese das suspensões de nanopartículas foram realizadas no IFSC/USP de São Carlos no equipamento Zetatrac, da marca Micro Trac.

3.4 CONSTRUÇÃO DE FILMES FINOS PELA TÉCNICA LbL

Para a construção dos filmes foram usadas nanopartículas de prata incorporadas ao polímero SiPy^+Cl^- como polication e PVS como poliânion, formando assim uma bicamada. As concentrações usadas para o crescimento dos filmes foram 3 mg mL^{-1} para o PVS e para a suspensão de nanopartículas a concentração usada foi de 3 mg mL^{-1} SiPy^+Cl^- , 2% Ag e 10% redutor.

Usou-se como substrato placas de vidro recoberto por uma fina camada de óxido de índio dopado com estanho (ITO).

Os tempos de imersão no poliânion e polication foram de 1, 2, 3, 5 e 10 minutos, sendo o crescimento dos filmes acompanhados por meio da técnica de espectrometria UV-Vis. Foram estudados filmes com até 12 bicamadas. O procedimento de crescimento dos filmes seguiu as etapas descritas abaixo:

- a) Imersão do substrato devidamente limpo na solução de PVS num tempo determinado.
- b) Imersão desse substrato em água destilada por um tempo determinado.
- c) Secagem do substrato.
- d) Imersão na suspensão de nanopartículas por um tempo determinado.
- e) Imersão em água destilada.
- f) Secagem do substrato.

3.5 ADSORÇÃO DO ANTÍGENO E ANTICORPO SOBRE OS FILMES FINOS

Nos filmes de 2 e 4 bicamadas de $\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-$ foi adicionado uma camada de proteína antigênica referente a doença de Chagas. Essa proteína estava presente em uma suspensão de hemácias proveniente do KIT laboratorial ANALISA para a doença de Chagas e foi usada com diluição 1:10 em tampão PBS PH 6,8.

Foi estudado o tempo de imersão dos filmes $(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_2$ e $(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4$ variando o tempo de imersão dos mesmos na suspensão de hemácias contendo o antígeno em 15, 30 e 45 minutos, os filmes foram então secos ao ar e posteriormente imersos por 5 minutos em tampão PBS pH 6,8 e novamente secos ao ar.

Estudou-se também o tempo de imersão na solução de BSA (10%). Dois filmes $(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4$ foram imersos por 15 minutos na solução contendo o antígeno, secos ao ar, posteriormente imersos por 5 minutos no tampão PBS pH 6,8, e novamente secos ao ar. Após esta etapa um dos filmes foi imerso por 15 minutos outro por 30 minutos na solução de BSA, posteriormente os filmes foram secos ao ar e então imersos em tampão PBS pH 6,8 por 5 minutos e finalmente foram secos ao ar.

A formação do imunocomplexo entre o antígeno (AG) (adsorvido sob as bicamadas de $\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-$ no filme) e o anticorpo (AB) (presente numa amostra de soro positiva para a doença de Chagas proveniente do KIT, diluída 1:10 em tampão PBS pH 6,8) foi realizada através da incubação do filme $(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4$ na suspensão de hemácias contendo o antígeno por 15 minutos, seco ao ar, imerso em tampão PBS por 5 minutos, seco ao ar, imerso em BSA 10% por 15 minutos, imerso em tampão PBS por 5 minutos, e finalmente seco ao ar, formando assim a conformação do sensor $(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4/\text{AG/BSA}$. Este filme foi então imerso na amostra de soro positiva (contendo AB da doença de Chagas) durante 15, 30 e 45 minutos, a fim de estudar o melhor tempo de imersão na solução contendo o AB, o filme foi então imerso em tampão PBS pH 6,8 para retirar o excesso de AB que não ligou-se a superfície do eletrodo modificado formando o imunocomplexo com o AG, durante 5 minutos.

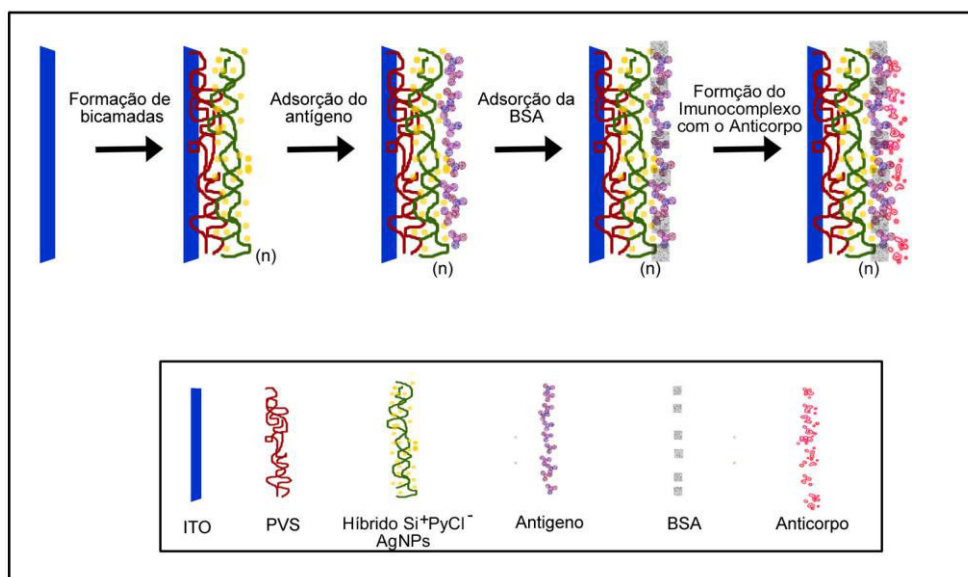
O tempo de imersão no tampão PBS após a formação do imunocomplexo também foi estudada, O filme $(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4/\text{AG/BSA}$, descrito no parágrafo anterior foi incubado na amostra de soro positiva durante 15 minutos, seco ao ar, e posteriormente imerso em tampão PBS pH 6,8 por 5 minutos, repetindo o processo de lavagem no tampão por 3 vezes para estudar o efeito do tampão na estabilidade do imunocomplexo formado.

Realizou-se teste com o eletrodo modificado em soro negativo da doença de Chagas provenientes dos KITs ANALISA, deixando o eletrodo $(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4/\text{AG/BSA}$ imerso por 15 minutos na solução soro negativo, posteriormente o filme foi seco ao ar, e imerso em tampão PBS por 5 minutos. A Figura 7 representa esquematicamente a modificação do eletrodo.

Fez-se um teste de diluições das amostras contendo o AB da doença de Chagas. A solução de soro sanguínea positiva (contendo o AB da doença de Chagas), foi diluída em tampão PBS pH 6,8 nas seguintes proporções 1:5, 1:10, 1:20, 1:40. Os filmes $(\text{PVS}/\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4/\text{AG}/\text{BSA}$ foram então imersos separadamente nas amostras de AB diluídas por 15 minutos, secos ao ar, imersos em tampão PBS por 5 minutos (3x), e finalmente secos ao ar.

A Figura 7 ilustra esquematicamente a conformação do filme coma interação entre as biomoléculas.

FIGURA 7: Esquema da modificação da superfície do eletrodo.



FONTE: O autor

Essas modificações foram acompanhadas através da técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica, observando apenas a alteração na resistividade do eletrodo.

3.6 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA NA REGIÃO DO UV-Vis

Além de caracterizar a suspensão de nanopartículas, esta técnica foi utilizada para monitorar o processo de deposição das bicamadas sobre a superfície do substrato. Utilizou-se um espectrofotômetro VARIAN modelo Cary 50, de feixe

simples, sendo operado no modo absorvância. O monitoramento foi analisado para os filmes na configuração PVS/Ag-SiPy⁺Cl⁻, a partir da segunda bicamada.

3.7 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA NA REGIÃO DO FTIR

Foram realizadas medidas de espectroscopia na região do infravermelho dos polieletrólitos SiPy⁺Cl⁻, do híbrido Ag-SiPy⁺Cl⁻ e PVS, bem como da interação entre o híbrido e o PVS formando um filme com 30 bicamadas, pela técnica LbL.

O espectro de FTIR do polycation SiPy⁺Cl⁻ foi realizado em pastilha de KBr. Para o híbrido Ag-SiPy⁺Cl⁻ e PVS fez-se filmes *casting*, sob substratos de silício. Para o filme LbL com 30 bicamadas entre o PVS e Ag-SiPy⁺Cl⁻ usou-se um substrato de silício. Todos os espectros foram obtidos em um espectrofotômetro da série Excalibur BIORAD, FTS-4000, equipado com o acessório de refletância difusa na região entre 7000 e 400cm⁻¹, sendo acumuladas 128 varreduras.

3.8 ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS FILMES POR AFM

A fim de investigar a morfologia das superfícies dos filmes finos automontados em diferentes estágios de deposição foram realizadas medidas de AFM da superfície dos filmes contendo 0, 1, 5, 10, 15 e 20 bicamadas de (PVS/Ag-SiPy⁺Cl⁻)₄ sob o ITO.

O equipamento utilizado foi um microscópio marca SHIMADZU, modelo SPM 9600 do Complexo de Laboratórios Multiusuários da UEPG (CLABMU). As imagens foram obtidas pelo modo não contato.

3.9 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando-se uma cela eletroquímica (capacidade 10 mL) contendo três eletrodos: eletrodo de trabalho (filmes obtidos pela técnica LbL), eletrodo de referencia (Ag/AgCl), e um contra eletrodo de platina. Tais medidas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PalmSens e Micro-Autolab II conectado a um

microcomputador para aquisição de dados. As medidas de determinação da doença foram realizadas após a formação do complexo antígeno-anticorpo, que se dará pela imersão do sensor numa solução contendo o anticorpo da doença por um período de tempo que para que possa ocorrer a reação entre o antígeno (AG, presente no filme) e o anticorpo (AC, presente na solução).

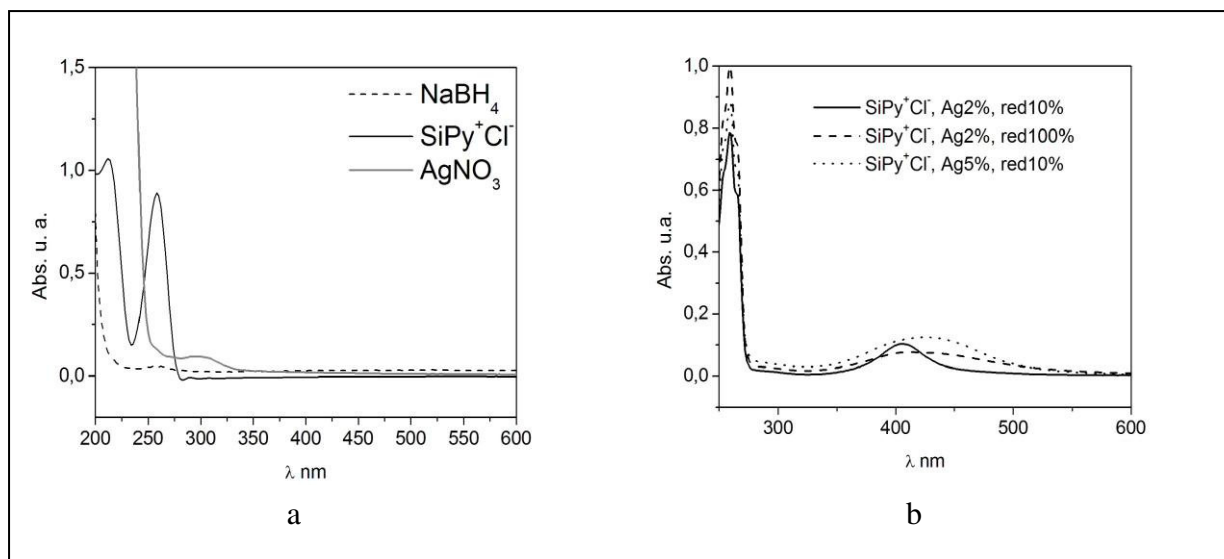
Para os estudos de impedância eletroquímica foi necessário realizar um estudo prévio das impedâncias dos ITOs antes de cada estudo, pois eles apresentam resistividades a transferência de carga muito diferentes entre si, para isso realizou-se a leitura de impedância eletroquímica de vários ITOs limpos, numa cela eletroquímica (capacidade 10 mL) contendo três eletrodos: eletrodo de trabalho (ITOs limpos), eletrodo de referencia (Ag/AgCl), e um contra eletrodo de platina, com eletrólito de suporte tampão PBS pH 6,8 com $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ 0,1 mol L⁻¹, selecionando assim ITOs com o valor máximo de impedância de 50 Ω de diferença entre si.

4.0 *RESULTADOS E DISCUSSÃO.*

4.1 *SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA.*

Foram feitas sínteses de nanopartículas de prata usando o SiPy^+Cl^- e PDPA como estabilizantes, AgNO_3 como sal provedor de prata e NaBH_4 como agente redutor. As concentrações de SiPy^+Cl^- e PDPA usadas em cada síntese foram 3 mg mL⁻¹ e 4 mg mL⁻¹ respectivamente. As concentrações de prata usadas foram de 2 e 5% referente a quantidade de estabilizante usada (m/m), as concentrações de agente redutor usadas nas sínteses variaram de 10 e 100% em relação a quantidade de prata (m/m). As suspensões foram mantidas sob agitação durante uma hora. Após a agitação foram feitas leituras de UV-Vis para cada condição de síntese, como ilustra as Figuras 8a e 8b.

FIGURA 8: Sobreposição dos espectros de UV-Vis de a) solução de SiPy^+Cl^- 3 mg mL^{-1} , NaBH_4 e AgNO_3 . b) Sobreposição das condições de síntese usando como estabilizante o SiPy^+Cl^- 3 mg mL^{-1} .



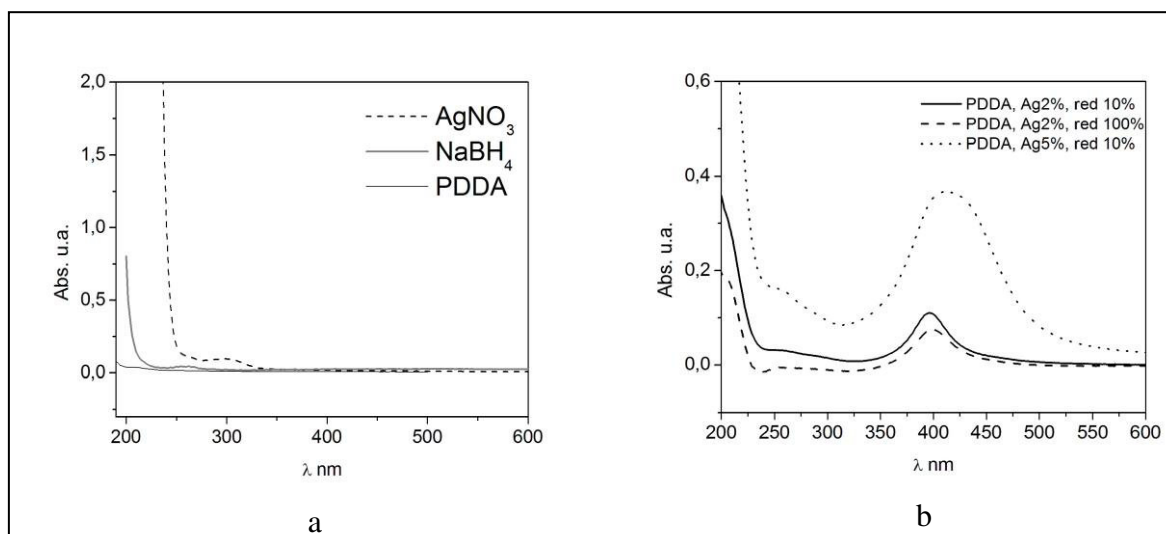
FONTE: O autor

A caracterização dos compostos isolados indicou que o SiPy^+Cl^- e AgNO_3 apresenta bandas características na região do UV-Vis, nota-se a banda do SiPy^+Cl^- , próxima a 298 nm é atribuída a transição dos elétrons $\pi-\pi^*$ do anel piridínio.³³ A Figura 8b ilustra os espectros de UV-Vis para as sínteses realizadas usando o SiPy^+Cl^- como estabilizante, variando as concentrações de prata e redutor usadas. Pode-se observar que a banda em 298 nm , atribuída a transição dos elétrons $\pi-\pi^*$ do anel piridíneo do SiPy^+Cl^- , mantém-se ao término da reação, indicando que o SiPy^+Cl^- não sofreu alterações durante a síntese, observa-se porém que há o surgimento de uma banda plasmon de nanopartículas de prata próxima a 400 nm .⁵⁵ Nota-se que a síntese com 2% de prata e 10% redutor apresentou o pico da banda mais intenso, enquanto que para as demais, com Ag 2% e NaBH_4 100% ou Ag 5% e NaBH_4 10%, apresentou picos mais largos e não tão intensos. A largura da banda de adsorção está relacionada com a dispersão das partículas e o máximo de adsorção relaciona-se com o tamanho médio das partículas.⁵⁵ Nota-se também um deslocamento da banda de adsorção das nanopartículas em relação as condições de síntese realizada, de 406 nm para a síntese com Ag 2% e NaBH_4 10 % para 415 nm para a síntese com Ag 2% e NaBH_4 100% e 415 nm para a síntese com Ag 5% e

NaBH₄ 10%, o que indica a dependência das condições de síntese para o tamanho e dispersão das nanopartículas de prata na suspensão.

Os espectros de UV-Vis, ilustrados nas Figuras 9a e 9b, para as síntese com o PDDA, apresentaram resultados semelhantes as sínteses realizadas com o SiPy⁺Cl⁻ como estabilizante.

FIGURA 9: Sobreposição dos espectros de UV-Vis de a) PDDA 4 mg mL⁻¹, NaBH₄ e AgNO₃. b) Sobreposição das condições de síntese usando como estabilizante o PDDA 4 mg mL⁻¹.



FONTE: O autor.

Nota-se na caracterização dos compostos isolados que nenhum dos reagentes usados nas sínteses de nanopartículas de prata apresenta bandas características na região do UV-Vis, com exceção do AgNO₃, como ilustra a Figura 9a, porém, após o término das sínteses notou-se o surgimento de uma banda próxima a 400 nm, referente à banda plasmon de nanopartículas de prata. Para as sínteses realizadas com Ag 2% observou-se pouca variação na intensidade, largura e deslocamento do pico de absorção (400nm e 403 nm), porém para a síntese com 5% de prata notou-se um pico mais largo e com deslocamento para 413 nm. Ambos os resultados, com o uso do SiPy⁺Cl⁻ e PDDA nas mais diversas condições de síntese, foram posteriormente relacionados com o tamanho e distribuição das partículas na suspensão.

Todas as condições de síntese, tanto as realizadas com o estabilizante SiPy⁺Cl⁻ como com o PDDA, foram submetidas a medidas de potencial zeta e

distribuição de tamanho de partícula, os resultados podem ser visualizados na Tabela 1:

Tabela 1: Distribuição de Tamanho de Partícula de prata para as diferentes concentrações de Ag e NaBH₄ usadas nas sínteses com os estabilizantes SiPy⁺Cl⁻ e PDDA usados.

Nanoreator	Ag / NaBH₄ (%/%)	Potencial Zeta (mV)	Tamanho de Partícula (nm)	Banda de Absorção UV-Vis (nm)
SiPy ⁺ Cl ⁻	2-10	16,97	18-25	406
SiPy ⁺ Cl ⁻	2-100	24,35	30-40	415
SiPy ⁺ Cl ⁻	5-10	47,64	225	415
PDDA	2-10	0,610	25-35	400
PDDA	2-100	31,54	150	403
PDDA	5-10	492	140-160	413

Nota-se que quando a concentração de Ag usada nas sínteses foi de 5%, as partículas sintetizadas foram maiores para os dois estabilizantes usados, ou seja, os resultados para as sínteses onde a concentração de prata foi de 5% as partículas mantiveram-se acima de 100 nm (225 nm e 140-160 nm para o SiPy⁺Cl⁻ e PDDA respectivamente). Isso pode ocorrer devido ao aumento na probabilidade de aglomeração das partículas, pois a concentração de Ag nessas condições é maior, o que favorece a nucleação e o crescimento das partículas. Uma vez que a concentração de prata é maior, há o aumento na probabilidade de choques e colisões entre as mesmas, proporcionando o crescimento das partículas em suspensão. Quando a concentração do NaBH₄ foi 10% e a concentração da Ag foi mantida em 2% e o estabilizante usado foi o SiPy⁺Cl⁻, houve formação de partículas menores, entre 18 e 25 nm. O uso do PDDA como estabilizante não foi eficiente quando comparado ao uso do SiPy⁺Cl⁻, pois em todos os casos onde as condições de reação eram as mesmas, ou seja, nas mesmas concentrações de NaBH₄ e Ag, os tamanhos de partícula foram maiores com o uso do PDDA, indicando que o SiPy⁺Cl⁻ atua de forma mais efetiva para a síntese de nanopartículas de Ag, obtendo-se nanopartículas com menores tamanhos. Isso pode ocorrer por que o SiPy⁺Cl⁻

interage com nanopartículas de Ag alterando sua estrutura e formando “gaiolas” onde as nanopartículas tornam-se estáveis na suspensão, evitando assim a nucleação e crescimento das mesmas³³, uma vez que partículas em tamanho nanométrico possuem alta energia superficial e tendem a aglomeração se não estiverem na presença de uma substância que diminua essa energia superficial, o PDDA engloba as partículas formadas durante a redução do sal ⁴⁰, minimizando essa alta energia superficial das nanopartículas, porém com tamanho de formação dessas partículas maiores em relação ao SiPy⁺Cl⁻. Em relação as condições de síntese com o uso do SiPy⁺Cl⁻ nota-se que nas concentrações de Ag 2% e NaBH₄ 10% houve a formação de partículas com tamanhos menores, resultados que comparados com os espectros de UV-Vis para o uso do SiPy⁺Cl⁻ entram em concordância, pois nessas condições, o pico de absorção do espectro de UV-Vis para a banda plasmon de nanopartículas de Ag foi mais intenso e definido, indicando que há uma menor distribuição de partículas em solução, e também há a formação de partículas menores.⁵⁵

Em relação a variação da concentração do NaBH₄ nota-se que o aumento na concentração leva a formação de partículas maiores quando compara-se sínteses onde o estabilizante e a concentração de Ag é a mesma. Isso pode ocorrer devido ao fato de que a maior concentração do agente redutor favorece a aceleração do processo de redução, com isso a concentração de Ag reduzida é maior em um menor tempo o que favorece o choque entre muitas moléculas de Ag e assim as nanopartículas acabam apresentando tamanhos maiores.

Em relação aos valores do potencial zeta nota-se que o aumento na concentração de prata leva a formação de nanopartículas com potenciais maiores, o que pode indicar suspensões mais estáveis. Com relação à concentração de redutor notou-se que, tanto com o uso do SiPy⁺Cl⁻ como do PPDA, o aumento na concentração do redutor levou a um pequeno aumento no valor do potencial zeta. Como nanopartículas de Ag assumem carga parcial negativa em meio aquoso a adição de cargas positivas leva a um aumento no potencial zeta, nesses casos o aumento no valor do potencial zeta pode ser entendido pelo fato de que ocorre uma saturação dos sítios ativos do SiPy⁺Cl⁻ e do PDDA referentes a formação das nanopartículas.

Considerando os fatores discutidos acima optou-se em seguir os próximos estudos com o uso da condição de síntese SiPy^+Cl^- 3 mg mL⁻¹, Ag 2% e NaBH₄ 10%.

4.2 ESTUDO CINÉTICO: CRESCIMENTO DE FILMES LbL.

Como discutido no capítulo anterior, o SiPy^+Cl^- mostrou-se um melhor nanoreator para as formação de nanopartículas de prata, favorecendo a formação de partículas menores, o estudo de crescimento de filmes pela técnica LbL foi realizado usando a suspensão de SiPy^+Cl^- 3 mg mL⁻¹, 2% de Ag e 10% de NaBH₄ e como poliânion foi usado o PVS.

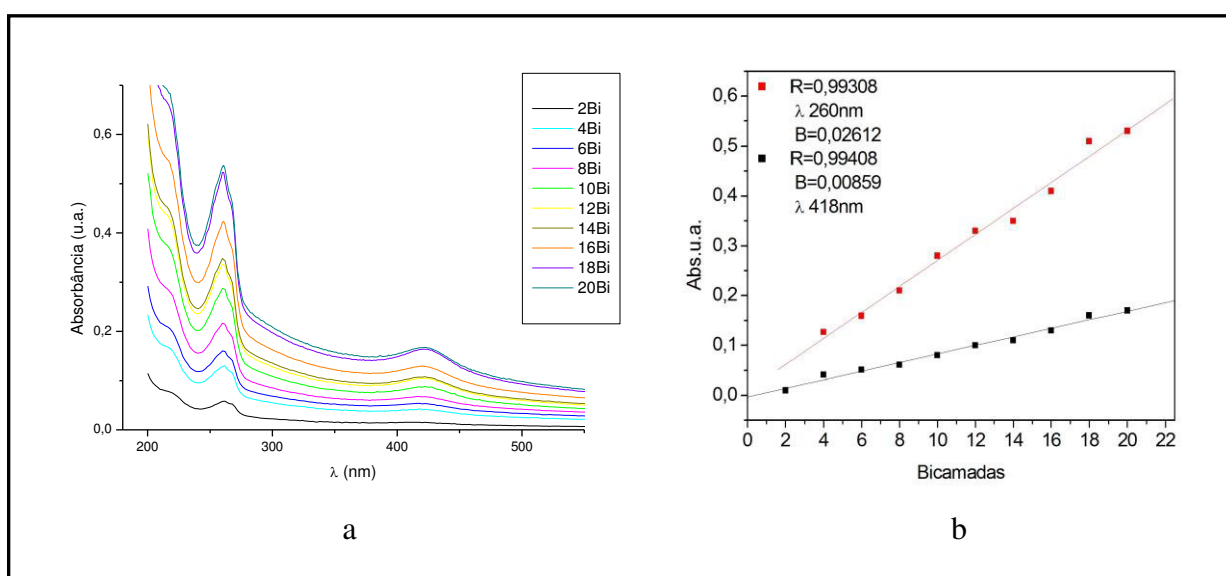
A técnica LbL consiste numa interação eletrostática entre duas substâncias com cargas contrárias. A técnica se dá pela imersão de um substrato sólido, carregado por exemplo, negativamente, em uma solução catiônica, de maneira que uma camada do polycation adsorva na superfície do substrato. Em seguida, o substrato é imerso na solução aniônica, promovendo a adsorção do poliânion na camada previamente adsorvida de polycation (ou vice-versa). Obtém-se assim uma bicamada. A repetição do processo permite a fabricação de filmes compostos por quantas camadas forem desejadas.

Neste estudo, procurou-se verificar o tempo ideal de imersão do substrato buscando a maior adsorção de cada substância usada. Para isso fez-se testes usando um substrato de quartzo, a suspensão acima citada e uma solução de PVS 3 mg mL⁻¹, considerando que cada polieletrólito contribui com uma carga no processo de adsorção, usou-se concentrações iguais das soluções de polycation e poliânion. A espectroscopia de UV-vis foi utilizada para monitorar o aumento no número de bicamadas de filmes automontados, pois a absorbância aumenta na medida em que as bicamadas se adsorvem na superfície do substrato. Fez-se o crescimento de vários filmes variando o tempo de imersão em cada solução, os tempos estudados foram de 1, 2, 3, 5 e 10 minutos.

Os espectros de UV-Vis para cada filme com tempos diferentes apresentaram o mesmo comportamento, o aumento do numero de bicamadas levou a um aumento na absorbância, como mostra a Figura 10a, comprovando que ocorreu adsorção dos

polieletrólitos a cada bicamada, este comportamento, foi o mesmo para os filmes construídos com outros tempos de imersão, pois o aumento no número de bicamadas levou ao aumento na absorbância, comprovando a formação de cada bicamada.

FIGURA 10: Espectro de UV-Vis para o filme (a) 20 bicamadas da suspensão de SiPy^+Cl^- e AgNPs com o poliânion PVS, com tempo de imersão de 2 minutos em cada polieletrólito, (b) relação dos picos com o número de bicamadas, em 260 nm referente ao SiPy^+Cl^- (linha vermelha) e em 418 nm referente ao pico da banda plasmon de nanopartículas de prata (linha preta).



FONTE: O autor.

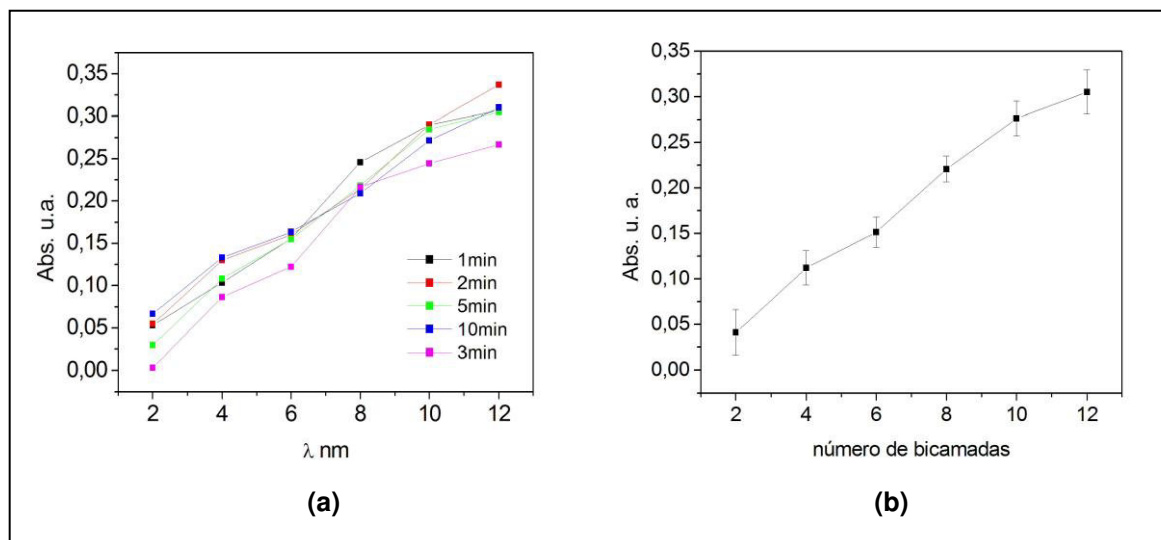
De acordo com a Figura 10b nota-se que a relação entre o número de bicamadas e a absorbância, tanto no pico em 260 e 418 nm referentes às bandas de absorção do SiPy^+Cl^- e AgNPs respectivamente, é linear com coeficiente de correlação em torno (R) de 0,99, nota-se também que as retas apresentam coeficientes angulares diferentes, na reta vermelha, referente ao pico de absorção do SiPy^+Cl^- , o coeficiente angular é maior que o da reta preta, referente ao pico de absorção das nanopartículas. Isso pode ocorrer, pois a absorvidade do SiPy^+Cl^- e o coeficiente de extinção molar das AgNPs são diferentes, o que leva a uma absorbância dessas substâncias com intensidades diferentes, pois estes valores são

proporcionais a absorbância, e característicos/diferentes para diferentes substâncias.

Os tempos de imersão estudados foram de 1, 2, 3, 5 e 10 minutos em cada polieletrólito com várias bicamadas cada um, ou seja, foi construído um filme com tempo de imersão de 1 minuto, outro com tempo de imersão de 2 minutos e assim por diante, fez-se a leitura da absorção no UV-Vis a cada 2 bicamadas, como está apresentado na Figura 11.

Pode-se perceber com este estudo que um minuto já é o suficiente para que o máximo de cada polieletrólito seja adsorvido a cada bicamada, pois com tempos maiores as absorbâncias foram relativamente as mesmas (Figura 11b), ou seja, acima de 1 minutos a quantidade de amostra que se adsorve na superfície do filme é a mesma a cada bicamada,

FIGURA 11: Estudo comparativo do Tempo de imersão e aumento no numero de bicamada entre o PVS e Suspensão de $\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-$, (a) para filmes com 12 bicamadas com tempos de imersão de 1, 2, 3, 5 e 10 minutos e (b) média das medidas absorbâncias dos filmes de 12 bicamadas com variação no tempo de imersão de 1, 2, 3, 5 e 10 minutos.

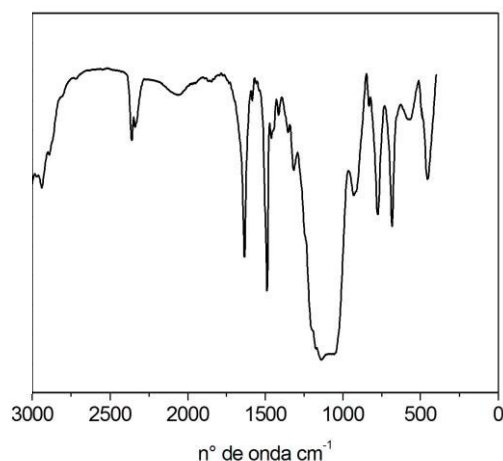


FONTE: O autor.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO SiPy^+Cl^- POR FTIR.

A Figura 12 ilustra o espectro na região do infravermelho para um filme *casting* do SiPy^+Cl^- . Observa-se duas bandas intensas e largas no intervalo de números de onda em 1092 cm^{-1} e em 1113 cm^{-1} relacionadas com o estiramento simétrico e assimétrico do grupo Si-O-Si, sendo que a primeira (em 1092 cm^{-1}) está relacionada com a rede de vibração Si-O-Si e a segunda (em 1113 cm^{-1}) é atribuída à estrutura de gaiola de Si-O-Si.^{33, 56, 57} Há também outras bandas próximas a 791 e 445 cm^{-1} que são atribuídas ao modo de deformação do grupo Si-O-Si. Há ainda bandas vibracionais características do anel piridínio em 1624 e 1489 cm^{-1} cujos valores são similares aos apresentados na literatura⁵⁸

FIGURA 12:Espectro de FTIR do polícatión SiPy^+Cl^- em pastilha de KBr.



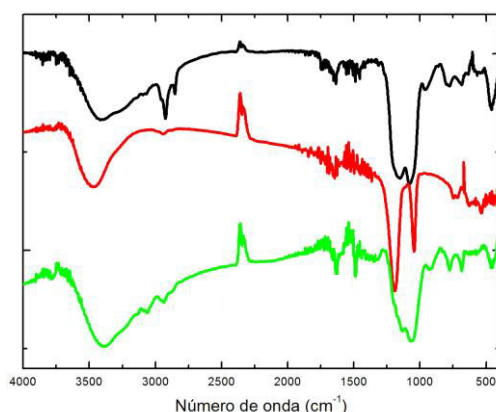
FONTE: O autor

Outra banda próxima a região de numero de onda de 990 cm^{-1} é atribuída aos diferentes modos de vibração, com uma grande contribuição de bandas relacionadas com a deformação angular do grupo Si-C-H e o estiramento da ligação Si-C.⁵⁷

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES POR FTIR

A Figura 13 ilustra os espectros de FTIR para o filme automontado (PVS/Ag-SiPy⁺Cl⁻)₃₀, bem como os filmes *casting* do híbrido Ag-SiPy⁺Cl⁻ e do PVS.

FIGURA 13: Espectros de FTIR de filmes *casting* do Ag-SiPy⁺Cl⁻ (verde) e PVS (vermelho), bem como do filme LbL com 30 bicamadas de (PVS/Ag-SiPy⁺Cl⁻) (preto).



FONTE: O autor

Nota-se as bandas características próximas a 1208 cm⁻¹ e 1080 cm⁻¹ referentes as transições assimétricas do grupo S=O e S=S, respectivamente do PVS, bem como a banda larga e intensa próxima a 1063 cm⁻¹ e 1112 cm⁻¹ referentes ao estiramento simétrico e assimétrico dos grupos Si-O-Si do híbrido SiPy⁺Cl⁻.^{33,59}

Observa-se que há a sobreposição dessas bandas, com deslocamento na intensidade de ambas no espectro do filme contendo 30 bicamadas desses polieletrólitos, mostrando assim que ocorre a interação entre essas substâncias através da técnica LbL.

Nota-se que a incorporação das AgNPs a estrutura do SiPy⁺Cl⁻ induz a uma forte diminuição na intensidade de adsorção das banda na região de 990 cm⁻¹ e 1113 cm⁻¹, observada na Figura 12, porém na Figura 13 as respectivas bandas não aparecem com tanta intensidade.^{33,56} Pode-se concluir que a incorporação de AgNPs provoca um impedimento nos modos vibracionais do SiPy⁺Cl⁻, conforme observado em outros estudos, como a incorporação de nanopartículas de platina ao

SiPy⁺Cl⁻.³³ O fato da estrutura de gaiola estar impedido de apresentar vibração (em 1113 cm⁻¹) após a adição das AgNPs indica que as NPs estão próximas a esta estrutura, impedindo-a de vibrar.³³

4.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA POR AFM

Os filmes automontados produzidos com diferentes números de bicamadas de (PVS/Ag-SiPy⁺Cl⁻) foram submetidos à análise de AFM e estas medições produziram os valores de espessura apresentados na Tabela 2. Esperava-se que a espessura do filme LbL com apenas uma bicamada fosse maior do que o obtido para a superfície limpa ITO, mas isso não ocorreu. O fato pode ser explicado por que a primeira camada preenche a depressão presente na superfície do próprio ITO, demonstrando assim a possibilidade desses materiais sobre o substrato ITO. Depois da primeira bicamada a espessura do filme aumenta rapidamente até atingir (PVS/Ag-SiPy⁺Cl⁻)₂₀, o mesmo comportamento pode ser observado em relação a rugosidade dos filmes obtidos, comprovando que os polieletrólitos usados são eficientes na formação de filmes por meio da técnica LbL. Este resultado entra em concordância ao comportamento observado por meio das análises de crescimento de filmes realizado pela técnica de UV-visível.

Tabela 2: Espessura dos filmes automontados (PVS/Ag-SiPy⁺Cl⁻)_n obtidos com diferentes números de camadas, 1 μm² e por 5 μm²

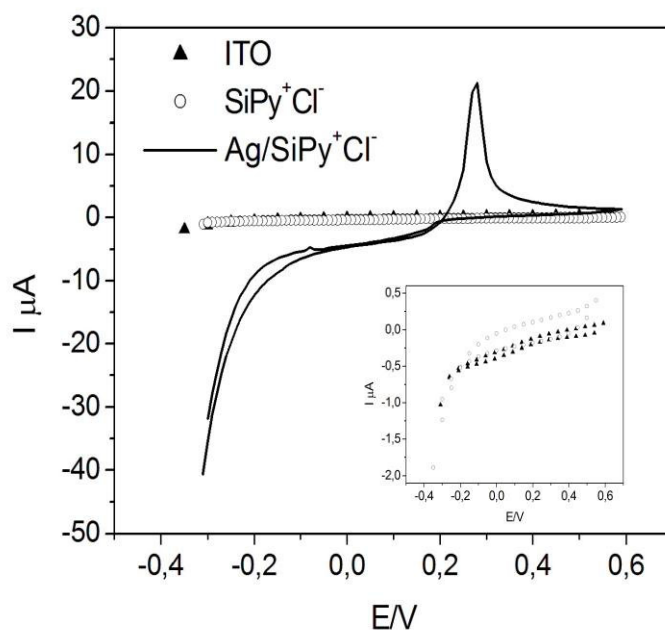
Número de Bicamadas	Espessura/Rugosidade em 1 μm ² (nm)	Espessura/Rugosidade em 5 μm ² (nm)
0	9,93 / 0,96	16,08 / 1,56
1	4,00 / 1,73	13,25 / 3,13
5	17,45 / 3,57	20,34 / 4,59
10	35,04 / 5,57	41,20 / 6,65
15	90,49 / 12,29	169,12 / 24,89
20	107,28 / 16,07	260,44 / 35,03
Espessura por Bicamada	4,98	9,88

4.6 CARACTERIZAÇÃO VOLTAMÉTRICA

4.6.1 Nanopartículas de prata

Os Voltamogramas cíclicos dos filmes *casting* SiPy^+Cl^- e do Híbrido de Ag- SiPy^+Cl^- depositados sobre um substrato ITO foram realizados em ácido nítrico 0,1 mol/L, vs Ag/AgCl são representados na Figura 14.

FIGURA 14: Voltamogramas cíclicos para branco (ITO), filme *casting* SiPy^+Cl^- sob o ITO e filme *casting* Ag- SiPy^+Cl^- . Figura inserida: Voltamogramas cíclicos para branco (ITO), filme *casting* SiPy^+Cl^- sob o ITO. Eletrólito de suporte HNO_3 0,01mol L⁻¹, $\nu = 30 \text{ mV s}^{-1}$, vs Ag/AgCl



FONTE: O autor.

Inicialmente verificou-se no voltamograma cíclico do substrato ITO sem modificação que não se há nenhum processo redox nessas condições. Notou-se o mesmo comportamento quando o SiPy^+Cl^- foi depositado sob o ITO, apenas com o aumento na corrente capacitiva, como é ilustrado na Figura 14. Quando se fez a varredura do filme *casting* do híbrido Ag- SiPy^+Cl^- notou-se o surgimento do pico de oxidação em 0,27 V, referente à oxidação das nanopartículas de Ag. Segundo Crespilho et. al. (2009) nanopartículas de prata estabilizadas em polianilina e

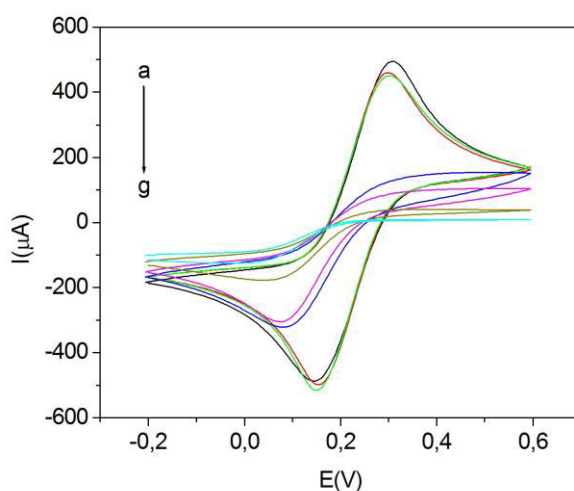
depositadas no ITO apresentam, em meio de ácido sulfúrico um pico de oxidação da Ag para em 0,28 V vs. Ag/AgCl.⁶⁰

4.6.2 Caracterização dos filmes LbL

Considerando que os estudos de detecção da doença de chagas foram realizados em amostras biológicas usou-se o tampão fosfato (PBS) pH 6,8 como eletrólito de suporte com a presença do par redox $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como molécula sonda tanto para os estudos de caracterização voltamétrica dos filmes LbL bem como para os estudos de impedância eletroquímica. O uso do par redox se dá pela necessidade de uma molécula sonda, uma vez que os polieletrólitos usados na construção dos filmes apresentam apenas voltamogramas cíclicos sem a corrente faradaica, apenas há a corrente capacitiva e O imunocomplexo formado entre o AG e AB não é eletroativo. O uso do par redox proporciona a observação das variações na corrente e/ou nos potenciais através do pico de oxi-redução do par redox usado.

A figura 15 ilustra o voltamograma cíclico para diferentes números de bicamadas do filme (PVS/Ag-SiPy⁺Cl⁻)_n.

FIGURA 15: Voltamogramas cíclicos do eletrodo com várias camadas (PVS/Ag-SiPy⁺Cl⁻)_n sobre ITO (n = diferentes números de bicamadas), (a) n=0, (b) n=1, (c) n=2, (d) n=3, (e) n=4, (f) n=5, (g) n=6, na presença de $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em tampão PBS pH 6,8, $\nu = 30 \text{ mV s}^{-1}$, vs Ag/AgCl.



FONTE: O autor.

Inicialmente observou-se no voltamograma cíclico do ITO sem modificação um processo redox reversível atribuído ao par redox $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$, com E_{pa} e E_{pc} em 0,31 e 0,15 V, respectivamente e I_{pa} e I_{pc} em 495 e -485 μA . Observando os voltamogramas cíclicos para os filmes automontados $(\text{PVS}/\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$, nota-se que os filmes com 1 e 2 bicamadas apresentaram uma resposta eletroquímica próxima a do ITO sem modificação, ou seja, os picos de corrente são definidos e intensos (459 e -496 μA , para $n=1$ e 450 e -512 μA para $n=2$), com potenciais de oxidação e redução em 0,3 e 0,15 V ($n=1$), e 0,3 e 0,15 V ($n=2$) respectivamente.

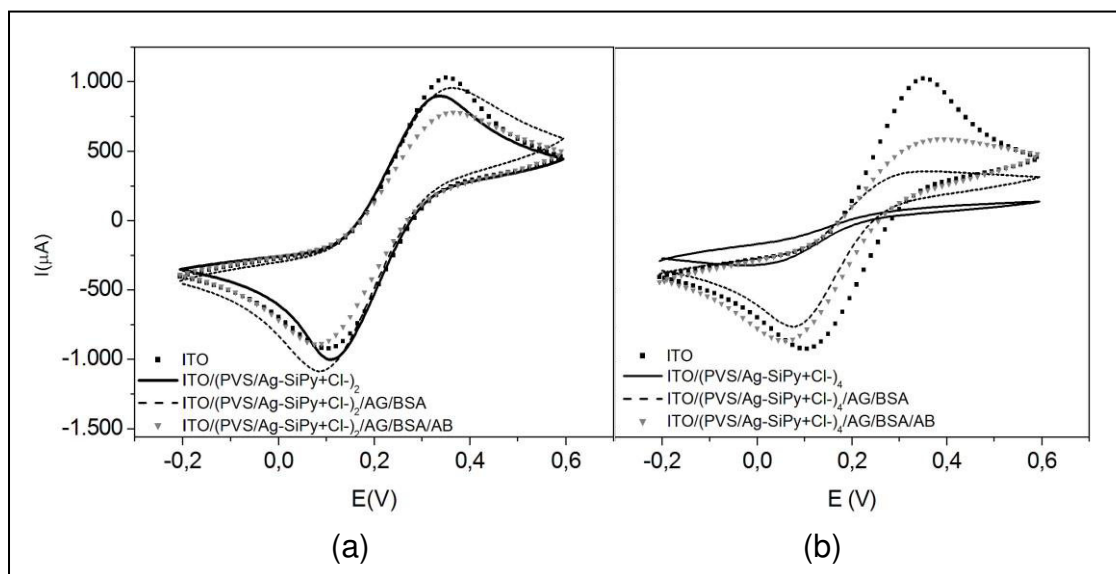
Para os voltamogramas obtidos com maiores números de bicamadas (3 a 6 bicamadas) há uma diminuição abrupta na intensidade das correntes de picos de oxidação e redução do par redox, o que demonstra que filmes com maior número de bicamadas são mais resistivos à passagem de corrente. Observou-se também que a diminuição da intensidade dos picos é mais pronunciada a cada duas bicamadas. Nos filmes com 5 e 6 bicamadas nota-se um processo redox *quasi*-reversível pois há comportamento faradaico pouco pronunciado, demonstrando a formação de um filme resistivo à passagem de corrente sob a superfície do ITO.

A partir da caracterização dos filmes obtidos, iniciou-se o estudo do comportamento deste como um imunossensor para a detecção da Doença de Chagas. Optou-se em seguir o estudo com as biomoléculas apenas com os filmes $(\text{PVS}/\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)$ contendo 2 e 4 bicamadas. A escolha do filme $(\text{PVS}/\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_2$ deve-se à melhor resposta para o processo redox da molécula sonda. Por outro lado, apesar do filme com 4 bicamadas não apresentar boa resposta eletroquímica, estudou-se este filme para efeitos de comparação.

4.6.3 Interação com AG e AB

Para o estudo da interação das bicamadas com as biomoléculas usadas na detecção da Doença de Chagas em amostras de soro sanguíneas, os filmes com 2 e 4 bicamadas foram imersos por 15 minutos nas biomoléculas, para a incubação, conforme procedimento descrito no capítulo 3.5.

FIGURA 16: Voltamogramas cíclicos para (a) filmes $(\text{PVS}/\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_2$, com as biomoléculas BSA, AG, AB e (b) $(\text{PVS}/\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4$, com as biomoléculas BSA, AG, AB. Eletrólito de suporte PBS pH 6,8 $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ 0,1mol/L, $\nu = 30 \text{ mV s}^{-1}$, vs Ag/AgCl.



FONTE: O autor.

A Figura 16a ilustra os voltamogramas cíclicos para filmes com duas bicamadas $(\text{PVS}/\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_2$ na presença de antígeno e BSA e na presença de antígeno, BSA e anticorpo para a formação do imunocomplexo entre o AG e AB. Ao comparar o ITO ou filme automontado sem a presença das biomoléculas há pouca variação nas intensidades de corrente em relação aos filmes automontados na conformação $(\text{PVS}/\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_2/\text{AG/BSA}$ e $(\text{PVS}/\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_2/\text{AG/BSA/AB}$. O fator que interfere nessa resposta é a interação entre os polieletrólitos com o substrato ITO. Foi observado no estudo de AFM que a adição de uma bicamada recobre apenas as imperfeições da superfície do ITO e no estudo voltamétrico (capítulo 4.6.2, Figura 15) o comportamento de duas bicamadas é semelhante ao de uma bicamada, conclui-se então que não há o recobrimento total da superfície do ITO com as 2 bicamadas, tornando a resposta do filme muito próxima a resposta do ITO.

Por outro lado, nota-se uma variação mais evidente nas intensidades de corrente quando foram utilizados os filmes com 4 bicamadas, como observa-se nos voltamogramas ilustrados na Figura 16 b. Quando é adicionado sob o filme $(\text{PVS}/\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4$ o AG e BSA nota-se o aumento na corrente de pico com $I_{\text{pa}} = 359 \mu\text{A}$, indicando que a adição do AG e BSA sob as bicamadas torna o filme menos

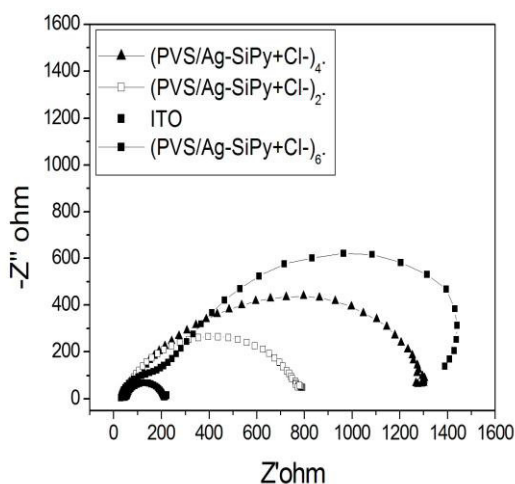
resistivo, quando há a formação do imunocomplexo entre AG e AB sob o filme (PVS/Ag-SiPy⁺Cl⁻)₄/AG/BSA/AB a corrente de pico aumenta para 593 µA, tornando o filme ainda menos resistivo, este resultado é corroborado com os resultados obtidos por meio da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (capítulo 4.7.2). Pode-se dizer que os picos referentes aos filmes com interações com as biomoléculas são mais definidos no filmes com 4 bicamadas, devido à quantidade de nanopartículas presentes no filme ser maior em relação ao filme com duas bicamadas, e conseqüentemente a adsorção do AG é mais eficiente, pois esta é dependente da concentração de nanopartículas metálicas, bem como o polieletrólito SiPy⁺Cl⁻ apresenta sítios que favorecem a adsorção do AG.

4.7 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA.

4.7.1 Variação no número de bicamadas.

Iniciou-se os estudos de impedância eletroquímica com os filmes (PVS/Ag-SiPy⁺Cl⁻) com 2, 4 e 6 de bicamadas. Nota-se na Figura 17 que o aumento no número de bicamadas está relacionado com o aumento no comportamento resistivo dos filmes a transferência de carga, o que é corroborado com o observado na Figura 15 referente ao voltamograma cíclico de filmes com diferentes números de bicamadas.

FIGURA 17: Espectro de Impedância Eletroquímica para filmes com 2, 4 e 6 bicamadas para os filmes (PVS/Ag-SiPy⁺Cl⁻).



FONTE: O autor.

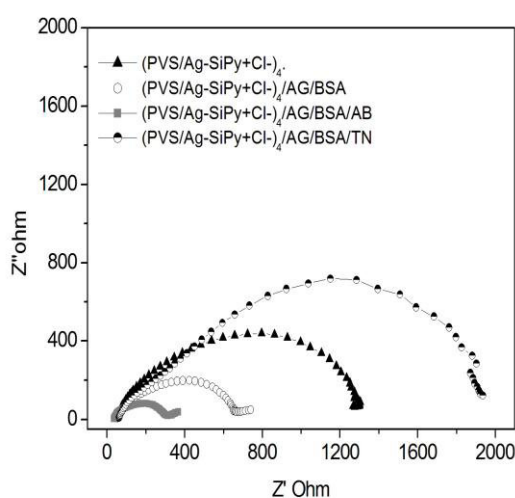
Esse comportamento pode ser explicado por meio do recobrimento da superfície do filme. No filme com 2 bicamadas há um menor recobrimento da superfície do ITO tornando-o menos resistivo, facilitando assim a transferência de carga. No filme com 6 bicamadas há um recobrimento maior, logo a resistividade a transferência de carga será maior. Portanto o filme com 2 bicamadas mostrou-se menos resistivo que o de 4 bicamadas que também mostrou-se menos resistivo que o de 6 bicamadas. Para o filme de 6 bicamadas observa-se em altas frequências a ocorrência de dois processos, devido a o indício da formação de dois semicírculos, em baixas frequências nota-se um comportamento indutivo do filme, comportamento que pode ser observado em filmes muito porosos ou quando ocorre adsorção sob a superfície do filme. Nessas condições e em concordância com os estudos de voltametria cíclica optou-se em prosseguir os estudos apenas com filmes (PVS/Ag-SiPy⁺Cl⁻)₄.

4.7.2 Interação entre antígeno e anticorpo

Para estudar a interação entre o filme (PVS/Ag-SiPy⁺Cl⁻) com as biomoléculas usadas construiu-se, sob o ITO, filmes nas seguintes conformações (PVS/Ag-SiPy⁺Cl⁻)₄, (PVS/Ag-SiPy⁺Cl⁻)₄/AG/BSA, (PVS/Ag-SiPy⁺Cl⁻)₄/AG/BSA/AB e (PVS/Ag-SiPy⁺Cl⁻)₄/AG/BSA/AB/AB.

$\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_4\text{AG/BSA/TN}$ (o teste negativo (TN) diluído 1:10 consistia em uma solução de soro sanguínea sem a presença de anticorpos da doença de Chagas) . O tempo de incubação nas soluções contendo o antígeno, BSA e no anticorpo ou teste negativo foi de 15 minutos, o tempo de lavagem em Tampão PBS pH 6,8 entre cada incubação foi de 5 minutos. A Figura 18 ilustra os espectros de impedância para estes filmes.

FIGURA 18: Espectro de impedância para os filmes $(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4$, $(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4/\text{AG/BSA}$, $(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4/\text{AG/BSA/AB}$ e $(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4\text{AG/BSA/TN}$.



FONTE: O autor.

Tabela 3: Parâmetros obtidos a partir dos dados de impedância (Diagramas de Nyquist) dos eletrodos $(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4$, $(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4/\text{AG/BSA}$, $(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4/\text{AG/BSA/AB}$ e $(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4\text{AG/BSA/TN}$ (Figura 18).

Eletrodo modificado	$R_{ct} (\Omega)$
$(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4$	1244
$(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4/\text{AG/BSA}$	618
$(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4/\text{AG/BSA/AB}$	271
$(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4\text{AG/BSA/TN}$	1862

Nota-se que a resistividade a transferência de carga (R_{ct}) do filme diminui quando se adiciona o antígeno e BSA sob a superfície do filme $(\text{PVS/Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4$,

de 1244 Ω para 618 Ω com a adição do AG e BSA. Era de se esperar que ocorresse o contrário, pois com a adição de uma camada adicional sob a superfície do filme o mesmo deveria ficar mais resistivo, mas como a solução usada se trata de uma suspensão de hemácias que contém o antígeno, há também a adsorção de moléculas de Ferro, que presentes na superfície do filme facilitam a transferência de carga com o eletrólito de suporte que contém $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$, tornando assim o filme menos resistivo. Observou-se o mesmo quando há a formação do imunocomplexo entre o antígeno e o anticorpo na superfície do filme, a resistividade a transferência de carga do filme $(\text{PVS}/\text{Ag}-\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_4/\text{AG}/\text{BSA}$ diminui consideravelmente de 618 Ω para 271 Ω com a formação do imunocomplexo entre o AG e AB no filme $(\text{PVS}/\text{Ag}-\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_4/\text{AG}/\text{BSA}/\text{AB}$. Esse comportamento é corroborado com os resultados obtidos no estudo de voltametria cíclica para filmes construídos seguindo o mesmo procedimento que os filmes do estudo em discussão, descritos no capítulo 4.6.3 (Figura 16b). No estudo de voltametria cíclica a presença das biomoléculas sob as 4 bicamadas de $(\text{PVS}/\text{Ag}-\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)$ levou ao aumento nas correntes de pico de oxidação do par redox, indicando a formação de um filme menos resistivo quando comparado com o filme contendo apenas as bicamadas.

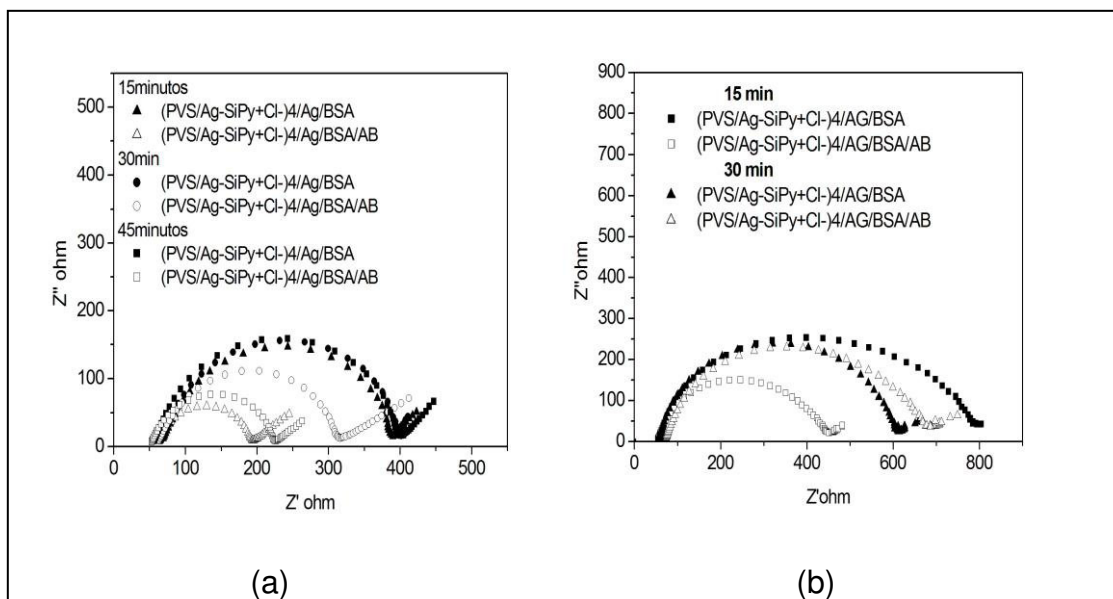
Quando o filme $(\text{PVS}/\text{Ag}-\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_4/\text{AG}/\text{BSA}$ ficou incubado em uma solução de soro sanguínea sem a presença de anticorpos da doença de Chagas, o teste negativo (TN), a resistividade a transferência de carga aumenta para 1862 Ω , pois nesse caso não há a formação de imunocomplexos sob a superfície do filme, ocorrendo apenas a adsorção de espécies presentes na amostra do teste negativo, provocando a formação de uma camada superficial no filme, aumentando assim a impedância do mesmo ou o aumento na resistividade a transferência de carga.

4.7.3 Estudo do tempo de imersão no antígeno, BSA e anticorpo.

A Figura 19a ilustra o espectro de impedância para filmes com 4 bicamadas de $(\text{PVS}/\text{Ag}-\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)$ onde variou-se o tempo de imersão em 15, 30 e 45 minutos nas soluções das biomoléculas (antígeno (AG), BSA e anticorpo (AC)). Notou-se que a adsorção do AG sob a camada do híbrido $\text{Ag}-\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ independe do tempo, pois com 15, 30 e 45 minutos o espectro de impedância apresentou o mesmo

comportamento, ou seja, a resistividade a transferência de carga dos filmes foi a mesma (Figura 19a).

FIGURA 19: Espectro de Impedância eletroquímica para filmes de $(\text{PVS}/\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4$ com adsorção das biomoléculas e variação do tempo de imersão em (a) 15, 3 e 45 minutos do antígeno e anticorpo, com tempo de imersão na BSA de 5 minutos e (b) tempo de imersão no AG e Ab de 15 minutos e variação no tempo de imersão na BSA de 15 e 30 minutos.



FONTE: O autor.

Tabela 4: Parâmetros obtidos a partir dos dados de impedância (Diagramas de Nyquist) dos diferentes eletrodos da FIGURA 19a.

Eletrodo modificado	Rct (Ω)
15min $(\text{PVS}/\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4/\text{AG}/\text{BSA}$	322
15min $(\text{PVS}/\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4/\text{AG}/\text{BSA}/\text{AB}$	131
30min $(\text{PVS}/\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4/\text{AG}/\text{BSA}$	341
30min $(\text{PVS}/\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4/\text{AG}/\text{BSA}/\text{AB}$	250
45min $(\text{PVS}/\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4/\text{AG}/\text{BSA}$	345
45 min $(\text{PVS}/\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4/\text{AG}/\text{BSA}/\text{AB}$	172

Em relação ao tempo de incubação na solução contendo o anticorpo pode-se dizer esta é dependente do tempo como ilustra a Figura 19a, ou seja, a formação do

imunocomplexo entre o antígeno, que está presente no filme, e o anticorpo, que está presente na amostra de análise, depende do tempo de incubação, pois para os tempos estudados as resistividades dos filmes a transferência de carga foram diferentes, isso ocorre pois a velocidade de formação do imunocomplexo é lenta, ou seja, é dependente do tempo, pois envolve a deformação das proteínas envolvidas no processo (perda de estrutura terciária). Nesse estudo não se observou relação entre o aumento no tempo de incubação do filme na solução contendo o anticorpo e a impedância, pois o filme de 45 minutos mostrou resistividade intermediária entre o filme de 15 e o de 30 minutos, porém o filme de 30 minutos apresentou uma resistividade maior que o de 15 minutos. O filme de 15 minutos apresentou a menor resistividade a transferência de carga.

Pode-se dizer que a formação do imunocomplexo na superfície do filme faz com que a impedância, ou resistividade a transferência de carga do filme diminua em relação ao filme que contém apenas o antígeno e o BSA, isso pode ocorrer por que na formação do imunocomplexo há uma nova conformação das moléculas na superfície do filme deixando as moléculas de Ferro presentes na suspensão de hemácias mais expostas (esta suspensão é usada, pois é ela que contém o antígeno), facilitando assim a transferência de carga do filme quando se usa um eletrólito com o par redox $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$.

Tabela 5 - Parâmetros obtidos a partir dos dados de impedância (Diagramas de Nyquist) dos diferentes eletrodos da Figura 19b.

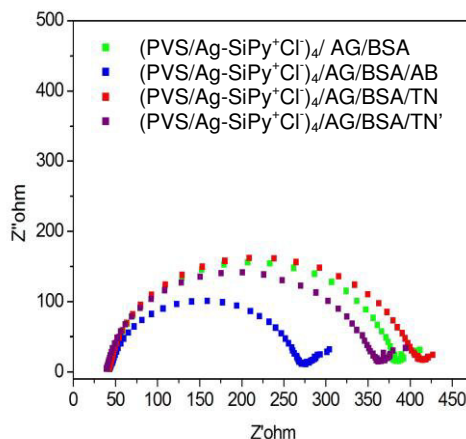
Eletrodo modificado	Rct (Ω)
15min (PVS/Ag-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₄ /AG/BSA	725
15min (PVS/Ag-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₄ /AG/BSA/AB	393
30min (PVS/Ag-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₄ /AG/BSA	562
30min (PVS/Ag-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₄ /AG/BSA/AB	585

Na Figura 19b, referente à variação no tempo de imersão do BSA, nota-se que 15 minutos é o tempo ideal para que a quantidade necessária de BSA seja adsorvida sob a superfície do filme, com a finalidade de bloquear as espécies reativas que não são referentes ao antígeno de forma efetiva. Quando o filme foi

incubado por 30 minutos no BSA a resistividade com anticorpo foi praticamente igual a do filme contendo apenas o antígeno (585 Ω e 562 Ω respectivamente), ou seja, não houve a formação do imunocomplexo, provavelmente por que além de bloquear as espécies reativas que não pertencem ao AG a BSA acabou bloqueando também o as moléculas do antígeno, tornando o filme incapaz de formar o imunocomplexo com a molécula de interesse, o anticorpo, pois com 30 minutos de incubação há um excesso de BSA adsorvido na superfície do filme. No filme de 15 minutos isso não foi observado, sendo este tempo usado nos demais estudos.

A Figura 20 ilustra o efeito do tempo de imersão no tampão nas respostas dos filmes. Para este estudo os filmes foram imersos por 5 minutos no tampão por 3 x após a incubação nas amostras de soro contendo o anticorpo e nas amostras de soro sem anticorpo (testes negativos, TN). Observou-se que, quando o filme o foi incubado na solução de soro contendo o anticorpo, a resistividade do filme diminuiu, porém quando incubada nas amostras de soro negativas a resistividade permanece parecida com a do sensor $(PVS/Ag-SiPy^+Cl^-)_4/AG/BSA$. Esse comportamento é diferente quando comparado com o da Figura 18, onde a resistividade do filme aumenta relativamente quando o mesmo é imerso apenas por 5 minutos no tampão após a incubação na amostra de soro negativa, este comportamento foi observado pela adsorção de espécies na superfície do filme, o que não ocorre quando o tempo de lavagem no tampão aumenta, pois com o aumento do tempo de lavagem garante-se que as moléculas que foram apenas adsorvidas na superfície do filme sejam totalmente removidas.

FIGURA 20: Espectro de impedância para filmes $(\text{PVS}/\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4$ incubado por 5 minutos no AG, 15 minutos no BSA, 5 minutos no AC ou TN, com tempo de lavagem em PBS pH 6,8 por 5 minutos por 3x.

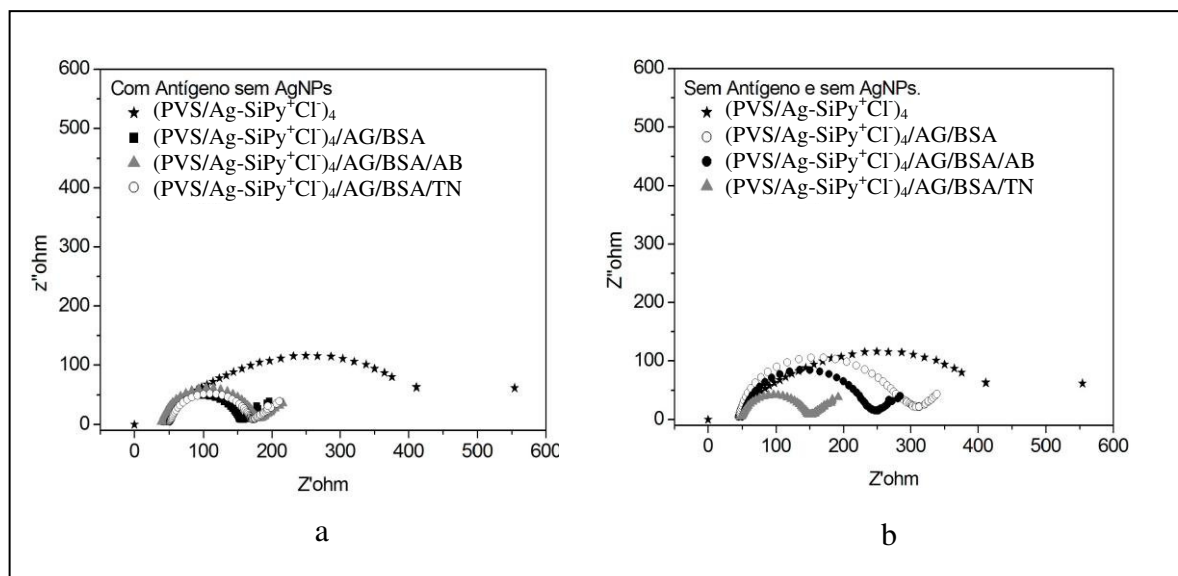


FONTE: O autor.

4.7.4 Efeito da presença das nanopartículas de prata e do antígeno nas respostas do filme.

A Figura 21 ilustra os espectros de impedância nos quais os filmes foram formados sem a presença de nanopartículas de prata e/ou sem antígeno.

FIGURA 21: Espectros de impedância eletroquímica para filmes $(\text{PVS}/\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4$, (a) com AG e sem AgNPs e (b) sem AgNPs e AG.



FONTE: O autor.

Tabela 6: Parâmetros obtidos a partir dos dados de impedância (Diagramas de Nyquist) dos diferentes eletrodos da Figura 21a.

Eletrodo modificado	Rct (Ω)
$(\text{PVS}/\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4$	365
$(\text{PVS}/\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4/\text{AG}/\text{BSA}$	114
$(\text{PVS}/\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4/\text{AG}/\text{BSA}/\text{AB}$	143
$(\text{PVS}/\text{Ag-SiPy}^+\text{Cl}^-)_4/\text{AG}/\text{BSA}/\text{TN}$	122

Nos filmes do espectro da Figura 21a não há a presença das nanopartículas, mas há a presença do antígeno. Segundo a literatura, biomoléculas como antígenos e anticorpos ligam-se facilmente a nanopartículas metálicas ²⁷, como nesse caso não há nanopartículas metálicas, há uma menor quantidade de sítios para que o antígeno possa se ligar na superfície do filme, há apenas a presença de grupos contendo N do SiPy^+Cl^- para que essa ligação ocorra, nesse caso, embora haja o antígeno, o sensor não foi efetivo na detecção dos anticorpos, pois tanto o espectro do teste negativo (soro sem anticorpo) e do soro com anticorpo os valores das resistividades de transferência de carga foram praticamente iguais, sendo impossível

distinguir qual amostra está ou não contaminada com a doença de interesse e qual não está.

Tabela 7 - Parâmetros obtidos a partir dos dados de impedância (Diagramas de Nyquist) dos diferentes eletrodos da Figura 21b.

Eletrodo modificado	Rct (Ω)
(PVS/Ag-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₄	365
(PVS/Ag-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₄ /AG/BSA	297
(PVS/Ag-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₄ /AG/BSA/AB	265
(PVS/Ag-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₄ /AG/BSA/TN	103

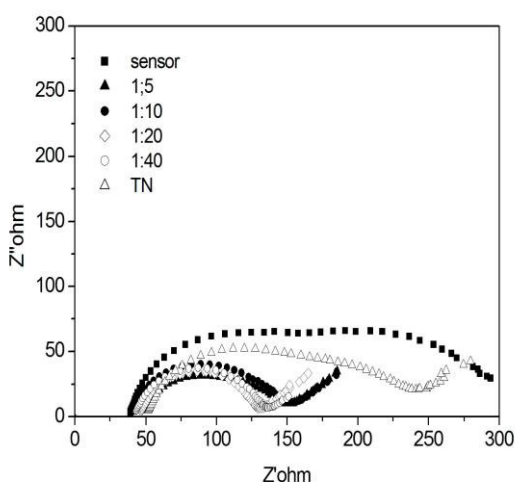
Nota-se que a imagem a da Figura 21b apresenta o espectro de impedância eletroquímica para filmes sem a presença das AgNPs nas bicamadas de PVS e SiPy⁺Cl⁻ e sem a presença do antígeno. Embora nota-se diferença na resistividade a transferência de carga do filme com o teste negativo e com o anticorpo, pode-se dizer que este sensor não foi efetivo na detecção dos anticorpos de chagas pois ambas resistividades foram menores do que a resistividade do sensor apenas com as bicamadas de PVS e SiPy⁺Cl⁻. Como não há o antígeno no filme há apenas a adsorção das moléculas presentes na amostra negativa e/ou na amostra com Anticorpo (AC), o que indica que nenhuma reação específica como a formação do imunocomplexo ocorreu, sendo assim, este sensor não é específico a doença de Chagas, podendo responder a qualquer outra substancia presente nas amostras estudadas.

4.7.5 *Estudo de Diluição das amostras de soro contendo anticorpo.*

Os estudos de diluição foram realizados com as seguintes diluições dos soros contendo anticorpo nas proporções 1:5, 1:10, 1:20 e 1:40 em tampão PBS pH 6,8. Os filmes foram feitos com 4 bicamadas de PVS/Ag-SiPy⁺Cl⁻, incubados por 15 minutos no Ag, 5 minutos imersos no tampão PBS, incubados por 15 minutos na BSA, 5 minutos no tampão PBS, incubados por 15 minutos nas amostras diluídas do

AC, e imersos por 5 minutos no tampão PBS (por 3 vezes). Os espectros de impedância eletroquímica são ilustrados na Figura 22.

FIGURA 22: Espectro de impedância eletroquímica para o filme PVS/Ag-SiPy⁺Cl⁻)₄/AG/BSA (sensor) incubado nas diluições 1:5, 1:10, 1:20 e 1:40 das amostras de soro contendo o anticorpo da doença de Chagas e para o teste negativo (TN=amostra de soro sem a presença do anticorpo da doença de Chagas) durante 15 minutos e posteriormente imersos por 5 minutos em tampão PBS pH 6,8 por 3X.



FONTE: O autor.

Nota-se que em todas as diluições o comportamento em relação a resistividade dos filmes foram as mesmas, com resistividade a transferência de carga parcialmente iguais. Isso levou ao impedimento da quantificação da concentração do anticorpo na amostra analisada. Nota-se, porém, que o teste negativo levou a uma resposta diferente das diluições positivas podendo assim diferenciar uma amostra que está contaminada de outra que não está contaminada com a doença de Chagas. O teste ANALISA para a doença de Chagas, que se baseia na técnica ELISA, é sensível a amostras contaminadas com a doença de Chagas com diluição dessas amostras na proporção 1:32, portanto este teste mostrou-se mais sensível do que uma das técnicas usadas para a detecção desta doença em laboratórios de análises clínicas.

5.0 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que o SiPy^+Cl^- apresentou-se como um nanoreator para formação de nanopartículas de prata mais eficiente em relação ao PDDA, pois o tamanho de partículas com seu uso foram menores. O uso de menor concentração de redutor e de sal de prata também levou a formação de partículas menores.

O SiPy^+Cl^- mostrou-se um bom polycation para a formação de filmes LbL juntamente com o poliânion PVS. Através de estudo da cinética de crescimento de filmes percebeu-se que o tempo de imersão de 1 minuto a cada bicamada era suficiente para garantir a adsorção da maior quantidade de material sobre o filme.

Concluiu-se que os tempos de imersão nas amostras biológicas (antígeno, BSA e anticorpo) ideais para a formação do sensor foi de 15 minutos. Concluiu-se também que é fundamental a presença do antígeno no sensor para que o mesmo possa ser específico a doença de Chagas, bem como é fundamental a presença das nanopartículas de prata.

O sensor proposto é eficiente na detecção de anticorpos da doença de Chagas presentes em amostras de soro sanguíneas de forma qualitativa, e apresentou sensibilidade maior do que o teste ANALISA para a detecção de Chagas por meio da técnica ELISA, que comumente é usada em laboratórios de análise clínica.

Por meio desta técnica pode-se obter um sensor simples, de baixo custo e eficiente na detecção de anticorpos presentes em amostras de soro sanguíneas. Além de ser um método de fácil manipulação e com possível miniaturização, facilitando assim o diagnóstico da doença de Chagas.

6.0 PERSPECTIVAS FUTURAS

Pode-se com este trabalho contribuir significativamente com pesquisas dedicadas ao estudo de imunossensores pois obteve-se um eletrodo modificado barato, rápido, de fácil manuseio, que futuramente pode vir a ser usado como um possível imunossensor para a doença de Chagas. As técnicas usadas para obtenção deste eletrodo são relativamente simples. Embora não pode-se obter resultados quantitativos os resultados qualitativos obtidos na detecção da doença de Chagas foram muito promissores pois foram resultados rápidos e com sensibilidade maior em relação ao teste usualmente feito em laboratórios de análise clínica. Acrescenta-se também que esta técnica pode ser usada na construção de eletrodos modificados para outras doenças, não limitando-se apenas a doença de Chagas. Em vista disso, como continuação dos trabalhos apresentados nessa dissertação destacam-se os seguintes tópicos:

- Detecção quantitativa de anticorpos da doença de Chagas por meio do sensor proposto
- Estudo com amostras com possíveis interferentes aos anticorpos de Chagas.
- Utilizar a técnica para a construção de sensores para outras doenças parasitárias como a Leishmaniose e Esquistossomose.
- Construção de um sensor com nanopartículas de ouro e comparação com o proposto nessa dissertação

7.0 Referências Bibliográficas.

- ¹ MINISTÉRIO DA SAÚDE. Departamento de Ciência e Tecnologia. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Doenças negligenciadas:estratégias do Ministério da Saúde. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 200-202, 2010.
- ² PONTES, F.; Doenças negligenciadas, **Inovação em Pauta**, pag. 69-73
- ³ AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 28, de 4 de abril de 2007.
- ⁴ Agencia Nacional de Vigilância Sanitária; Informe Técnico - nº 35 de 19 de junho de 2008.
- ⁵ ARGOLO A. M.; FÉLIX M.; PACHECO R.; JANE C.; **Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil, FIOCRUZ** - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro: editora Império Novo Milênio, p. 10-63, 2008.
- ⁶ DINIZ F.B.; UETA R. R.; PEDROSA A. M. C.; AREIAS M. C.; PEREIRA V. R. A.; SILVA E. D.; SILVA J. G.; FERREIRA A. G. P.; GOMES Y. M.; Impedimetric evaluation for diagnosis of Chagas' disease: antigen/antibody interactions on metallic electrodes, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, p.79-84, 2003.
- ⁷ LOWINSOHN D.; BERTOTTI M.; Sensores Eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Química Nova**, v. 29, 1318-1325, 2006.
- ⁸ ALFAYA A. A. S.; KUBOTA L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 25, p. 835-841, 2002.
- ⁹ TICIANELLI E. A.; GONZALES E. R.; **Eletroquímica: Princípios e Aplicações**. EdUSP, v. 17, 1998

-
- ¹⁰ WINQUIST F.; Voltammetric electronic tongues – basic principles and applications. **Microchimica Acta**. p. 3-10. 2008.
- ¹¹ MEDEIROS E. S., OLIVEIRA, J. E., N. COONSOLIN FILHO, . PATERNO, L. G., MATTOSO H. C. Uso de Polímeros Condutores em Sensores. Parte 2: Aplicações em Sensores, **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.7. p. 144–158, 2012
- ¹² RICARDI, C. dos S.; COSTA, P. I. da ; YAMANAKA H. Imunossensor Amperométrico. **Química Nova**, v.25, p.316-320, 2002.
- ¹³ SOUZA M. de F. B.; Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Química Nova**, v. 20, p. 191-195, 1997
- ¹⁴ FREIRE R. S.; PESSOA C. A.; KUBOTA L. T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química. Nova**, v. 26, p. 381-389, 2003.
- ¹⁵ PEREIRA A. C.; SANTOS A. de S.; KUBOTA L. T.; Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química. Nova**, v. 25, p. 1012-1021, 2002.
- ¹⁶ REILLYA T. A.; LEE, T. C.; Biosensors, **Bioelectronics**, v. 19, p. 285–293, 2011.
- ¹⁷ CHAUHAN S.; RAI V.; SINGH H. B.; Biosensors, **Resonance**, v. 9, p.33, 2004.
- ¹⁸ GIL E. de S.; KUBOTA L. T.; YAMAMOTO Y. I.; Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica. **Química Nova**, v. 22, p.874-88, 1999.
- ¹⁹ GALAMBECK, A. **Aplicação da Técnica de Decomposição dos Precursores Metalorgânicos (MOD) à Obtenção de Filmes Finos de Óxidos e Heteroestruturas Planares Óxido Polímero Condutor. Tese de doutorado, UNICAMP, Campinas, SP, 1998.**

-
- ²⁰ ILER, R.; Multilayers of Colloidal particles. **Journal of Colloid and Interface, Science**, v.21, p. 564-594, 1966.
- ²¹ PATERNO, L. G.; MATTOSO, L. H. C.; OLIVEIRA, O. N. Filmes Poliméricos Ultrafinos Produzidos Pela Técnica de Automontagem: Preparação, Propriedades e Aplicações. **Química Nova**, v. 27, p. 661-663, 2004.
- ²² STRIXINO F. T.; PEREIRA E.; LOPES L. R. C.; Desenvolvimento de um sistema automontado para a fabricação de filmes automontados. **Química Nova**, v.. 27, p. 661-663, 2004.
- ²³ DECHER G.; HONG J. D.; SCHMITT J.; Build of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. **Thin Solid Films**, v. 21, p. 831-835, 1992.
- ²⁴ CRESPILO F. N.; ZUCOLOTO V.; OLIVEIRA O. N. Jr.; NART F. C.; Electrochemistry of Layer-by-Layer Films: a review. **Electrochemistry Science**, v. 1, p.194-214, 2006.
- ²⁵ ZULCOLLOTO, V. **Compostos Poliméricos Nanoestruturados de Azocorantes, Ftalocianinas e Polímeros Luminescentes**. Tese de doutorado UFSC, São Carlos, 2003.
- ²⁶ STOCKTON, W. B.; RUBNER, M. F.; Molecular-Level Processing of Conjugated Polymers. 4. Layer by Layer Manipulation of Polyaniline via Hydrogen-Bonding Interactions. **Macromolecules**, v.30, p. 2717-2725, 1997.
- ²⁷ OU C.; YUAN R.; CHAI Y.; TANG M.; CHAI R.; HE X.; A novel amperometric immunosensor based on layer-by-layer assembly of gold nanoparticles–multi-walled carbon nanotubes–thionine multilayer films on polyelectrolyte surface. **Analytica Chimica Acta** 603, p.205–213, 2007

-
- ²⁸ CHAI R.; YUAN R.; CHAI Y.; OU C.; CAO S.; LI X.; Amperometric immunosensors based on layer-by-layer assembly of gold nanoparticles and methylene blue on thiourea modified glassy carbon electrode for determination of human chorionic gonadotrophin. **Talanta** p.1330–1336, 2008
- ²⁹ PING L.; Ligen M.; Ruo Y.; Yaquin C.; SHIHONG C.; A novel immunosensor for carcinoembryonic antigen based on poly(diallyldimethylammonium chloride) protecte prussian blue nanoparticles and double-layer nanometer-sized gold particles. **Microchim Acta**, p.297–304, 2010.
- ³⁰ DUTTA, J., Hofmann. Nanomaterials. Swiss Federal Intitute of Technology, 2003.
- ³¹ CRESPILO F. N.; GHICA M. E.; ZUCOLOTTTOV.; NART F.C.; OLIVEIRA Jr. O. N.; BRETT C. M. A.; Electroactive Nanostructured Membranes ENM): Synthesis and Electrochemical Properties of Redox Mediator- Modified Gold Nanoparticles Using a Dendrimer Layer-by-Layer Approach. **Electroanalysis**, v. 9, p. 805-812, 2007.
- ³² LI, D., JIANG, Y., ZHIMING, W., CHEN, X., Li, Y., Sens. Actuators B, v.66, p.125, 2000.
- ³³ SANTOS V. dos; JESUS C. G. de; SANTOS M. dos; CANESTRARO C. D.; ZUCOLOTTTO V.; FUJIWARA S. T.; GARCIA J. R.; PESSOA C. A.; WOHNATH K.; Platinum nanoparticles incorporated in silsesquioxane for use in LbL films for the simultaneous detection of dopamine and ascorbic acid. **J Nanopart Res**, p. 1-11, 2012.
- ³⁴ GUSHIKEM, Y., BENVENUTTI, E.V., KHOLIN, Y. V.; Synthesis and applications of functionalized silsesquioxane polymers attached to organic and inorganic matrices. **Pure Appl. Chem.**, v. 80, p. 1593–1611, 2008.
- ³⁵ JESUS C. G. de; FORTE C. M. S.; WOHNATH K.; PESSOA C. A.; SOARES J. E. de; FUJIWARA S. T.; NETO P. DE L.; CORREIA A. N.; Electroanalytical

Performance of (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc) 5LbL Film for Detecting Promethazine Hydrochloride. **Electroanalysis**, v. 23, p. 1814–1820, 2011.

³⁶ ALFAYA, R.V. S., GUSHIKEM, Y., Aluminum oxide coated cellulose fibers modified with n-propylpyridinium silsesquioxane polymer. Preparation, characterization and absorption of some metal halides from ethanol solution. **J. Colloid Interface Science**. v.313, p. 438-444, 1999

³⁷ FUJIWARA, S. T; PESSOA, C. A.; GUSHIKEM, Y.; Cooper (II) tetrasulphophthalocyanine in propylpyridinium silsesquioxane polymer immobilized on a SiO₃/Al₂O₃ surface: use for eletrochemical oxidation of ascorbic acid. **Analytical Letters**, v.35, p.1117-1134, 2002.

³⁸ MUXEL A. A.,et. al.; Silsesquioxane 3-n-Propylpyridinium Chloride: a New Polymer for the Potentiometric Analysis of Cr(VI) in Electroplating and Leather Industry Waste. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 18, p. 572-576, 2007.

³⁹ GEMA, M., TARAZONA, M. P., SAIZ, E.; Solution properties of poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDDA). **Polymer**, v. 46, p. 2584–2594, 2005

⁴⁰ CHEN, H., et. al., ;One-step preparation and characterization of PDDA-protected gold nanoparticles. **Polymer**, v. 47, p. 763–766, 2006.

⁴¹ GIZELI E.; LOWE C. R.; Immunosensors. *Current Opinion in Biotechnology*, v.7, p. 66–71, 1996.

⁴² RICCIA F., ADORMETTO G.; PALLESCHI G.; A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. **Electrochimica Acta** , p.74–83, 2012.

⁴³ FERREIRA, A. A. P., et. al. ; Immunosensor for the diagnosis of Chagas' disease **Biosensors and Bioelectronics** v. 21, p. 175–181, 2005.

-
- ⁴⁴ FOGUEL M. V.; Amperometric Immunosensor for Chagas Disease Using Gold CD-R Transducer. **Electroanalysis**, v.23, p. 2555 – 2561, 2011.
- ⁴⁵ FERREIRA A. A. P. et. al.; Investigation of the interaction between Tc85-11 protein and antibody anti-*T. cruzi* by AFM and amperometric measurements. **Electrochimica Acta, Bioelectrochemistry** v. 51, p. 5046–5052, 2006.
- ⁴⁶ SKOOG D. A.; WEST D. M.; HOOLER F. L.; Analytical Chemistry, 7ed., Saunders College Publishing, 1996.
- ⁴⁷ LIZ-MARZÁN L.M.; Nanometals: Formation and Color. **Mater**, p. 26- 31, 2004.
- ⁴⁸ BARD A. J.; FAUKNER L. R.; **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. New York: John Wiley & Sons, 1980.
- ⁴⁹ HONG T. K.; KIM B. S.; LEE D. W.; CHOI H. J.; SHIN H. S.; Transparent Flexible Conducting Hybrid Multilayer Tgin Films of Multiwalled Carbon Nanotubes with Graphene Nanosheets. **Acsnano**, v.4, p. 3861-3868, 2010.
- ⁵⁰ RIBEIRO, B. T., LIMA, J. M., CURI, N., OLIVEIRA, G. C. P., LIMA, L. T.: Cargas superficiais da fração argila de solos influenciadas pela vizinhança e fósforo. **Química Nova**, v. 34, p. 5-10, 2011.
- ⁵¹ SOARES, V. F.; **Dispersão e estabilização de partículas submicrométricas de óxido de alumínio em sistemas líquidos destinados à produção de materiais refratários**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. 2009
- ⁵² BRETT A. M. O.; BRETT C. M. A.; Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações, **Oxford University Press**, v.5, p. 191-210. 416-418, 1996.

-
- ⁵³ DAMOS F. S.; MENDES R. K.; KUBOTA L. T., Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**, v.27, p. 970-979. 2004
- ⁵⁴ ORAZEM M. E.; TRIBOLLET B.; **Espectroscopia de impedância eletroquímica**. editora Wiley, Hoboken, NJ, série: A série eletroquímica Sociedade. 2008.
- ⁵⁵ SANTANA H. de; ZAIA D. A. M.; Preparação e Caracterização de substratos SERS ativos: Um estudo da adsorção do cristal violeta sobre nanopartículas de prata. **Química Nova**, v. 29, p.194-199, 2006.
- ⁵⁶ LIU W.C.; YANG C.C.; CHEN W.C.; DAI B.T.; TSAI M.S.; The structural transformation and properties of spin-on poly(silsesquioxane) films by thermal curing. **J Non-Cryst Solids**, 311, p. 233–240, 2002.
- ⁵⁷ HANDKE M.; KOWALEWSKA A.; Siloxane and silsesquioxane molecules - Precursors for silicate materials. **Spectrochimica Acta**, Part A v. 79, p. 749– 757, 2011.
- ⁵⁸ FUJIWARA, T. S., **Filme fino do polieletrólito Cloreto de 3-n-Propil-Piridíneo Silsesquioxano sobre SiO₂/Al₂O₃: Preparação, Caracterização e Aplicação**. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, SP, 2002.
- ⁵⁹ CRESPILO F. N.; HUNGUENIN F.; ZUCOLOTO V.; OLIVI P.; NART F. C.; OLIVEIRA O. N. Jr.; Dendrimers as nanoreactors to produce platinum nanoparticles embedded in layer-by-layer films for methanol-tolerant cathodes. **Electrochem Commun** v. 8, p. 348–352, 2006
- ⁶⁰ CRESPILO, F.N., LOST, R. M. , TRAVAIN, S. A., OLIVEIRA, O. N., ZUCOLOTO, V. Enzyme immobilization on Ag nanoparticles/polyaniline nanocomposites, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24 p. 3073–3077, 2009.