

// RICARDO ADRIANO DORLEDO DE FARIA

// DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 218

// 2017 //

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 218

ESTUDO PARA O DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO NÃO MARCADO PARA
DETECÇÃO DE VENENO OFÍDICO

AUTOR: RICARDO ADRIANO DORLEDO DE FARIA
ORIENTADOR: DR. TULIO MATENCIO
CO-ORIENTADORES: DR. LUIZ GUILHERME DIAS HENEINE
DRA. VANESSA DE FREITAS DE CUNHA LINS

ANO 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Estudo para o desenvolvimento de biossensor
impedimétrico não marcado para detecção de veneno
ofídico

Ricardo Adriano Dorledo de Faria

BELO HORIZONTE

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Ricardo Adriano Dorledo de Faria

Estudo para o desenvolvimento de biossensor
impedimétrico não marcado para detecção de veneno
ofídico

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Tulio Matencio
Co-orientadores: Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine
Dra. Vanessa de Freitas Cunha Lins

BELO HORIZONTE

2017

F224e

Faria, Ricardo Adriano Dorledo de.

Estudo para o desenvolvimento de biossensor impedimétrico não marcado para detecção de veneno ofídico [manuscrito] / Ricardo Adriano Dorledo de Faria. - 2017.

146 f., enc.: il.

Orientador: Tulio Matencio.

Coorientadores: Luiz Guilherme Dias Heneine, Vanessa de Freitas Cunha Lins.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Bibliografia: f. 135-146.

1. Engenharia química - Teses. 2. Cobra venenosa - Veneno - Teses. 3. Dióxido de titânio - Teses. 4. Espectroscopia de impedância - Teses. I. Matencio, Tulio. II. Heneine, Luiz Guilherme Dias. III. Lins, Vanessa de Freitas Cunha. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. V. Título.

CDU: 66.0(043)

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Pai eterno e amigo, porque me deu a vida e me instruiu sempre na retidão, honrando meus esforços e me amparando a cada momento difícil. Que meu trabalho nunca atravesse os ensinamentos cristãos que me foram passados e possa sempre servir ao irmão para o desenvolvimento de uma sociedade mais justa e digna.

Ao meu orientador, professor Dr. Tulio Matencio por todo o ensinamento de Eletroquímica transmitido, pelo carinho da convivência neste período e pela liberdade que me deu para conduzir esta pesquisa, confiando bastante em meu trabalho.

Ao meu co-orientador, Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine, que desempenhou papel muito maior que de um orientador neste Mestrado e, sobretudo, na minha vida profissional desde a Iniciação Científica. Sou muitíssimo grato por tudo que fez e faz por mim e espero retribuir à altura sempre, com toda a dedicação intelectual e técnica que com você aprendi. Obrigado pelo privilégio da sua orientação, pelas inúmeras discussões de resultados pelas madrugadas, finais de semana e feriados.

À minha co-orientadora, professora Dra. Vanessa de Freitas Cunha Lins por me ceder o espaço de trabalho no Laboratório de Corrosão e Engenharia de Superfície, onde obtive maior parte dos meus resultados, e por toda a ajuda dispensada ao longo do curso.

À minha família por entender minha ausência ao longo deste período sem qualquer cobrança, por acreditar no potencial que eu mesmo desconheço de mim e por dividir comigo a alegria desta tão sonhada conquista.

À minha namorada Ana Luiza por estar ao meu lado durante todo este tempo, por respeitar minha distância e por cobrir com amor minhas marcas de cansaço vindas de tanto trabalho.

Aos alunos de Iniciação Científica, Túlio Franco Anacleto, Pedro Henrique Cabral de Souza, Gabriel Tadeu Jacintho e Henrique Assis Fonseca de Almeida pelo auxílio dispensado nesta pesquisa.

Ao professor Dr. Manuel Noel Paul Georges Houmard, por me ensinar a técnica de Sol-gel, por me ajudar na obtenção do filme de TiO_2 e por sempre se colocar à disposição para sanar minhas dúvidas.

Ao meu tio Pedro Adriano de Faria, pela ajuda na preparação dos substratos de TiO_2 e pelas afetuosas palavras de carinho.

À professora Dra. Andréia Bicalho Henriques, do Departamento de Engenharia de Minas, por ceder todo o apoio necessário para realização do ensaio de Difração de Raios-X.

Aos técnicos Breno e Jéssica do Centro de Microscopia da UFMG por conduzirem as análises de MEV e AFM.

Aos funcionários da FUNED, Giancarlo Ubaldo Nappi e Thiago Xavier Teixeira de Carvalho pela colaboração nos ensaios imunológicos e por auxiliarem na obtenção dos anticorpos utilizados neste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Corrosão e Engenharia de Superfície pelo convívio durante esses anos e por toda ajuda indireta que me deram para executar o meu trabalho, em especial à Dra. Renata Braga Soares, pela presença na banca de Defesa de Mestrado e pelos inúmeros auxílios prestados para o desenvolvimento do meu trabalho e carreira.

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

“Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu, é sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu”

Ana Vilela

RESUMO

Os acidentes ofídicos representam grave problema de saúde pública em função da frequência e a gravidade com que ocorrem em todo o planeta, sendo a soroterapia a única forma aprovada de tratamento de pacientes envenenados. No entanto, a administração do soro correto no paciente acometido pelo veneno ofídico é realizada ainda por técnicas bastante inconsistentes. Neste sentido, esta pesquisa propôs o estudo do desenvolvimento de biossensores para a detecção analítica e específica de veneno de serpentes de *Bothrops*, gênero responsável pela majoritária ocorrência de acidentes ofídicos no Brasil. Assim, foram avaliados o emprego de diferentes substratos transdutores para a o desenvolvimento do imunodiagnóstico, produzindo-se Polianilina (PANI) e dióxido de titânio, e obtendo-se comercialmente os substratos de óxido de índio dopado com estanho, aço Crofer 22 APU e ouro, que foram caracterizados por técnicas eletroquímicas, espectroscópicas e de microscopia. Para a funcionalização destes substratos, anticorpos foram purificados por Cromatografia de Imunoafinidade a partir de plasma de cavalo hiperimunizado contra um pool dos venenos *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*, e apresentaram alta pureza revelada pela técnica de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida. Os anticorpos obtidos foram empregados como elemento de reconhecimento biológico sobre a superfície dos transdutores e os biossensores produzidos foram avaliados quanto à sensibilidade e especificidade de detecção de veneno botrópico utilizando a técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica, numa faixa de frequência de 10^4 a 10^{-2} Hz, com amplitude de potencial de 10 mV a partir do potencial de circuito aberto. Os resultados indicaram a eficácia da produção de PANI e TiO_2 , o sucesso da funcionalização de todos os transdutores e a capacidade de detectarem o analito de interesse com um tempo médio de diagnóstico de 36,58 minutos. A PANI apresentou a maior sensibilidade analítica (com limite de detecção menor que $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e alta especificidade, não gerando resposta impedimétrica significativa quando exposta aos venenos de serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Micrurus*.

Palavras-chave: Biossensor, Veneno ofídico, Impedância, Polianilina, Dióxido de Titânio, Aço Crofer 22 APU, Óxido de Índio dopado com Estanho, Ouro.

ABSTRACT

Snakebites represent a serious public health problem due to the frequency and severity of the accidents all over the world, and serotherapy is the only approved treatment for envenomed patients. However, the right serum management to the snakebite patient is still performed using inconsistent techniques. In this sense, this research purposed the study of biosensors development for analytical and specific detection of *Bothrops* snakes venom, genus responsible for the major occurrence of snakebites in Brazil. Thus, the employment of different transducer substrates was evaluated for the immunodiagnosis development, producing Polyaniline (PANI) and titanium dioxide, and commercially obtaining substrates of tin-doped indium oxide, Crofer 22 APU steel and gold, which were characterized by electrochemical, spectroscopic and microscopic techniques. To functionalize these substrates, Immunoaffinity Chromatography was used to purify antibodies from plasma of horse immunized against a pool of venoms from *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*, whose purity was revealed by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. The obtained antibodies were employed as element of biological recognition onto the transducers' surface and the produced biosensors were evaluated for their sensibility and specificity for detection of bothropic venom, using Electrochemical Impedance Spectroscopy, in a frequency range of 10^4 a 10^{-2} Hz, with a potential amplitude of 10 mV above the open circuit potential. The results indicated the efficacy of PANI and TiO_2 production, the success of the transducers functionalizing and their capability to detect the analyte of interest in an average time of 36.58 minutes. PANI showed the greatest analytical sensibility (with a minimum limit detection lower than $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and a high specificity, not generating a significant impedimetric response when it was exposed to venom from snakes of *Crotalus* and *Micrurus* genera.

Keywords: Biosensor, Snake venom, Impedance, Polyaniline, Titanium dioxide, Crofer 22 APU steel, Tin-doped Indium Oxide, Gold.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	23
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1 Ofidismo	24
3.2 Biossensores.....	30
3.3 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica	36
3.3.1 Generalidades	36
3.3.2 Circuito elétrico equivalente	40
3.3.3 Representações gráficas da EIE.....	42
4 METODOLOGIA.....	45
4.1 Obtenção de anticorpos para utilização nos biossensores	45
4.1.1 Purificação de anticorpos antibotrópicos	45
4.1.2 Caracterização dos anticorpos obtidos por Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	47
4.2 Obtenção e caracterização dos substratos transdutores para aplicação nos biossensores.....	48
4.2.1 Síntese e caracterização do substrato de Polianilina.....	49
4.2.2 Síntese e caracterização do substrato de TiO ₂	51
4.2.3 Preparo e caracterização do substrato de ouro	53
4.2.4 Funcionalização dos substratos transdutores	55
4.3 Caracterização dos substratos funcionalizados e monitoramento eletroquímico das etapas de funcionalização	56

4.4 Construção dos biossensores e análise por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica	59
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
5.1 Purificação dos anticorpos antibotrópicos a partir de plasma equino.....	63
5.2 Biossensor de TiO ₂	65
5.3 Biossensor de ITO	79
5.4 Biossensor de aço Crofer 22 APU	94
5.5 Biossensor de Polianilina	101
5.6 Biossensor de Ouro	119
5.7 Análise do tempo de diagnóstico	131
6 CONCLUSÕES	133
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	135
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática dos componentes de um imunossensor	21
Figura 2 – Serpentes do gênero <i>Bothrops</i> : (A) <i>B. alternatus</i> ; (B) <i>B. jararaca</i> ; (C) <i>B. jararacussu</i> ; (D) <i>B. moojeni</i> ; (E) <i>B. neuwiedi</i>	26
Figura 3 – Representação esquemática do aparato experimental utilizado na EIE ..	37
Figura 4 – Resposta senoidal de corrente elétrica frente à uma perturbação de potencial.....	38
Figura 5 – Representação da impedância no plano vetorial em coordenadas retangulares e polares.....	40
Figura 6 – Circuito elétrico equivalente de Randles (a) simples; (b) com reação faradaica causando o surgimento de Z_f ; (c) considerando os fenômenos difusivos, representados por Z_w	41
Figura 7 – Configuração da interação entre antígeno e anticorpo na interface eletrodo-eletrólito.....	42
Figura 8 – Perfil gráfico do Diagrama de Nyquist.....	43
Figura 9 – Perfil gráfico do Diagrama de Bode por módulo da impedância	44
Figura 10 – Perfil gráfico do Diagrama de Bode por ângulo de fase.....	44
Figura 11 – Curva padrão de voltametria cíclica para uma solução contendo o par redox $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$	54
Figura 12 – Arranjo experimental da célula eletroquímica para os testes de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	60
Figura 13 – Arranjo experimental da microcélula eletroquímica para os testes de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	61
Figura 14 – Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE das amostras de anticorpos purificados(A) e plasma de cavalo hiperimunizado contra veneno de <i>Bothrops</i> (B)..	63
Figura 15 – Histograma da área eletroativa dos substratos transdutores empregados no desenvolvimento dos imunossensores e ampliação representando valores de área eletroativa até $9,0 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$ para os mesmos materiais	64

Figura 16 – Produção de TiO ₂ pelo método sol-gel: (A) substrato de Si; (B) substrato após emersão na solução precursora; (C) substrato após aquecimento a 100°C por 15 minutos e (D) substrato após aquecimento a 500°C por 2 horas	65
Figura 17 – DRX da amostra AM160237 (substrato + TiO ₂ / pontual / normal).....	66
Figura 18 – DRX ampliado da amostra AM160237 até ângulo de 60°	67
Figura 19 – DRX da amostra AM160238 (substrato + TiO ₂ / área / normal).....	68
Figura 20 – DRX ampliado da amostra AM160238 até ângulo de 65°	68
Figura 21 – DRX da amostra AM160239 (substrato + TiO ₂ / área / filme).....	69
Figura 22 – DRX da amostra AM160240 (substrato + TiO ₂ / pontual / filme)	70
Figura 23 – DRX da amostra AM160241 (substrato puro / pontual / filme)	71
Figura 24 – DRX da amostra AM160242 (substrato puro / pontual / normal).....	72
Figura 25 – DRX ampliado da amostra AM160242 até ângulo de 60°	72
Figura 26 – Monitoramento impedimétrico das etapas de funcionalização do substrato de TiO ₂ e ampliação para impedâncias real e imaginária até 3,0 x 10 ⁷ ohm.cm ²	73
Figura 27 – Perfil voltamétrico do TiO ₂ em meio eletrolítico com e sem par redox ...	74
Figura 28 – Monitoramento voltamétrico das etapas de funcionalização do substrato de TiO ₂	75
Figura 29 – Diagrama de Nyquist do biossensor de TiO ₂ frente a veneno botrópico nas concentrações de 0,1; 1; 2; 5 e 10 µg.mL ⁻¹ e ampliação do semicírculo a altas frequências.....	76
Figura 30 – Circuito equivalente proposto para a simulação dos resultados do biossensor de TiO ₂	76
Figura 31 – Variação das resistências à transferência de carga R _{tc1} e R _{tc2} para o biossensor de TiO ₂ exposto a veneno botrópico nas concentrações de 0,1; 1; 2; 5 e 10 µg.mL ⁻¹	78
Figura 32 – Imagem de Microscopia de Força Atômica do substrato de ITO.....	79

Figura 33 – Imagem de Microscopia de Força Atômica do substrato de ITO funcionalizado contendo veneno botrópico e região de risco induzido para cálculo da espessura da camada de funcionalização e veneno.....	80
Figura 34 – Perfil voltamétrico do ITO em meio eletrolítico com e sem par redox	81
Figura 35 – Monitoramento voltamétrico das etapas de funcionalização do substrato de ITO	82
Figura 36 – Monitoramento impedimétrico das etapas de funcionalização do substrato de ITO.....	83
Figura 37 – Diagrama de Nyquist do biossensor de ITO frente ao veneno botrópico nas concentrações de 1 e 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	84
Figura 38 – Diagrama de Nyquist do biossensor de ITO frente ao veneno botrópico nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	85
Figura 39 – Diagrama de Nyquist do biossensor de ITO frente ao veneno crotálico nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	86
Figura 40 – Variação da resistência à transferência de carga (R_{tc}) do sensor botrópico de ITO frente aos venenos de <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus</i> nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	87
Figura 41 – Variação da resistência à transferência de carga do biossensor de ITO frente às concentrações de 1, 2, 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do veneno homólogo, com triplicata em “A”, “B” e “C”, e média em “D”	88
Figura 42 – Diagrama de Nyquist do biossensor de ITO frente a veneno heterólogo de <i>Crotalus</i> nas concentrações de 1, 2, 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	90
Figura 43 – Diagrama de Bode do biossensor de ITO frente a veneno heterólogo de <i>Crotalus</i> nas concentrações de 1, 2, 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	91
Figura 43 – Comparação da variação da resistência à transferência de carga do biossensor de ITO frente às concentrações de 1, 2, 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dos venenos homólogo e heterólogo.....	92
Figura 44 – Monitoramento impedimétrico das etapas de funcionalização do substrato de aço Crofer 22 APU.....	94

Figura 45 – Monitoramento voltamétrico das etapas de funcionalização do substrato de aço Crofer 22 APU	95
Figura 46 – Diagrama de Nyquist do biossensor de aço Crofer 22 APU frente a veneno botrópico na concentração de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	95
Figura 47 – Diagrama de Nyquist do biossensor de aço Crofer 22 APU frente a veneno botrópico nas concentrações de 0,1; 1; 2; 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	96
Figura 48 – Diagrama de Nyquist do biossensor de aço Crofer 22 APU frente a veneno crotálico nas concentrações de 0,1; 1; 2; 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	98
Figura 49 – Diagrama de Nyquist do biossensor de aço Crofer 22 APU frente a veneno elapídico nas concentrações de 0,1; 1; 2; 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	99
Figura 50 – Variação da Resistência à transferência de carga (ΔR_{tc}) do biossensor de aço Crofer com substrato de aço Crofer 22 APU diante de diferentes concentrações dos venenos de <i>Bothrops</i> , <i>Crotalus</i> e <i>Micrurus</i>	100
Figura 51 – Substrato de Crofer antes (A) e após (B) eletrodeposição de PANI	101
Figura 52 – Imagens de microscopia óptica do substrato de Crofer antes (A) e após (B) a eletrodeposição (ampliação de 100x)	102
Figura 53 – Voltamograma cíclico da Polianilina eletrodepositada no substrato de aço Crofer.....	102
Figura 54 – Diagrama de Nyquist por impedância da Polianilina eletrodepositada no substrato de Crofer e ampliação da região de impedâncias real e imaginária até $1,0 \times 10^3 \text{ ohm.cm}^2$	105
Figura 55 – Monitoramento impedimétrico das etapas de funcionalização do substrato de PANI	106
Figura 56 – Perfil voltamétrico da PANI em meio eletrolítico com e sem par redox	107
Figura 57 – Monitoramento voltamétrico das etapas de funcionalização do substrato de PANI.....	108
Figura 58 – MEV da amostra de aço Crofer 22 APU (ampliação de 100.000x)	109
Figura 59 – Imagens de MEV da amostra de PANI depositada sobre aço Crofer 22 APU (ampliação de 100.000x).....	109

Figura 60 – MEV da amostra de PANI funcionalizada para aplicação como biossensor (ampliação de 60.000x).....	110
Figura 61 – MEV da amostra de biossensor de PANI contendo veneno de <i>Bothrops</i> 20 µg.mL ⁻¹ (ampliação de 10.000x).....	111
Figura 62 – MEV da amostra de biossensor de PANI contendo veneno de <i>Bothrops</i> 20 µg.mL ⁻¹ (ampliação de 60.000x).....	111
Figura 63 – Diagrama de Bode para o Espectro de Impedância do biossensor de PANI e seu ajuste ao circuito equivalente de Randles.....	112
Figura 64 – Diagrama de Nyquist do biossensor de PANI frente a veneno botrópico nas concentrações de 0,1; 1; 2; 5 e 10 µg.mL ⁻¹	113
Figura 65 – Diagrama de Nyquist do biossensor de PANI frente a veneno crotálico nas concentrações de 0,1; 1; 2; 5 e 10 µg.mL ⁻¹	115
Figura 66 – Diagrama de Nyquist do biossensor de PANI frente a veneno elapídico nas concentrações de 0,1; 1; 2; 5 e 10 µg.mL ⁻¹	116
Figura 67 – Variação da Resistência à transferência de carga (ΔR_{tc}) do biossensor de PANI diante de diferentes concentrações dos venenos de <i>Bothrops</i> , <i>Crotalus</i> e <i>Micrurus</i>	117
Figura 68 – Regressão linear para a variação da resistência à transferência de carga do sensor de PANI exposto a veneno botrópico em diferentes concentrações.....	118
Figura 69 – Voltamograma cíclico (10 ciclos) do substrato de ouro imerso em solução de H ₂ SO ₄ 0,1M.....	120
Figura 70 – Voltamograma cíclico (10 ciclos) do substrato de ouro antes da limpeza eletroquímica em solução de KCl 0,1 M + [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 5 mM.....	121
Figura 71 – Voltamograma cíclico (10 ciclos) do substrato de ouro em solução de KCl 0,1 M + [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 5 mM após duas limpezas eletroquímicas em ácido sulfúrico.....	121
Figura 72 – Monitoramento piezoelétrico das etapas de funcionalização do substrato de ouro usando glutaraldeído 0,1%.....	123
Figura 73 – Possibilidade 1: ligação de uma molécula de glutaraldeído a duas moléculas de APTES.....	124

Figura 74 – Possibilidade 2: ligação de uma molécula de glutaraldeído a cada uma molécula de APTES	124
Figura 75 – Monitoramento piezoelétrico das etapas de funcionalização do substrato de ouro usando glutaraldeído 1%.....	125
Figura 76 – Diagrama de Nyquist do biossensor de ouro frente a veneno de <i>Bothrops</i> nas concentrações de 0,1; 1; 2; 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	127
Figura 77 – Variação da resistência à transferência de carga do biossensor de ouro frente às concentrações de 1, 2, 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do veneno homólogo.....	128
Figura 78 – Diagrama de Nyquist do biossensor de ouro frente a veneno de <i>Bothrops</i> nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	129
Figura 79 – Variação da resistência à transferência de carga do biossensor de ouro frente às concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do veneno homólogo..	130
Figura 80 – Diagrama de Bode do biossensor de PANI frente a diferentes concentrações de veneno botrópico e ampliação da região de baixas frequências (0,1 – 0,02 Hz).....	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre a incidência e mortalidade de acidentes ofídicos e de outras doenças tropicais negligenciadas constantes na lista da OMS	19
Tabela 2 – Atividade fisiopatológica dos venenos ofídicos e efeitos locais e sistêmicos relacionados	25
Tabela 3 – Relação entre processos físicos e o correspondente elemento de circuito	41
Tabela 4 – Composição química (%m) do aço Crofer 22 APU	48
Tabela 5 – Parâmetros do circuito equivalente simulado para o biossensor de TiO ₂ na ausência e presença de venenos botrópicos	77
Tabela 6 – Parâmetros do circuito equivalente simulado para o biossensor de aço Crofer na ausência e presença de venenos botrópicos	97
Tabela 7 – Parâmetros do circuito equivalente simulado para o biossensor de aço Crofer na ausência e presença de venenos crotálicos.....	98
Tabela 8 – Parâmetros do circuito equivalente simulado para o biossensor de aço Crofer na ausência e presença de venenos elapídicos.....	99
Tabela 9 – Parâmetros do circuito equivalente simulado para o biossensor de PANI na ausência e presença de venenos botrópicos	114
Tabela 10 – Parâmetros do circuito equivalente simulado para o biossensor de PANI na ausência e presença de venenos crotálicos.....	115
Tabela 11 – Parâmetros do circuito equivalente simulado para o biossensor de PANI na ausência e presença de venenos elapídicos.....	116

1 INTRODUÇÃO

Os acidentes ofídicos constituem um sério problema de saúde pública, pois são presente risco ocupacional e perigo ambiental para diversas regiões no mundo, especialmente na África, Ásia e América Latina (WILLIAMS *et al.*, 2010).

Como a malária, dengue, tuberculose e tantas outras, os casos de picada de cobra são muito constantes, sobretudo nas comunidades mundiais mais pobres. Entretanto, diferenciam-se dessas doenças por terem recebido pouca importância por bastante tempo, sendo incluídos na lista de doenças tropicais negligenciadas da Organização Mundial de Saúde – OMS apenas a partir do ano de 2009 (WILLIAMS *et al.*, 2010). A tabela 1 apresenta uma comparação entre os acidentes ofídicos e diversas doenças, aduzindo o número de mortes registradas em cada caso.

Tabela 1 – Comparação entre a incidência e mortalidade de acidentes ofídicos e de outras doenças tropicais negligenciadas constantes na lista da OMS (Fonte: WILLIAMS, 2010)

Doença	Incidência	Mortes
Envenenamento por picada de cobra	2.682.000	100.000
Doença de Chagas	217.000	14.000
Cólera	178.000	4.000
Febre por dengue hemorrágica	73.000	19.000
Leishmaniose	1.691.000	51.000
Encefalite japonesa	44.000	14.000
Esquistossomose	5.733.000	15.000
Febre amarela	2.100	100

No Brasil, entre os anos de 2009 e 2013, foram registrados 144.060 casos de acidente ofídico, isto é, uma média de 28.812 ocorrências por ano, sendo a maior incidência nas regiões Norte e Nordeste do país (SILVA *et al.*, 2015).

A grande ocorrência de picadas de cobra em todo o globo terrestre está associada ao fato de os ofídios se adaptarem a quase todos os tipos de ambientes e serem exclusivamente carnívoros (FUNED, 2014).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a soroterapia é a única forma de tratamento específica para os envenenamentos por picada de cobra. Os antivenenos podem prevenir ou até reverter os efeitos da picada e devem ser administrados como cuidado primário quando na ocorrência do envenenamento (WHO, 2015). Para tanto, é fundamental o correto diagnóstico acerca da serpente envolvida.

Vitoreti (2014) aponta que tal diagnóstico deve ser feito pela identificação do animal, embora isso seja difícil de ser feito de modo confiável, e que a tomada de decisão quanto ao soro a ser administrado muitas vezes tem sido feita com base no quadro clínico observado no paciente. A autora explicita também que os sintomas característicos ocasionados por alguns venenos podem demorar a aparecer, podendo ocasionar complicações na saúde do acidentado, e que há ainda a possibilidade de o acidente ter se passado com um animal não peçonhento, fato que demanda uma avaliação clínica ainda mais cuidadosa.

Diante dos apontamentos supracitados, uma alternativa analítica para o diagnóstico preciso do tipo de serpente envolvida em acidentes ofídicos é o emprego de biossensores.

Segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* – IUPAC, biossensor é um dispositivo composto por um sistema receptor e outro transdutor, que é capaz de fornecer informações analíticas usando um elemento biológico de reconhecimento (IUPAC, 1999).

Uma vez ocorrido o reconhecimento biológico, há uma alteração de uma ou mais propriedades físico-químicas do sistema, como mudança de pH, variação de massa e transferência de elétrons, que é detectada pelo aparato transdutor (FURTADO *et al.*, 2008). Esse fenômeno bioquímico é de grande importância pois determina o alto grau de seletividade em relação ao analito de interesse (IUPAC, 1999).

Entre as inúmeras outras vantagens da aplicação desses dispositivos, destacam-se: a rapidez e praticidade do método, a possibilidade de aplicação em moléculas apolares, que muitas vezes não respondem a medições por outras tecnologias, o

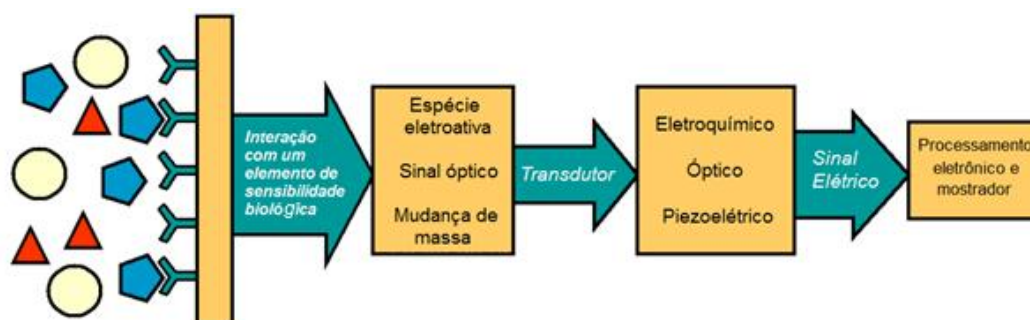
baixo custo e uso de instrumentação de pequenas dimensões (KOYUN, AHLATCIOĞLU e İPEK, 2012; DANIELS e POURMAND, 2007).

Suas aplicações têm sido investigadas em diversas áreas, tais como no controle de qualidade na produção de alimentos, controle de processos fermentativos industriais e monitoramento de poluentes orgânicos no meio ambiente (KOYUN, AHLATCIOĞLU e İPEK, 2012). Ademais, outros autores avaliaram o emprego desses sensores em outras possibilidades. Nascimento (2011) desenvolveu um biossensor para detecção de sorotipos de dengue preparando um compósito híbrido de nanopartículas de ouro-polianilina, e Landim (2014) propôs o uso de filme nanoestruturado de pirrol-2-carboxílico e nanotubos de haloisita como biossensor para detecção de níveis clínicos de troponina T cardíaca humana de maneira mais rápida, prática e segura que outros métodos comumente já utilizados.

Quanto aos tipos de biossensores, esses podem ser classificados de acordo com o tipo de transdutor que possuem ou pelo tipo de interação que nele ocorre (afinidade). No primeiro caso, enquadram-se os eletroquímicos, ópticos, piezoelétricos e termoeletrônicos, enquanto um exemplo de sensores categorizados por afinidade são aqueles de associação entre antígeno e anticorpo, isto é, os imunossensores (FURTADO *et al.*, 2008).

Moina e Ybarra (2012) definem imunossensores como dispositivos analíticos compactos onde a complexação do par antígeno-anticorpo é detectada e convertida em um sinal elétrico por intermédio de um transdutor. O esquema proposto pelos autores é representado na figura 1.

Figura 1 – Representação esquemática dos componentes de um imunossensor
(Fonte: Adaptado de MOINA e YBARRA, 2012)



Uma importante técnica empregada neste tipo de dispositivo é a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE), que se baseia na aplicação de uma perturbação elétrica contínua num sistema e sobreposição de um estímulo elétrico alternado e de baixa amplitude numa faixa de frequências. A partir disso, é possível se obter a resistência generalizada inerente ao sistema, a impedância (SILVA, 2013).

Uma vez que a impedância na interface eletrodo-solução é sensível às mudanças decorrentes da captura de um analito de interesse, então a EIE pode ser aplicada para a medição dessa variação da impedância (DANIELS e POURMAND, 2007).

Entre as principais vantagens de se usar esse método, Wolynech (2002) destaca o uso de sinais suficientemente pequenos que são incapazes de perturbar as propriedades do eletrodo e a possibilidade de obtenção da resistência de transferência de carga e da capacitância da dupla camada numa única medida.

Outra importante vantagem dos imunossaios que lançam mão da técnica de EIE, está o fato de se tratarem de imunossensores não marcados. Este tipo de sensor realiza a detecção de seu analito sem precisar de qualquer marcador, apresentando resposta direta que advém exclusivamente da interação entre os compostos já imobilizados no transdutor e a molécula a ser reconhecida, enquanto dispositivos marcados usam de moléculas fluorescentes, quimioluminescentes e nanopartículas para atacarem os componentes biológicos envolvidos na detecção (SYAHIR *et al.*, 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar materiais e métodos para o desenvolvimento de um biossensor não marcado capaz de detectar de modo específico a presença de veneno de serpentes do gênero *Bothrops*.

2.2 Objetivos específicos

Para a consolidação do objetivo geral, são objetivos específicos desta pesquisa:

- Purificação de anticorpos antitetracíclicos a partir de plasma equino hiperimunizado contra veneno de seis espécies de *Bothrops* e caracterização por eletroforese em gel de poliacrilamida;
- Produção e caracterização de Polianilina para utilização como substrato transdutor do biossensor;
- Produção de dióxido de titânio pelo método sol-gel e caracterização por Difractometria de raios-X para utilização como substrato transdutor do biossensor;
- Funcionalização dos substratos de Polianilina, TiO₂, aço Crofer 22 APU, óxido de índio dopado com estanho e ouro para utilização como biossensores;
- Monitoramento impedimétrico, voltamétrico e piezoelétrico das etapas de funcionalização dos materiais transdutores;
- Estudo da estrutura dos biossensores por Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia de Força Atômica
- Avaliação da sensibilidade dos sensores produzidos pela capacidade de reconhecimento de diferentes concentrações de analito homólogo e da especificidade dos dispositivos expondo-os a venenos heterólogos de serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Micrurus*;
- Estudo do tempo demandado para que o biossensor detecte o analito de interesse.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Ofidismo

Os acidentes ofídicos têm grande importância médica em função principalmente da grande frequência com que ocorrem e da gravidade dos casos (FUNASA, 2001). Williams *et al.* (2010) aponta que médicos têm testemunhado diariamente os diversos problemas ocasionados por esse tipo de acidente (que causa lesões, incapacidades no paciente e pode até levar a morte) em regiões diversas do mundo, mas especialmente na África, Ásia e América Latina. A região sul asiática é aquela mais afetada do globo terrestre, com registros de até 50000 mortes ao ano, embora pesquisas nas áreas rurais do Sri Lanka tenham apontado que os dados acusados pelos hospitais representam menos que a metade dos casos de acidentes ofídicos de fato ocorridos no país (ALIROL *et al.*, 2010).

Para muitas pessoas que habitam regiões bastante pobres do planeta, os acidentes envolvendo serpentes constituem um risco ocupacional sempre presente, comparados a doenças como malária, dengue e tuberculose. Embora não tenha o potencial epidêmico de doenças infecciosas causadas por vetores parasitários, a mortalidade causada por esse tipo de acidente anualmente tem sido muito maior que outras tantas doenças tropicais negligenciadas (WILLIAMS, 2010).

No Brasil, há 62 espécies conhecidas de serpentes, que são classificadas em quatro grupos: Botrópico, Crotálico, Laquélico e Elapídico (SILVA, BERNARDE e ABREU, 2015). O envenenamento é causado pela inoculação de toxinas pelo animal por meio de suas presas e pode ocasionar alterações no local da picada e alterações sistêmicas. Acidentes envolvendo serpentes não-peçonhentas ocorrem com relativa frequência, mas são considerados de menor importância médica por não serem considerados graves (BRASIL, 2005).

Os venenos ofídicos são classificados quanto às suas atividades fisiopatológicas, como consta na tabela 2 (BRASIL, 2005).

Tabela 2 – Atividade fisiopatológica dos venenos ofídicos e efeitos locais e sistêmicos relacionados

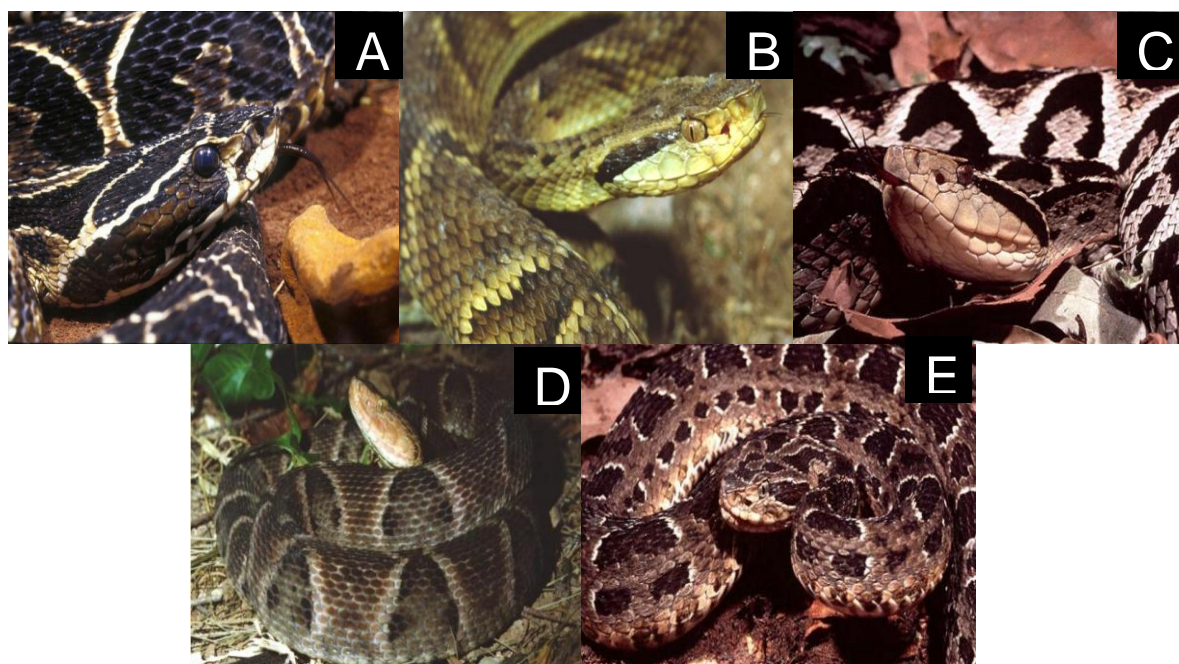
Atividade	Veneno	Efeitos
Inflamatória aguda	Botrópico e laquético	Lesão endotelial e necrose no local da picada. Liberação de mediadores inflamatórios
Coagulante	Botrópico, laquético e crotálico	Incoagulabilidade sanguínea
Hemorrágica	Botrópico e laquético	Sangramentos na região da picada (equimose) e a distância (gengivorragia, hematúria, etc)
Neurotóxica	Crotálico e elapídico	Bloqueio da junção neuromuscular (paralisia de grupos musculares)
Miotóxica	Crotálico	Rabdomiólise (mialgia generalizada, mioglobínúria)
Neurotóxica vagal	Laquético	Estimulação colinérgica (vômitos, dor abdominal, diarreia, hipotensão, choque)

Os venenos são misturas complexas compostas principalmente por proteínas (cerca de 90% do peso seco) com diversas atividades hematológicas, fisiológicas e neurotransmissoras. Em geral, apresentam baixa imunogenicidade e alta toxicidade (CAPRONI, 2009; SILVA, 2009). A susceptibilidade é universal e a gravidade do envenenamento é função da quantidade de veneno inoculado, entretanto, essa quantia é bastante variável e depende de fatores como: a espécie envolvida, seu tamanho, a eficiência da picada, se houve a penetração de uma ou duas presas e se foram repetidas picadas (BRASIL, 2005; TUN-PE *et al.*, 1991). Muitas pesquisas têm traçado o perfil mais característico das vítimas de picada de cobra, que são em sua maioria trabalhadores rurais, principalmente homens (que são acometidos com

frequência até 3 vezes maior que as mulheres, já que estão mais engajados em atividades rurais) e com idade média de 30 anos. As picadas ocorrem em 60 a 80% dos casos nos membros inferiores da vítima, como nos pés, tornozelos e pernas, e o tempo entre o acidente e o tratamento varia de 30 minutos a 15 dias, sendo que a maioria dos estudos revelou que 60% das vítimas chegam ao centro de saúde nas primeiras 6 horas posteriores ao acidente, e poucas conseguem chegar em até uma hora (ALIROL *et al.*, 2010; MENON *et al.*, 2016).

O acidente de maior importância epidemiológica no Brasil é o botrópico (serpentes deste gênero ofídico são mostradas na figura 2), representando aproximadamente 90% dos casos de envenenamento e cuja peçonha tem ações proteolíticas, coagulantes e hemorrágicas. Por esta razão, este gênero ofídico foi escolhido como principal objeto de estudo desta pesquisa

Figura 2 – Serpentes do gênero Bothrops: (A) *B. alternatus*; (B) *B. jararaca*; (C) *B. jararacussu*; (D) *B. moojeni*; (E) *B. neuwiedi*



Fonte: FUNED (2014).

Essas subespécies habitam diferentes regiões geográficas do país, abrangendo diversidade de morfologias e comportamentos, preferindo lugares secos como

pedras, vegetação rasteira e solo arenoso, o que facilita a ocorrência de acidentes em terrenos de atividade agrícola (NOGUEIRA e SAKATE, 2004).

Uma vez ocorrido o acidente, a identificação do animal causador é imprescindível, pois possibilita a dispensa de pacientes picados por serpentes não peçonhentas, fornece base de reconhecimento de espécies de interesse médico e direciona a indicação mais precisa do tipo de antiveneno a ser administrado (BRASIL, 2005).

Há uma crença bastante difundida de que as picadas de cobra estão necessariamente associadas ao envenenamento da vítima, o que não é verdade, uma vez que os acidentes com cobras não peçonhentas são bastante comuns e também porque mesmo as peçonhentas podem não inocular veneno durante o acidente (picada seca). Pesquisas conduzidas na região sul da Ásia mostraram que o envenenamento nos acidentes ofídicos ocorreu em apenas 10% dos casos no Nepal e 34% nas vítimas acometidas na Índia. No entanto, sintomas associados ao estresse e pânico traumático mimetizam aqueles que ocorrem logo após a picada, causando grande dificuldade para que os profissionais de saúde infiram corretamente sobre o fato de ter ocorrido ou não o envenenamento no paciente, situação bastante problemática, já que dada, de fato, a inoculação do veneno, ela pode rapidamente representar um risco de vida à vítima (ALIROL *et al.*, 2010).

Infelizmente, a identificação de cobras venenosas não é um procedimento simples, pois muitas serpentes inofensivas, por exemplo, aparentam ser quase idênticas a outras que são venenosas. Apenas algumas das serpentes mais conhecidas podem ser reconhecidas por suas características de tamanho, cor, forma, comportamento e som que emitem ao se sentirem ameaçadas (WHO, 2010). Mesmo quando a serpente morta é levada até o centro de saúde, sua identificação equivocada tem sido comum, pois muitos profissionais de saúde são destreinados para este procedimento. Na Índia, por exemplo, as serpentes da espécie *H. hypnale* são erroneamente e frequentemente identificadas como *E. carinatus*, o que tem levado muitas vítimas de *H. hypnale* a receberem o antiveneno inadequado, levando a um tratamento ineficaz no país (ALIROL *et al.*, 2010).

A soroterapia é a única forma de tratamento específico contra o envenenamento por acidente ofídico e está associada à capacidade de o antiveneno se ligar, extrair ou eliminar as toxinas presentes no organismo do acidentado. Esses antivenenos

(soros antiofídicos) são produzidos a partir de frações do plasma de animais imunizados, geralmente cavalos, e podem ser monovalentes ou polivalentes de acordo com o número de espécies para os quais foram produzidos. Embora o primeiro tipo seja considerado mais eficaz e preferível, soros polivalentes têm sido mais largamente utilizados em locais onde a identificação espécie-específica ainda não é possível, apesar de demandarem maiores volumes e levarem a um tempo de recuperação mais lenta. (ALIROL *et al.*, 2010; DHONG *et al.*, 2003).

Segundo Azevedo-Marques, Cupo e Hering (2003), o atual diagnóstico da serpente envolvida no acidente é presumível e se baseia na observação de sintomas do paciente ocasionados pelas atividades tóxicas do veneno, de modo que o médico, ao conhecer a composição dos tipos de veneno e seus efeitos principais, deve reconhecer o gênero da serpente que causou a picada e escolher o antídoto pertinente. O mesmo autor aduz diretrizes para o procedimento de abordagem de pacientes acidentados por cobra assumindo que a indicação do antiveneno para soroterapia deve considerar a especificidade deste em relação ao gênero do animal causador da picada, a presteza na administração, o emprego de quantidade suficiente em função de sua capacidade neutralizadora e em dose única e igual para adultos e crianças.

Vitoreti (2014) ressalta, no entanto, que geralmente o diagnóstico não é feito de maneira confiável, sendo que a espera por sintomas característicos no paciente para a administração do antiveneno pode ainda ser muito demorada. Outro inconveniente é que, em algumas partes do mundo onde são muito comuns os envenenamentos ofídicos, os habitantes são tão temerosos quanto à possibilidade de serem acometidos, que solicitam aos centros de saúde o recebimento do soro, e isso os expõe a graves riscos por reações do antiveneno ao organismo (WHO, 2010).

De modo geral, os diagnósticos podem ser divididos em clínicos ou de laboratório. No primeiro grupo, está incluída a observação de sintomas do paciente, como inchaço, formação de bolhas, necroses locais, hemorragias, etc. Já os testes de laboratório são baseados nas alterações que sofre o organismo da vítima em decorrência do envenenamento, e para eles têm sido especialmente empregados os testes imunodiagnósticos, que incluem imunodifusão, imunofluorescência, hemaglutinação, ensaios ópticos e, entre outros, o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (THEAKSTON e LAING, 2014).

Embora essas técnicas tenham revelado sucesso na identificação do veneno de determinadas serpentes, elas apresentam algumas limitações em seu emprego, seja devido à insuficiente sensibilidade, ao alto custo por demandarem equipamentos de alta performance ou mesmo em razão do longo tempo demandado para se obter o resultado (THEAKSTON e LAING, 2014). Ademais, os venenos ofídicos são relatados como um “mosaico de antígenos”, apresentando algumas espécies venenos de composição antigênica bastante parecidas.

Dessa maneira, é imprescindível que os imunodiagnósticos usem de anticorpos purificados de modo a reduzir ao máximo as possíveis reações cruzadas com antígenos comuns a mais de uma espécie. Para tanto, pesquisas relatam o uso de um único componente do veneno nestas técnicas como possível medida para reduzir tal atividade cruzada ou mesmo a utilização de anticorpos monoclonais, que, todavia, também apresentam suas desvantagens, como o fato de que podem não ser tão ávidos quanto os policlonais ou mesmo a possibilidade de não se adsorverem adequadamente sobre a superfície dos plásticos utilizados como suporte nos ensaios e, ainda, de não resistirem à adição de alguns marcadores (DHONG *et al.*, 2003).

Visando ao desenvolvimento de um método de baixa reatividade cruzada, Heneine e Catty (1993) obtiveram anticorpos altamente específicos contra o veneno de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Lachesis* passando soro de coelho previamente imunizado contra os mencionados antígenos por uma coluna de cromatografia de imunoafinidade contendo glutaraldeído insolúvel associado a venenos ofídicos heterólogos.

Theakston, Lloyd-Jones e Reid (1977) reportaram o uso de ELISA para a detecção específica do veneno de ofídios em amostras de sangue de vítimas acidentadas e desde então este tem sido o método analítico mais empregado, especialmente em virtude de sua alta sensibilidade (DHONG *et al.*, 2003). Contudo, segundo Zhao *et al.* (2014) esta técnica ainda demanda o uso de vários equipamentos e pessoal especializado, sendo necessários procedimentos ainda mais rápidos e baratos para a detecção de analitos.

Diante do exposto, justifica-se o emprego de métodos eletroanalíticos, como aqueles de que se baseiam os biossensores, como possíveis técnicas de obtenção rápida e segura para esse tipo de aplicação (VITORETI, 2014).

3.2 Biossensores

O primeiro biossensor descrito na literatura data de quando Clark e Lyons (1962) propuseram o uso de um dispositivo capaz de medir a concentração de glicose numa reação enzimática de oxidação dessa substância, sendo o consumo de gás oxigênio na reação (detectado por um eletrodo) proporcional à concentração do referido açúcar.

Biossensores são bastante requeridos em situações quando são necessários aparatos de baixo custo, passíveis de miniaturização e de obtenção rápida de resultados de alta precisão (DANIELS e POURMAND, 2007).

O reconhecimento biológico de um analito pelo sensor é transformado em sinal químico ou físico de saída, conferindo uma das mais importantes características deste dispositivo: o alto grau de seletividade. Como elemento receptor (ou biorreceptor) são comumente usados enzimas, tecidos animais e vegetais, membranas, proteínas, células, etc (IUPAC, 1999).

O transdutor é também um importante constituinte dos biossensores, sendo responsável por converter o sinal de saída do receptor em um sinal mensurável no domínio elétrico, este que, por sua vez, é proporcional à concentração do analito detectado (KOYUN, AHLATCIOĞLU e İPEK, 2012).

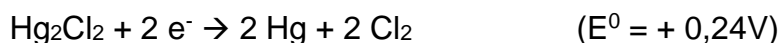
Koyun, Ahlatcioğlu e İpek (2012) apontam que nos biossensores eletroquímicos, os eletrodos são também componentes que desempenham fundamental importância na performance do dispositivo, pois afetam diretamente as suas habilidades de detecção de analito. Três são os tipos de eletrodos empregados na célula do sensor: o eletrodo de trabalho, o de referência e o contra-eletrodo. O eletrodo de trabalho é aquele onde ocorre a reação alvo de estudo, podendo ser dito anódico ou catódico se a reação que nele ocorre é de redução ou de oxidação. Usualmente os materiais empregados são ouro, prata, nanotubos de carbono, vidro recoberto por óxido de

índio dopado com estanho, entre outros. Em relação aos eletrodos de referência, são como um eletrodo padrão de hidrogênio, entretanto, como este elemento é potencialmente explosivo, são empregados outros sistemas cujo potencial de redução padrão é conhecido, tais como:

- Eletrodo de Ag/AgCl: consiste em um fio de prata revestido por cloreto de prata e imerso numa solução de cloreto de sódio. A reação que ocorre neste sistema é:



- Eletrodo de calomelano saturado: é aquele formado pelo cloreto de mercúrio (I) em solução saturada de cloreto de potássio e é baseado na seguinte reação:



Quanto ao contra-eletrodo (ou eletrodo auxiliar), este funciona como anodo quando o eletrodo de trabalho é o catodo e vice-versa. Quando uma corrente ou um potencial é fornecido ao sistema dos dois eletrodos, as outras variáveis podem ser obtidas. Usualmente são empregados materiais eletroquimicamente inertes para desempenhar esta função, tais como ouro, platina ou carbono (KOYUN, AHLATCIOĞLU e İPEK, 2012).

Barbosa (2008) aponta como características mais importantes de um biossensor ideal:

- Sensibilidade: definida como a alteração na magnitude do sinal de saída em função da concentração da espécie detectada, devendo ser posteriormente relacionada à estequiometria adequada da reação ocorrida. Idealmente, a sensibilidade deve se manter invariante em relação ao tempo e suficientemente grande para ser detectada pela aparelhagem eletrônica;
- Linearidade: quando a sensibilidade se mostra constante em toda a extensão de concentrações do analito, isto é, desde a ausência da espécie até a concentração máxima em que esta pode ser dissolvida no meio;
- Limite de detecção: deve ser limitado unicamente pela resolução dos instrumentos de medição utilizados, permitindo assim que sejam detectáveis mesmo concentrações muito baixas do analito de interesse;

- Seletividade: o sensor deve responder somente às variações na concentrações da espécie alvo de detecção, não sendo influenciado pela presença de outras moléculas;
- Tempo de vida: é importante que as propriedades do dispositivo sejam mantidas invariáveis para que suas medidas sejam reproduzíveis e igualmente precisas. Normalmente, o componente mais instável do biossensor é o elemento biológico, que é influenciado pelo número de medições realizadas, por concentrações muito altas do analito e pela presença de outras espécies químicas que possam porventura acelerar a desativação da sensibilidade do sensor;
- Histerese: o dispositivo não deve ser afetado pelas medições feitas anteriormente, sendo necessário que se mantenham as mesmas condições de análise a qualquer tempo;
- Resposta dinâmica: as propriedades físicas e as dimensões do biossensor ditam a velocidade com que este responde às variações de concentração da espécie alvo de detecção, fato ocasionado principalmente pela difusão que ocorre da espécie química até a superfície do transdutor.

Os biossensores são classificados especialmente quanto à natureza de seu elemento biológico e quanto ao tipo de transdutor que os constituem (KOROTKAYA, 2014).

No primeiro grupo, Salgado (2001) ressalta que a espécie biológica de reconhecimento deve apresentar algumas características cruciais, quais sejam a disponibilidade de interação com o analito por um sítio ativo e boa estabilidade para suportar as condições do meio no qual está inserido sem sofrer queda de desempenho. Dessa maneira, enquadram-se nesta classe os biossensores enzimáticos, microbiológicos, quimiorreceptores e os imunossensores, estes que serão detalhadamente descritos em sessão subsequente.

No que tange o agrupamento por tipo de transdutor, encontram-se os ópticos, baseados em fenômenos como absorção, fluorescência, luminescência e ressonância de plasmon de superfície; os piezoelétricos, que empregam cristais sensíveis à aplicação de um potencial elétrico (neles, o analito ao interagir com a espécie biológica altera a frequência de ressonância do sistema, indicando a

ocorrência da ligação); os calorimétricos, que detectam a quantidade de calor associada à concentração do analito; e os eletroquímicos, cujos subgrupos são descritos adiante e baseiam-se na medição de um sinal elétrico decorrente da interação na superfície do sensor (KOROTKAYA, 2014).

Entre os transdutores empregados no desenvolvimento de biossensores, destacam-se:

- Polianilina (PANI): polímero condutor mais estudado nos últimos 100 anos, cujo interesse científico tem sido despertado devido principalmente à sua alta estabilidade química, simplicidade da síntese, baixo custo do monômero precursor e em virtude de suas vantajosas propriedades eletroquímicas (SAI *et al.*, 2006; HANSEN, 2011). Diante de todas essas características, a PANI tem sido investigada para diversas aplicações em biossensores, como na detecção de peróxidos, glicose, colesterol, ácidos nucleicos, fenóis, polifenóis, etc (DHAND *et al.*, 2015);
- Dióxido de titânio (TiO₂): material vastamente empregado em dispositivos bioeletrônicos por apresentar ótima durabilidade mecânica, estabilidade química em soluções aquosas, biocompatibilidade e razoável condutividade elétrica (MUTHUCHAMY *et al.*, 2017). Li e Sailor (2014) sintetizaram este material pelo método sol-gel e o aplicaram ao desenvolvimento de biossensor óptico detector de imunoglobulinas G de ovelha, e Arcos, Romo e Flores (2016) o utilizaram para a imobilização de enzima lacase para a produção de um biossensor detector do composto catecol em solução;
- Óxido de índio dopado com estanho (*Indium tin oxide* - ITO): trata-se de um semiconductor degenerado tipo n de fórmula In₂O₃:Sn, que é transparente ao espectro visível. Em sua forma não dopada, o óxido de índio é um material isolante, mas que ao ser dopado com estanho, este elemento que é tetravalente atua como impureza doadora de elétrons ao índio trivalente. Embora apresente alta condutividade, característica interessante para aplicação em sensores, o ITO é um material de alto custo, dada a escassez do índio, principal elemento de sua composição (DAMIANI, 2010). A aplicação do ITO em biossensores foi estudada por Canbaz e Sezgintürk (2014) para a detecção de biomarcadores de câncer, e por Guo *et al.* (2013) para a detecção do vírus Influenza A aviária (H5N1);

Além dos transdutores supracitados, biossensores utilizando outros diversos materiais têm conquistado importante notoriedade no cenário científico mundial, como aqueles constituídos por aço (REZAEI, HAVAKESHIAN e ENSAFI, 2013; REZAEI *et al.*, 2016) e ouro (SANTOS, 2016; PRESNOVA *et al.*, 2017; SUAIFAN, ALHOGAIL e ZOUROB, 2017).

Quanto à sua natureza eletroquímica, os biossensores são constituídos ainda pelos subgrupos: potenciométricos, onde o potencial é gerado a partir da diferença de potencial entre os eletrodos de trabalho e de referência nas condições de equilíbrio e o valor obtido é proporcional à concentração da espécie de interesse; os amperométricos, baseados na medida da intensidade da corrente elétrica em potencial fixo gerada a partir de uma reação redox da espécie eletroativa, sendo esta corrente resultante proporcional à concentração do analito; os condutimétricos, que tratam da medida da diferença de condutividade elétrica na solução contendo o elemento de reconhecimento biológico e o a mesma solução sem esta espécie (IUPAC, 1999); e os impedimétricos, que são aqueles capazes de medir a impedância do sistema no estado de equilíbrio em corrente alternada (DANIELS e POURMAND, 2007).

Os biossensores impedimétricos têm seu princípio fundamentado na aplicação de uma pequena perturbação senoidal em potencial a uma dada faixa de frequências seguida da obtenção da resposta do sistema em corrente elétrica. Esta técnica é conhecida como Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (DANIELS e POURMAND, 2007) e tem seus fundamentos apontados em seção subsequente.

Nesta pesquisa foram desenvolvidos biossensores da classe de imunossensores, que são aqueles baseados na interação altamente específica entre anticorpo (Ab) e seu correspondente antígeno (Ag), apresentando alta seletividade mesmo em baixas concentrações do analito (KRESS-ROGERS, 1997).

Anticorpos (ou imunoglobulinas) são glicoproteínas multifuncionais presentes exclusivamente nos vertebrados e têm por função defender o organismo animal de diferentes maneiras. A primeira delas consiste na neutralização da molécula invasora (o antígeno) formando o complexo Ab-Ag que é expulso da circulação sanguínea. Uma segunda forma é a opsonização, mecanismo pelo qual o Ab recobre a superfície do Ag facilitando seu processo de fagocitose, já que os

macrófagos apresentam estruturas que se ligam ao “fragmento cristalino” (Fc) do anticorpo ligado ao antígeno. Por fim, os anticorpos ligados às espécies invasoras podem agir acionando o sistema complementar do corpo que causará a lise da molécula antigênica (MAYFORTH, 1993).

A estrutura das imunoglobulinas (Igs) é composta basicamente por regiões variáveis de terminações de grupo amino (NH₂) que são responsáveis pela ligação com os antígenos e ditam, por tanto, a característica de especificidade da Ig, e uma região constante de terminação COOH. As Igs são constituídas de quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas cadeias leves (peso molecular de aproximadamente 25 kDa) e duas cadeias pesadas (peso molecular entre 51 e 72 kDa) unidas entre si por ligações dissulfeto (S-S) (MAYFORTH, 1993).

Os anticorpos desempenham papel fundamental nesses dispositivos podendo ser aplicados em diversos campos farmacêuticos e de diagnósticos biológicos (*t al.*, 2014). O primeiro método imunológico comercialmente disponível foi o teste de gravidez, pelo qual era possível que a própria paciente manuseasse o dispositivo realizando o teste sem mesmo qualquer conhecimento técnico, tendo acesso a um aparato robusto, de simples operação, fácil interpretação do resultado, e custo não elevado (HOLFORD, DAVIS e HIGSON, 2012).

Holford, Davis e Higson (2012) ressaltam a importância dessa subclasse de biossensores devido às suas características de serem portáteis, fornecerem resultados rápidos e a baixo custo, alta precisão e acurácia, sensibilidade e confiabilidade. Para tanto, os autores apontam as aplicações em:

- Diagnósticos médicos: como detecção preventiva de doenças a partir do reconhecimento de analitos mesmo em baixas concentrações, aumentando as chances de recuperação de pacientes;
- Monitoramentos ambientais: por meio da análise de campos, rios e lagos de grandes áreas;
- Controle de saúde pública e segurança: detecção de aparatos empregados em práticas terroristas (como explosivos), desminagem, nas ciências forenses, etc.

Outras aplicações também foram sugeridas por diversos autores. Vitoreti (2014) estudou o desenvolvimento de um imunossensor utilizando anticorpos comerciais e

peçonha bruta de jararaca com vistas à identificação do veneno dessa cobra por meio da técnica eletroquímica de voltametria cíclica. Pimenta *et al.* (2012) desenvolveram um imunossensor eletroquímico para detecção de enteroxina A de *Staphylococcus aureus* em amostras de queijo e Bruno *et al.* (2004) avaliaram a possível utilização de blendas condutoras como biossensor sensível à presença de frações tóxicas do veneno do escorpião *Tytilus serrulatus*.

Esses biossensores podem operar de forma direta (sensor não marcado) ou indireta (sensor marcado) de acordo com o tipo de mecanismo que se opera, isto é, o dispositivo pode detectar diretamente a interação Ab-Ag, ou ainda pode identificá-lo por meio do reconhecimento de um marcador (como uma enzima ou espécie química fluorescente) que ditará o local onde ocorreu a formação do complexo biológico.

Os imunossensores marcados tem por objetivo marcar o elemento de reconhecimento biológico para quantificar o analito detectado durante a fase de incubação, para isso, são largamente empregados como marcadores as enzimas, nanopartículas e sondas fluorescentes. Por outro lado, os sensores não marcados reconhecem a formação do imunocomplexo na superfície do transdutor sem qualquer marcação, apresentando como vantagem crucial a simplicidade de sua operação, o fato de dispensarem reagentes adicionais para a marcação e a detecção em etapa única (PICÓ, 2014).

Os imunossensores podem ainda ser divididos entre eletroquímicos (potenciométricos, amperométricos e impedimétricos), ópticos, piezoelétricos e magnéticos (HOLFORD, DAVIS e HIGSON, 2012).

3.3 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

3.3.1 Generalidades

O conceito de impedância elétrica foi pela primeira vez discutido por Oliver Heaviside no século XIX e, em seguida, foi aprimorado em termos de diagrama de

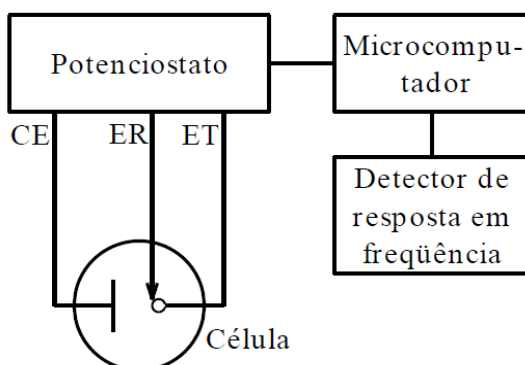
vetores e números complexos por A. E. Kennelly e C. P. Steinmetz. Trata-se de um conceito mais abrangente do que o de resistência pois leva em consideração diferenças de fase, o que tem papel essencial na engenharia elétrica (WOLYNEC, 2002).

O fundamento do método é a aplicação de um estímulo elétrico, isto é, um potencial ou corrente conhecida, e a observação da resposta gerada (em corrente ou potencial) partindo-se da condição de que suas propriedades são invariantes com o tempo (MACDONALD e JOHNSON, 2005).

Vários são os processos que ocorrem a nível microscópico quando uma célula eletroquímica é eletricamente estimulada resultando numa resposta elétrica global, quais sejam o transporte de elétrons pelo material condutor, a transferência de elétrons na interface entre o eletrodo e o eletrólito decorrente dos processos redox envolvendo as espécies químicas e o fluxo de átomos carregados (ou aglomerados atômicos) por meio de defeitos do eletrólito (MACDONALD e JOHNSON, 2005).

As medidas de impedância em corrente alternada para os sistemas eletroquímicos são feitas usando-se um Eletrodo de Trabalho (ET), um Eletrodo de Referência (ER), um Contra-Eletrodo (CE) e um potenciostato, aparelho pelo qual se impõe um potencial de eletrodo desejado (geralmente entre 10 MHz e 100 kHz) e faz a leitura da corrente que flui entre o eletrodo e a solução eletrolítica. O aparato utilizado nesta técnica é representado pelo esquema da figura 3 (WOLYNEC, 2002; DANIELS e POURMAND, 2007).

Figura 3 – Representação esquemática do aparato experimental utilizado na EIE
(Fonte: WOLYNEC, 2002)

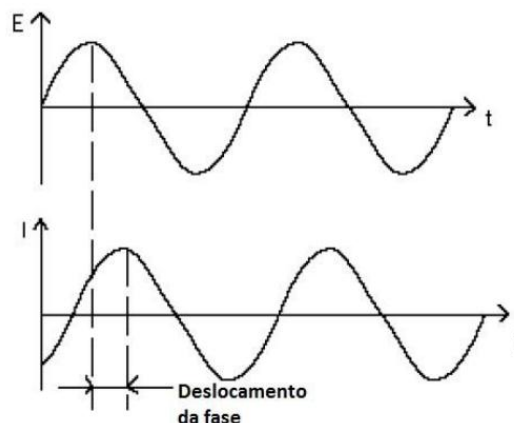


Tipicamente, em biossensores impedimétricos é empregado baixo potencial (até 10 mV), por diversas razões. Primeiro porque apenas em perturbações tão pequenas institui-se uma relação linear entre a corrente e o potencial, podendo se obter uma impedância bem definida. Além disso, a camada biológica de reconhecimento do dispositivo apresenta energias de ligação que podem ser covalentes (1 – 3 eV) ou de natureza menos energética, de modo que valores altos de potencial aplicado poderiam remover essa camada do sensor, fato que torna a EIE mais vantajosa que outras técnicas eletroquímicas como a voltametria e a amperometria, que operam em condições mais extremas (DANIELS e POURMAND, 2007; BARBERO, ALEXE-IONESCU e LELIDIS, 2005)

Considerando $E(t)$ o potencial aplicado ao sistema, $I(t)$ a corrente resultante da perturbação imposta, ϕ o ângulo de fase (defasagem da corrente em relação ao potencial), $\omega = 2\pi f$ (onde f é a frequência de oscilação da corrente alternada), então a impedância $Z(\omega)$ pode ser expressa pela razão entre $E(t)$ e $I(t)$, semelhante à Lei de Ohm, conforme a equação 1, e o deslocamento de fase entre potencial e corrente é representado na figura 4 (WOLYNEC, 2002; DANIELS e POURMAND, 2007).

$$Z(t) = \frac{E(t)}{I(t)} \quad (\text{Eq. 1})$$

Figura 4 – Resposta senoidal de corrente elétrica frente à uma perturbação de potencial (Fonte: SOUSA, 2013)



O número $Z(\omega)$ é descrito como uma série complexa, contendo uma parte imaginária Z' e outra real Z'' , onde j é o número imaginário de valor $\sqrt{-1}$, e $|Z|$ é o módulo da impedância. Assim, a impedância pode ser descrita por meio das equações 2 e 3 (WOLYNEC, 2002).

$$Z(\omega) = |Z|\exp(j\varphi) \quad (\text{Eq.2})$$

$$Z(\omega) = Z'(\omega) + jZ''(\omega) \quad (\text{Eq.3})$$

O número complexo j indica uma rotação no sentido anti-horário de $\pi/2$ em relação ao eixo x . Ainda, matematicamente pode-se obter as relações contidas nas equações. 4, 5 e 6, e a magnitude da impedância é representada na equação 7 (WOLYNEC, 2002; LASIA, 1999).

$$Z' = |Z|\text{sen}(\varphi) \quad \text{Eq.4}$$

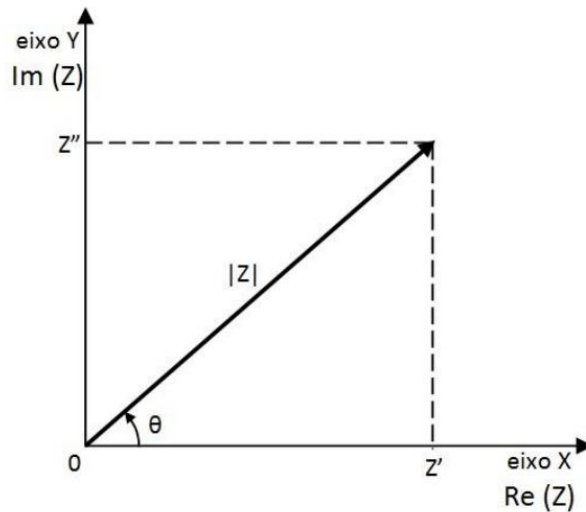
$$Z'' = |Z|\text{cos}(\varphi) \quad (\text{Eq.5})$$

$$\varphi = \text{arctg} \frac{Z'}{Z''} \quad (\text{Eq.6})$$

$$|Z| = \sqrt{(Z')^2 + (Z'')^2} \quad (\text{Eq.7})$$

As relações matemáticas supracitadas compõem o plano de Argand-Gauss (plano complexo), figura 5, que é bastante utilizado na Engenharia de circuitos eletrônicos (SOUSA, 2013).

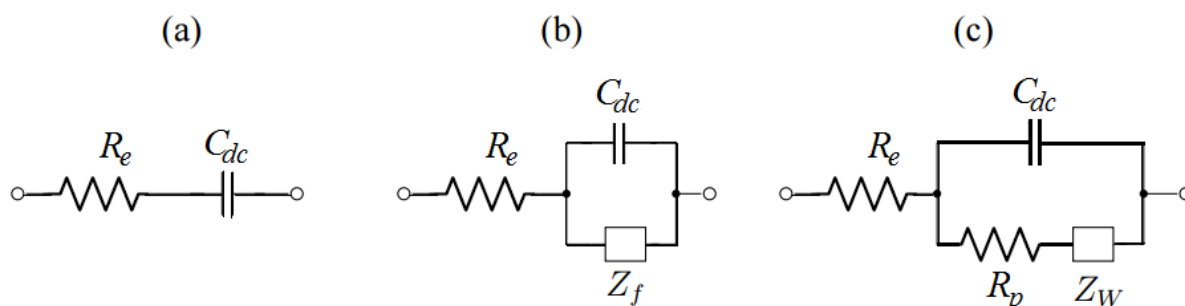
Figura 5 – Representação da impedância no plano vetorial em coordenadas retangulares e polares (Fonte: SOUSA, 2013).



3.3.2 Circuito elétrico equivalente

As transformações eletroquímicas que acontecem na interface entre eletrodo e eletrólito podem ser modeladas por associação a um circuito elétrico equivalente que corresponda ao seu espectro de impedância. A célula eletroquímica mais simples pode ser representada por uma combinação de uma resistência ôhmica da solução eletrolítica, R_e , e um capacitor de dupla camada, C_{dc} (que estão em série devido à separação da corrente para o processo capacitivo e para o faradaico). No caso de ocorrer uma reação faradaica no eletrodo, a impedância Z_f representada pelos processos que ocorrem na interface pode ser subdividida em um novo componente R_p , que significa a resistência à transferência de cargas no eletrodo e está em série com uma impedância de Warburg, Z_w , defasada em 45° , que é relacionada aos processos difusivos e só é expressiva a baixos valores de frequência. Este esquema é conhecido como Circuito de Randles e está ilustrado na figura 6 (WOLYNEC, 2002; SANTORO, 2014; UETA, 2002; DANIELS e POURMAND, 2007).

Figura 6 – Circuito elétrico equivalente de Randles (a) simples; (b) com reação faradaica causando o surgimento de Z_f ; (c) considerando os fenômenos difusivos, representados por Z_w (Fonte: adaptado de SANTORO, 2014)



Wolyneec (2002) aponta que embora haja uma dificuldade de correlacionar um dado processo físico com um elemento de circuito, há uma razoável correlação aplicável para os estudos eletroquímicos, a qual consta na tabela 3.

Tabela 3 – Relação entre processos físicos e o correspondente elemento de circuito (Fonte: WOLYNEC, 2002)

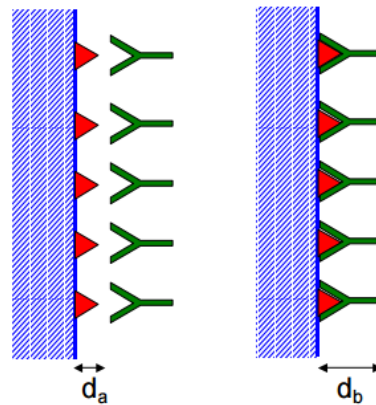
Processo físico	Elemento de circuito
Transferência de carga	Resistores R_e , R_p
Dupla camada elétrica	Capacitor C_{dc}
Camadas superficiais dielétricas (revestimentos orgânicos e óxidos)	Capacitor C
Adsorção	Pseudocapacitor C_θ e resistor R_θ
Transporte de massa	Pseudocapacitor C_w e pseudo-resistor R_w

Considerando que a EIE é uma técnica sensível às variações que ocorrem na capacitância da dupla camada, Ueta (2002) salienta que este parâmetro pode ser usado para monitorar a adsorção de proteínas, não necessitando essas de apresentarem comportamento eletroativo, o que é uma vantagem dos sistemas imunológicos. Para tanto, a autora cita estudos onde esse monitoramento é representado por um modelo elétrico bastante simples, considerando a capacitância

medida (C_t) igual à soma das capacitâncias individuais do antígeno (C_a) e do anticorpo (C_b) conforme a equação 8 e a figura 7.

$$\frac{1}{C_t} = \frac{1}{C_a} + \frac{1}{C_b} \quad (\text{Eq. 8})$$

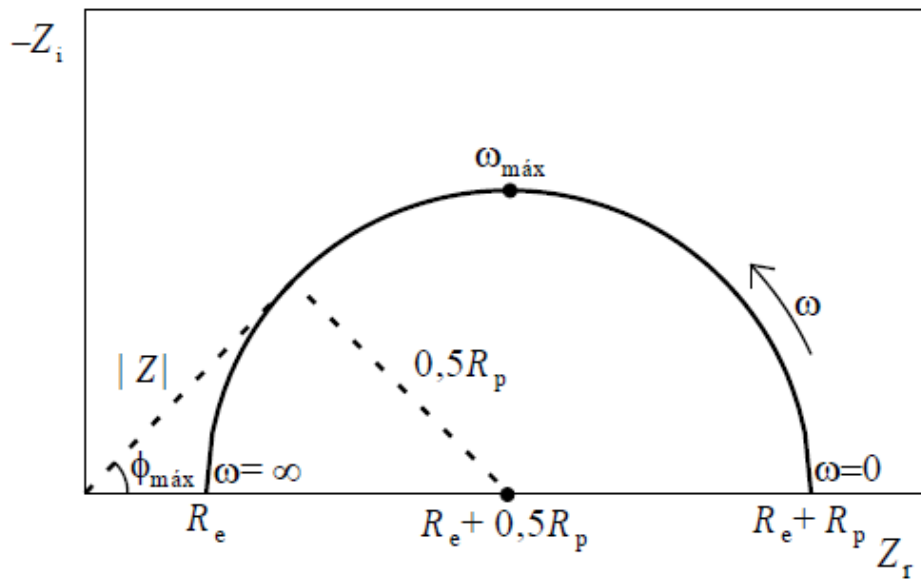
Figura 7 – Configuração da interação entre antígeno e anticorpo na interface eletrodo-eletrólito (Fonte: UETA, 2002)



3.3.3 Representações gráficas da EIE

Entre as formas de interpretação dos resultados gerados pela EIE, destacam-se os diagramas de Nyquist e de Bode. O primeiro, também conhecido como representação de Argand ou Cole-Cole, exprime a impedância imaginária em função da impedância real no domínio da frequência, como mostra a figura 8. Neste, há um semicírculo de raio $0,5 R_p$ com centro em $R_e + 0,5 R_p$, e os baixos valores de ω estão localizados à direita do semicírculo, sendo o ponto $\omega = 0$ aquele que está sobre o eixo real e vale $R_e + R_p$. À medida que ω aumenta, os pontos tendem a se deslocar para a esquerda, atingindo um valor máximo $\omega_{m\acute{a}x}$ e voltam a se aproximar do eixo das abscissas (Z_r), no ponto R_e , tendendo a infinito (WOLYNEC, 2002).

Figura 8 – Perfil gráfico do Diagrama de Nyquist (Fonte: WOLYNEC, 2002)



Por meio da análise da representação de Nyquist e das equações 9 e 10, é possível determinar importantes parâmetros da EIE, como R_e , R_p e C_{dc} (WOLYNEC, 2002).

$$\omega_{m\acute{a}x} = \frac{1}{C_{dc}R_p} \quad (\text{Eq.9})$$

$$R_p = 2|Z| \text{tg} \phi_{m\acute{a}x} \quad (\text{Eq.10})$$

Outra representação bastante comum é o Diagrama de Bode (figuras 9 e 10), que plota o logaritmo da magnitude da impedância e o ângulo de fase em função do logaritmo da frequência (EVTUGYN, 2014).

Figura 9 – Perfil gráfico do Diagrama de Bode por módulo da impedância (Fonte: WOLYNEC, 2002)

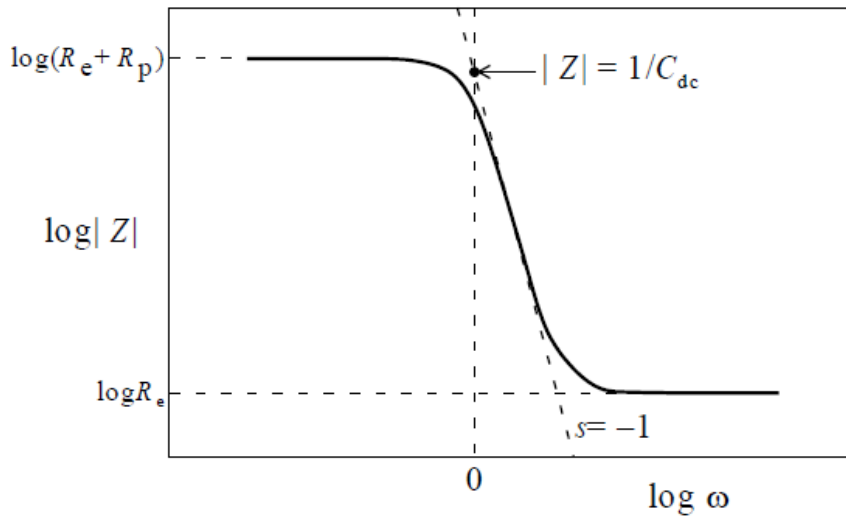
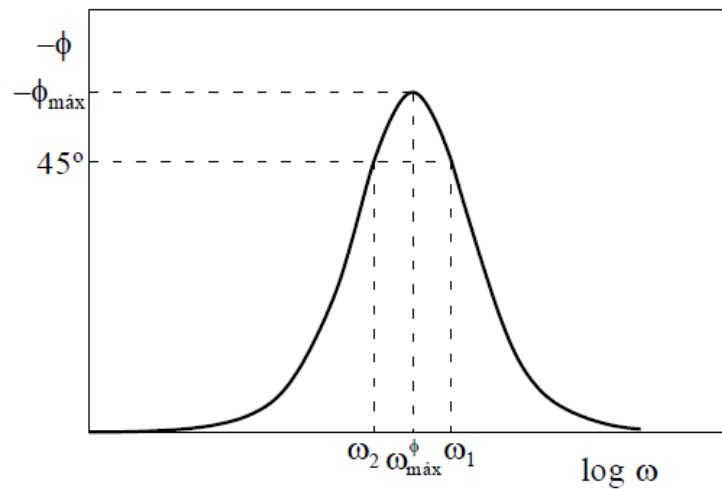


Figura 10 – Perfil gráfico do Diagrama de Bode por ângulo de fase (Fonte: WOLYNEC, 2002)



Woly nec (2002) destaca que tanto para baixas quanto para altas frequências, é notado que o módulo da impedância é independente de ω , podendo os valores de R_p e R_e serem determinados por este tipo de diagrama. Quando se tem valores intermediários de frequência, então $|Z|$ é inversamente proporcional ao parâmetro ω , gerando no gráfico uma reta de inclinação $s = -1$. Ainda, é possível se obter o valor de C_{dc} , para tanto deve-se extrapolar a reta para $\log \omega = 0$, pois $|Z| = (C_{dc})^{-1}$.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção de anticorpos para utilização nos biossensores

4.1.1 Purificação de anticorpos antibotrópicos

Para a obtenção de anticorpos antibotrópicos de alta especificidade, plasma hiperimune de cavalo, cedido pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED), foi duplamente purificado por cromatografia de imunoafinidade. O fluido biológico foi submetido a uma primeira coluna contendo veneno de cobra do gênero *Crotalus*, com o objetivo de remover possíveis presentes anticorpos produzidos a partir da exposição do animal ao veneno de serpentes deste gênero, e a outra contendo o veneno homólogo de serpentes de *Bothrops*.

A purificação seguiu o procedimento experimental descrito por Heneine (1995), e consistiu no preparo das duas resinas e a posterior passagem do plasma por elas a fim de se obter os anticorpos de alta especificidade.

A primeira coluna de cromatografia foi preparada usando-se 20 mg de veneno de *Crotalus durissus terrificus*, e para a segunda coluna foi usado um *pool* constando de 10 mg de cada um dos venenos das seguintes cobras: *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. atrox*, *B. neuwiedi*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*.

Ao volume dos venenos foi adicionada soroalbumina bovina (*Bovine Serum Albumine* – BSA) na razão mássica de 5 partes desta para 1 parte de antígeno. Em seguida, para cada 1 mg de veneno, foram adicionados lentamente, por gotejamento, 1,5 µL de glutaraldeído. O sistema foi levado a estufa a 37°C, onde permaneceu por 3 horas para a sua solidificação.

O gel formado, de aspecto turvo, teve sua estrutura fragmentada usando-se uma haste metálica até se obter sólidos de tamanhos aparentemente homogêneos. Em seguida, foi transferido para um tubo Falcon de volume igual a 50 mL, onde foram colocados cerca de 40 mL de tampão fosfato salina (*Phosphate Buffered Saline* - PBS) 0,15M pH 7,4. O sistema foi agitado em vortex para ocasionar sua homogeneização e, em seguida, centrifugado numa centrífuga Beckman GS-6R, por 10 minutos a 25°C e 3000 rpm.

O sobrenadante formado teve aferida sua absorvância em comprimento de onda de 280 nm (A_{280}) num espectrofotômetro Pharmacia LKB Ultrospec III para certificação da presença de proteínas não ligadas à resina, e o procedimento de centrifugação com PBS foi repetido até que a absorvância do sobrenadante fosse inferior a 0,050 (valor considerado irrisório quanto à quantidade de proteínas presentes).

Adiante, o tampão presente no recipiente foi descartado e à resina foram adicionados 35 mL de cloreto de magnésio 2,5M. O sistema foi agitado num agitador circular de tubos modelo Glas-Col por 15 minutos. Após este período de tempo, o volume de $MgCl_2$ foi retirado, em seu lugar foi adicionada água ultrapura produzida pelo sistema Milli-Q (Millipore®, Estados Unidos) e o sistema foi centrifugado novamente, desta vez por 10 minutos a 1000 rpm.

O sobrenadante foi descartado e ao gel foram adicionados 10 mL de etanolamina 1,0M pH 7,4, que foi agitado por 2 horas e centrifugado nas mesmas condições anteriores. Logo após, a etanolamina foi retirada e ao volume remanescente foi adicionado tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,4.

Para a cromatografia de imunoafinidade, no frasco contendo a resina, foram adicionados 7 mL de tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,4 e igual volume do plasma equino. A fim de propiciar a homogeneização das partículas e interação entre antígenos e anticorpos, o conjunto foi posto em agitação por 1 hora no agitador circular de tubos, depois foi centrifugado por 10 minutos a 2500 rpm e 4°C. O sobrenadante foi descartado e o procedimento foi repetido por tantas vezes quantas necessárias para se atingir a leitura de absorvância igual ou menor que 0,050 no espectrofotômetro. Em seguida, para a retirada de todas as substâncias do plasma que não reagiram especificamente com o veneno da fase estacionária, o tampão de lavagem foi descartado e em seu lugar foram aplicados 5 mL de tampão Afilit (Proteobras®, Brasil) para promover a eluição das imunoglobulinas G - IgG, ou seja, a lixiviação dos anticorpos que interagiram especificamente com a resina de cada coluna de cromatografia.

Uma novo ciclo de centrifugações foi realizado, desta vez a 3000 rpm e 4°C por 10 minutos. A cada centrifugação, fez-se a aferição da absorvância do sobrenadante a 280 nm, sendo todo o volume obtido nesta fase armazenado em ambiente a 4°C até o próximo uso, e o ciclo foi findado quando se atingiu a condição de $A_{280} \leq 0,05$.

Uma série de diversas purificações de IgG foi feita a fim de se obter quantidade suficiente do anticorpo para a condução dos posteriores métodos de desenvolvimento do biossensor.

O volume obtido de anticorpos foi submetido a diálise contra grande volume de água ultrapura (2,5 L) para a remoção dos sais do tampão de eluição, e a solução dialisada foi liofilizada num liofilizador ModulyoD da Thermo Electron Corporation numa temperatura de -52°C sob vácuo de aproximadamente 130 mbar. O sólido obtido foi ressuspendido com tampão PBS 0,01M pH 7,4 de modo a se obter uma solução de concentração igual a 0,0462 mg/mL, aferição realizada por meio da leitura de absorbância a 280 nm, cujo cálculo da concentração da nova solução se deu a partir da equação 11.

$$C = \frac{A_{280}}{13,6} \quad (\text{Eq. 11})$$

4.1.2 Caracterização dos anticorpos obtidos por Eletroforese em gel de poliacrilamida

Inicialmente, gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio - SDS-PAGE (sistema desnaturante sem redução) foi preparado usando-se gel de corrida na concentração de 10% e gel de aplicação de 4%. Ao gel foram adicionadas uma amostra de anticorpos purificados por cromatografia de imunoafinidade e outra de plasma hiperimune de cavalo.

Antes da aplicação no gel, as amostras foram diluídas em tampão de amostra (0,1% azul de bromofenol e glicerol 20% em tampão de aplicação) e foram submetidas a aquecimento em banho-maria a 100°C por 1 minuto.

Em seguida, 10 µL de cada amostra foi aplicada no gel que, num equipamento Bio-Rad Mini-protean® Tetra Cell contendo 800 mL de tampão de corrida (Tris 25 mM, glicina 192 mM e 1% SDS), foi submetido ao potencial de 140 V e corrente elétrica de 32 mA por tempo suficiente para a completa migração eletroforética das proteínas ao longo da matriz semissólida.

Findada a corrida eletroforética, o gel foi imerso por 30 minutos em solução corante de 0,12% Comassie Brilliant Blue 250-R, 40% metanol e 7% ácido acético glacial em água destilada e, finalmente, foi lavado com solução descorante (40% metanol e 7% ácido acético glacial) para remoção do excesso de Comassie e revelação das bandas proteicas.

4.2 Obtenção e caracterização dos substratos transdutores para aplicação nos biossensores

Entre os substratos empregados nesta pesquisa, foram obtidos comercialmente: ITO, aço Crofer 22 APU e ouro, enquanto o dióxido de titânio e a polianilina foram sintetizados conforme procedimento experimental explicitado nas seções seguintes. Os substratos utilizados nesta pesquisa foram escolhidos com base em suas promissoras características para emprego em biossensores, como discutido na seção 3.2, e o aço Crofer 22 APU, cuja composição química é apresentada na tabela 4, também foi estudado por se tratar de um aço altamente resistente à corrosão, com alta estabilidade termodinâmica e alta condutividade elétrica (VDM Metals, 2010). Embora sua aplicação tenha sido amplamente direcionada ao desenvolvimento de células a combustível, as características anteriormente citadas são também altamente vantajosas para seu emprego em biossensores.

Tabela 4 – Composição química (%m) do aço Crofer 22 APU (VDM Metals, 2010)

	Cr	Fe	C	Mn	Si	Cu	Al	S	P	Ti	La
Mín.	20,0	-	0,30	-	-	-	-	-	-	0,03	0,04
Máx.	24,0	Bal.	0,03	0,80	0,50	0,50	0,50	0,02	0,05	0,20	0,20

Os substratos transdutores foram avaliados quanto à área eletroativa pelo método das velocidades de varredura, usando uma solução de ferricianeto de potássio, $K_3Fe(CN)_6$, em tampão Tris-HCl 0,01 M pH 7,4 contendo KCl 0,1 M como eletrólito suporte. Para a obtenção dos picos anódicos referentes à troca de carga entre

substrato e a sonda redox, fez-se uma medida de voltametria cíclica com um ciclo de -0,4 a +0,8 V nas velocidades de varredura de 10, 20, 50, 75 e 100 mV.s⁻¹. A equação de Randles-Sevcik (equação 12) foi utilizada para o cálculo da área eletroativa relativa a cada velocidade de varredura estudada, calculando-se a média dos cinco valores obtidos.

$$I_p = (2,69 \times 10^5) \times n^{3/2} \times A \times D_0^{1/2} \times C \times V^{1/2} \quad (\text{Eq. 12})$$

Nesta equação, “I_p” é a corrente de pico anódica, em ampères, “n” o número de elétrons envolvidos da reação redox (e é igual a 1), “A” é a área eletroativa do substrato (cm²), “D₀” vale 7,6.10⁻⁶ cm².s⁻¹ (TAEI *et al.*, 2016) e se refere ao coeficiente de difusão do K₃Fe(CN)₆, “C” é a concentração do ferricianeto de potássio (5 mM) e “V” é a velocidade de varredura (V.s⁻¹).

Entre os materiais estudados, apenas o ouro não foi avaliado quanto a sua área eletroativa por constituir a microcélula eletroquímica, a qual tem dimensões e estrutura bastante diferente daquela onde foram empregados os demais substratos.

4.2.1 Síntese e caracterização do substrato de Polianilina

Anilina (VETEC, Brasil) foi previamente destilada e armazenada em recipiente âmbar a 4°C até o momento do uso a fim de se evitar sua natural oxidação.

Para a obtenção da PANI, uma célula eletroquímica foi montada constando de três eletrodos: referência de Ag/AgCl, contra-eletródo de platina e eletródo de trabalho (aço Crofer 22 APU). O eletrólito usado foi a própria solução precursora do monômero, contendo anilina 0,3 M e ácido sulfúrico 0,3 M, e a eletrodeposição foi conduzida durante 300 segundos por meio da aplicação de um potencial de 0,8 V em ensaio de cronoamperometria (medida eletroanalítica que emprega um potencial constante para monitoramento da corrente elétrica resultante de reações redox num eletródo de trabalho (BRETT e BRETT, 1996). Este tempo foi determinado em testes preliminares, quando já se notava a clara deposição do filme do polímero sem formação de excesso de material, evitando seu desprendimento do substrato.

Findada a eletrodeposição, o substrato foi retirado da célula, lavado com água deionizada e foi reservado à temperatura ambiente por tempo suficiente para sua completa secagem. Microscopia Óptica, num microscópio Bel Photonics modelo MTM-17T, foi utilizada para verificar as mudanças estruturais do aço Crofer 22 APU antes e após a eletrodeposição da Polianilina.

O filme obtido foi caracterizado por voltametria cíclica, com 10 ciclos de -0,2 a +1,2 V na mesma solução de eletrodeposição (usando-se um potenciostato Princeton Applied Research VersaStat3); e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica, numa faixa de frequências de 10^4 a 10^{-2} Hz e amplitude de potencial de 10 mV a partir do potencial de circuito aberto (*Open circuit potential* – OCP) estabilizado por 300 segundos.

A voltametria é uma técnica baseada nos fenômenos que acontecem na interface entre o eletrodo de trabalho e a solução eletrolítica próxima de sua superfície. A análise eletroanalítica é feita a partir das informações obtidas através da magnitude da corrente elétrica que surge na amostra, que é resultante da aplicação de uma diferença de potencial entre o contra-eletrodo e um eletrodo de referência. Entre os tipos de voltametria, a cíclica é uma das técnicas mais vastamente empregadas para o estudo de processos eletroquímicos, pois é capaz de fornecer informações sobre a cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons, a termodinâmica desses processos e, ainda, sobre reações químicas envolvendo processos adsorptivos (PACHECO *et al.*, 2013).

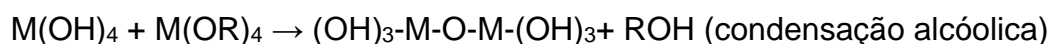
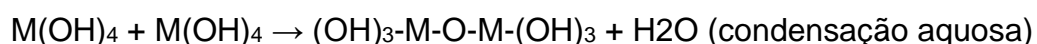
Num ensaio de voltametria cíclica, um potencial é aplicado de modo que em valores negativos (região catódica) os compostos em solução são reduzidos no eletrodo de trabalho gerando um pico de intensidade proporcional à sua concentração, e o potencial é varrido, em seguida, também no sentido inverso (região anódica), fazendo com que os produtos reduzidos sejam oxidados na interface eletrodo-eletrólito formando o pico anódico (PACHECO *et al.*, 2013).

4.2.2 Síntese e caracterização do substrato de TiO₂

Dióxido de titânio utilizado como substrato transdutor nesta pesquisa foi obtido pelo método sol-gel, processo que tem despertado grande interesse científico para aplicações em sensores analíticos devido a variados fatores, incluindo a simplicidade e a flexibilidade do procedimento (ALFAYA e KUBOTA, 2002).

A técnica consiste basicamente na rota sintética de materiais que passam por uma transição de um sistema “sol”, termo utilizado para designar uma dispersão de partículas coloidais dispersas num fluido, para um “gel”, que é o sistema formado por uma estrutura rígida de coloides ou cadeias poliméricas (ALFAYA e KUBOTA, 2002).

A deposição do filme de interesse pode se dar a partir de sais de metais ou de alcóxidos precursores, sendo o segundo grupo mais utilizado por dispensar uma etapa de eliminação de ânions após as reações. Hidrólise e condensação são etapas que ocorrem para a formação do gel e a rota para obtenção de moléculas do tipo M(OR)_N é expressa abaixo para um metal de valência +4, como o átomo de titânio, onde “M” é um átomo metálico de valência “N” e “R” é um grupo radical (AUN, 2016):



O método sol-gel para a obtenção do sol e para a deposição por *dip coating* do filme de dióxido de titânio sobre placas de silício seguiu a metodologia utilizada por AUN (2016). As placas de silício semicondutor monocristalino de geometria irregular foram previamente lavadas com etanol absoluto para a remoção de sujidades que pudessem comprometer a qualidade da deposição. O experimento foi realizado no Laboratório de Materiais Metálicos do Departamento de Engenharia de Materiais e Construção da UFMG.

As placas foram verticalmente imersas à velocidade constante de 5 mm.s^{-1} na solução sol-gel com precursor de tetraisopropóxido de titânio, previamente preparada de acordo com Aun (2016), e imediatamente emersas à mesma velocidade. Em seguida, foram submetidas a aquecimento a 100°C por 15 minutos num forno Lavoisier modelo 400 D e, por fim, foram conduzidas à cristalização do filme de TiO_2 no forno a 500°C por 2 horas.

A caracterização do substrato obtido foi feita também por Difratomia de Raios-X (DRX), técnica que consiste na produção de raios-X a partir da rápida desaceleração de partículas com alta energia cinética e da medida da intensidade da difração dos raios desta maneira produzidos depois de incidirem sobre uma amostra cristalina. A produção mais usual dos raios-X se dá quando o elétron de alta energia cinética colide com um alvo metálico, liberando um fotoelétron da camada K de um átomo deste material, formando uma vacância em seu lugar. Para ocupar esta região, outro elétron de uma camada mais externa passa a ocupar a camada K e, para isso, libera energia na forma de fóton de raio-X. A energia liberada corresponde à diferença energética entre as duas camadas (BLEICHER e SASAKI, 2000).

Ao ser colimado e atingir a amostra, parte do feixe de raios-X sofre reflexão e atinge um detector, enquanto outra, não refletida, penetra o material e é refletida pelas camadas subsequentes, sendo em seguida detectada até que a intensidade do feixe seja grande o suficiente para ser transmitida. Os raios refletidos pelos planos cristalinos da amostra podem sofrer interferências construtivas ou destrutivas entre si dependendo do seu ângulo de incidência, sendo que a Lei de Bragg (equação 13) abaixo expressa os ângulos em que ocorrem as construtivas:

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (\text{Eq. 13})$$

Onde “n” é a ordem de reflexão, “ λ ” é o comprimento de onda dos raios-X, “d” é a distância interplanar (hkl) e “ θ ” o ângulo de incidência dos raios-X (FILHO e LOPES, 2013; CULLITY e STOCK, 2001).

As análises de DRX deste trabalho foram realizadas no Laboratório de Raios-X do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da UFMG e foram conduzidas num difratômetro de raios-X PANalytical modelo Empyrean a 40 kV e 40 mA com radiação de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,540 \text{ \AA}$). Os difratogramas foram analisados num software Highscore Plus e plotados usando-se o *software* Origin Pro 8.0.

A fim de se obter amplo entendimento a respeito do material obtido, foram analisados nesta técnica parâmetros como o tipo de detector utilizado no difratômetro (pontual ou de área), tipo de amostra (substrato puro ou recoberto por TiO₂), ângulo de difração (modo filme para ângulo rasante “ θ ” e modo pó para ângulo normal “ 2θ ”) e intervalo angular. Foi empregada velocidade de varredura de 0,06°.s⁻¹ e tempo de contagem de 1 segundo no modo normal e 5 segundos no modo filme.

Tab. 4 – Parâmetros variáveis na técnica de difração de raios-X

Identificação	Amostra	Detector	Modo	Intervalo angular
AM160237	Substrato + TiO ₂	Pontual	Normal (pó)	2,98° < 2 θ < 100°
AM160238	Substrato + TiO ₂	Área	Normal (pó)	6,00° < 2 θ < 130°
AM160239	Substrato + TiO ₂	Área	Filme	6,00° < θ < 130°
AM160240	Substrato + TiO ₂	Pontual	Filme	3,00° < θ < 130°
AM160241	Substrato puro	Pontual	Filme	3,00° < θ < 90°
AM160242	Substrato puro	Pontual	Normal (pó)	3,00° < 2 θ < 90°

As amostras de substrato puro foram analisadas num ângulo máximo de 90° pois por resultados preliminares constatou-se o não aparecimento de picos em ângulos maiores.

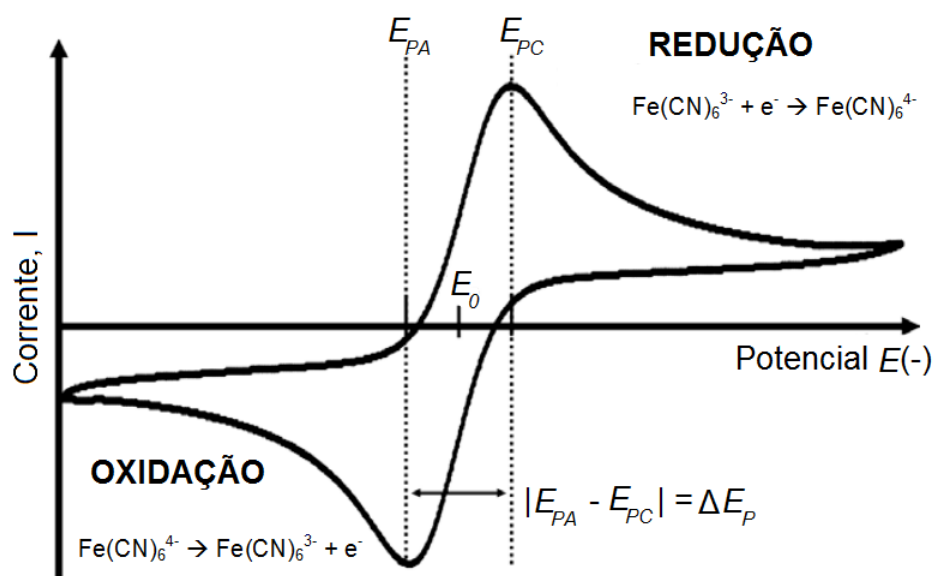
4.2.3 Preparo e caracterização do substrato de ouro

Previamente à funcionalização do substrato de ouro, o material passou por procedimento de limpeza de sua superfície, já que as respostas eletroquímicas de EIE e voltametria cíclica estão intimamente associadas à composição da superfície deste material. Ademais, uma superfície contendo sujidades e contaminações sujeita o substrato a uma funcionalização ineficaz, comprometendo a qualidade do sensor a ser produzido.

Diante disso, o substrato de ouro foi submetido a voltametria cíclica para sua limpeza eletroquímica numa solução de H_2SO_4 0,1M, com ciclagem de potencial de -0,4 a +1,4 mV (vs Ag/AgCl) numa velocidade de varredura de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ por 10 ciclos, com base no protocolo adaptado de Fischer *et al.* (2009). Antes e após a limpeza, o substrato também foi submetido a voltametria cíclica, mas em solução de KCl 0,1M contendo o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em concentração equimolar de 50 mM, sob velocidade de varredura de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ para verificação da eficiência desta limpeza eletroquímica.

Fischer *et al.*(2009) consideraram que a diferença entre o potencial de pico anódico (E_{PA}) e o potencial de pico catódico (E_{PC}), dado por ΔE_p (figura 11), é um indicativo da limpeza do ouro, sendo que para um processo de transferência de um elétron na reação entre o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ocorrendo em uma superfície de ouro completamente uniforme e homogênea, a diferença teórica de potencial deve ser de $\Delta E_p = 58 \text{ mV}$, e um distanciamento deste valor pode sugerir imperfeição ou contaminação do material.

Figura 11 – Curva padrão de voltametria cíclica para uma solução contendo o par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (Adaptado de Fischer *et al.*, 2009)



4.2.4 Funcionalização dos substratos transdutores

Previamente à funcionalização, todos os substratos, exceto o ouro, que seguiu procedimento descrito no tópico 4.2.3, foram submetidos a limpeza em banho ultrassônico em: acetona, polissorbato 20 (tween 20) (0,1% v/v) e água deionizada por 10 minutos a cada passo. A acetona foi utilizada para a remoção de resíduos orgânicos dos substratos, o tween 20 foi empregado devido às suas propriedades tensoativas, sendo capaz de interagir com sujidades hidrofílicas e hidrofóbicas, ao passo que a água na última etapa promove principalmente o enxague de resquícios dos líquidos anteriores.

Para a funcionalização dos substratos, seguiram-se as seguintes etapas de imersão a partir do procedimento experimental adaptado de (CANBAZ e SEZGINTÜRK, 2014):

- **Hidroxilação:** adição de $\text{NH}_4\text{OH} : \text{H}_2\text{O}_2 : \text{H}_2\text{O}$ na proporção 1:1:7, por 1 hora. Nesta etapa, grupos hidroxila são formados na superfície do material para que no próximo passo o silano possa ser incorporado ao substrato;
- **Silanização:** adição de 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES) 1% v/v, por 1 hora;
- **Ativação:** adição de Glutaraldeído 1% v/v, por 1 hora;
- **Imobilização:** incubação de anticorpos antibotrópicos na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, por 1 hora;
- **Bloqueio:** adição de BSA 1% m/v, por 30 minutos.

A metodologia apresentada foi integralmente empregada em todos os substratos, exceto na Polianilina, que já apresenta nitrogênios com par de elétrons livres disponíveis para ligação direta com o glutaraldeído, sendo dispensáveis as etapas de hidroxilação e silanização no polímero.

Para o aço Crofer, por se tratar de um material nobre e resistente à oxidação a condições amenas de temperatura e potencial, a etapa de hidroxilação foi diferente daquela anteriormente descrita. Neste caso, o aço foi imerso numa solução de H_2SO_4 0,2 M e a ele foi aplicado um potencial 10 vezes ciclado de -0,4 a +1,2 V para remoção da camada nativa de óxido de sua superfície. Em seguida, o substrato foi

imerso em solução de NaOH 0,2M e a ele foi aplicado um potencial positivo de 0,8 V por 5 minutos, para que em seguida se seguisse com as etapas de funcionalização.

4.3 Caracterização dos substratos funcionalizados e monitoramento eletroquímico das etapas de funcionalização

Com o objetivo de constatar a eficiência do procedimento de funcionalização dos substratos, os materiais foram submetidos a diferentes técnicas de caracterização.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi empregada para visualização da alteração na estrutura da PANI decorrente da funcionalização e de sua exposição ao veneno de *Bothrops*. Esta é uma das mais versáteis técnicas para a análise de características microestruturais de amostras sólidas, apresentando alta resolução das imagens produzidas. Um microscópio eletrônico de varredura utiliza um feixe de elétrons de baixo diâmetro emitidos sobre ponto a ponto de uma superfície, por linhas sucessivas, que transmitem o sinal detectado a uma tela catódica sincronizada com o feixe incidente. Ao interagir com a amostra, o feixe produz elétrons e fótons que são detectados e convertidos em sinal de vídeo (DEDAVID, GOMES e MACHADO, 2007).

As imagens de MEV foram obtidas num microscópio eletrônico de varredura FEG – Quanta 200 FEI e a análise foi realizada no Centro de Microscopia da UFMG. O substrato polimérico foi escolhido para esta caracterização porque esta técnica exige o emprego de materiais de alta condutividade elétrica para geração de imagens de boa resolução, de modo que outros substratos estudados nesta pesquisa poderiam impor dificuldade na obtenção de imagens de alta qualidade.

Devido à maior homogeneidade de sua superfície em relação aos demais materiais, o substrato de ITO foi empregado para a verificação das alterações de rugosidade e espessura ocasionadas pela funcionalização dos sensores. A análise se deu por Microscopia de Força Atômica (*Atomic Force Microscopy* – AFM), também realizada no Centro de Microscopia da UFMG, e as imagens foram geradas a partir de um microscópio Cypher ES – Asylum Research. O princípio de funcionamento desta técnica se baseia na interação entre os átomos presentes na ponta do equipamento

e aqueles que compõem a amostra a ser varrida. Entre suas principais vantagens estão a não necessidade de métodos específicos para o preparo da amostra, a possibilidade de medição da rugosidade e espessura mesmo de filmes finos e a possibilidade de se obter a imagem a partir de materiais condutores ou isolantes (PINTO, RAMOS e FILHO, 2013).

Durante a varredura, a interação ponta-amostra pode dar origem a forças atrativas ou repulsivas. A atração pode acontecer por forças eletrostática, de Van der Waals, químicas ou capilares, enquanto a repulsão ocorre quando os átomos da ponta e da amostra estão tão próximos (distância da ordem de uma ligação química), que as nuvens eletrônicas passam a se repelir em consequência do Princípio de Exclusão de Pauli, que afirma que dois férmions idênticos, como dois elétrons, não podem ocupar ao mesmo tempo o mesmo estado quântico. Assim, as interações ponta-amostra provocam deflexões na haste que suporta a ponta (cantilever) provocando um desvio do laser que é incidido sobre ele, sendo essa deflexão detectada por um fotodiodo e traduzida em imagens topográficas da superfície da amostra (PINTO, RAMOS e FILHO, 2013).

Para a análise por AFM, foram utilizadas amostras de ITO antes da funcionalização e do biossensor com este transdutor após exposição ao veneno de *Bothrops*. Para a segunda amostra, uma lâmina metálica foi utilizada para riscar a superfície do material, de modo a expor completamente o substrato de ITO, gerando uma região completamente desprovida de reagentes, proteínas e veneno, e que foi utilizada como referência topográfica para o cálculo da espessura média das camadas da funcionalização.

A deposição de cada camada durante a funcionalização do substrato de ouro foi estudada utilizando-se uma Microbalança de Cristal de Quartzo QCM 200 (STANFORD RESEARCH SYSTEM, 2004).

O princípio básico da Microbalança de Cristal de Quartzto (*Quartz Crystal Microbalance* – QCM) consiste de um cristal piezelétrico de quartzo revestido por um metal em suas faces superior e inferior (ouro neste caso), sendo este sistema acoplado a um circuito oscilador que aplica um campo elétrico alternado ao cristal, provocando uma oscilação no centro deste material. A partir disso, uma onda acústica transversa se propaga através do cristal e como consequência gera-se um

deslocamento de seus átomos. Dessa maneira, à medida que um material é depositado sobre a superfície do cristal, gera-se uma redução em sua frequência de oscilação, provocando uma diminuição na sua frequência de ressonância (DAMOS, MENDES e KUBOTA, 2004).

A relação entre a massa depositada sobre o cristal e a variação de sua frequência de oscilação é expressa pela Equação de Sauerbrey (equação 14):

$$\Delta f = -C_f \cdot \Delta m \quad (\text{Eq. 14})$$

onde “ Δf ” é a variação da frequência observada (Hz), “ C_f ” é o fator de sensibilidade da microbalança (igual a $56,6 \text{ Hz} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^2$ para um cristal de 5 MHz à temperatura ambiente) e “ Δm ” indica a variação de massa por unidade de área ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$) (Standford Research System, 2004).

O uso deste equipamento objetivou a análise das contribuições mássicas de cada etapa até a imobilização dos anticorpos a partir do efeito piezoelétrico de um cristal de quartzo contendo filme de ouro (diâmetro de uma polegada), região onde foram adicionados os reagentes. Após cada etapa, o cristal foi cuidadosamente lavado com água ultrapura para remoção do excesso de reagente sobre o cristal e foi seco aplicando-se nitrogênio gasoso sobre esta superfície, tendo em seguida sua frequência de oscilação aferida durante 2 minutos.

Ainda, a fim de monitorar eletroquimicamente as etapas de funcionalização dos substratos de TiO_2 , ITO, aço Crofer 22 APU e PANI, esses transdutores foram submetidos a ensaios de EIE, na faixa de frequência de 10^4 a 10^{-2} Hz, aplicando-se uma perturbação potencioestática de 10 mV de amplitude a partir do OCP, estabilizado por 300 segundos. Como eletrólito utilizou-se tampão Tris-HCl 0,01M contendo KCl 0,1M. Mais informações dos experimentos impedimétricos são detalhadas na seção 4.4 desta dissertação, que trata da metodologia utilizada para todos os ensaios de EIE.

Voltametria cíclica também foi empregada para o estudo do comportamento eletroquímico dos eletrodos transdutores frente aos reagentes utilizados na funcionalização, usando-se uma janela de potenciais de -0,4 a +0,8V (vs Ag/AgCl) em velocidade de varredura de $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ (10 ciclos). O mesmo eletrólito das medidas de EIE foi empregado, mas acrescido do par redox $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] /$

$K_3[Fe(CN)_6]$, cujos picos são bem definidos e apresentam alterações que podem ser correlacionadas às etapas de desenvolvimento do biossensor.

4.4 Construção dos biossensores e análise por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

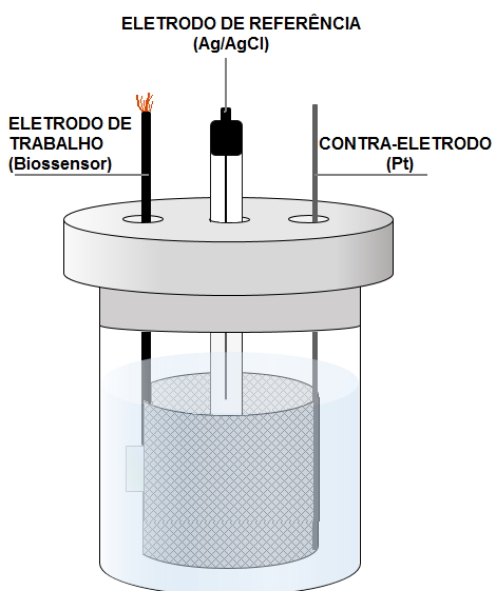
Os sensores contendo aço Crofer 22 APU, Polianilina, TiO_2 e ITO foram desenvolvidos usando-se o próprio substrato transdutor como material a ser funcionalizado e um cabo com haste flexível polimérica contendo fios de cobre em seu interior, cujas extremidades foram expostas para promover o contato elétrico entre a superfície transdutora e o potenciostato. Fita de cobre foi utilizada para afixar o fio metálico ao transdutor e essa região foi eletricamente vedada por meio da aplicação de silicone sobre a fita, para que durante a medida de EIE, toda resposta eletroquímica fosse originada apenas pela exposição do substrato ao eletrólito, e não pelo cobre utilizado para promover o contato elétrico com o equipamento. Após sua aplicação, o sensor foi reservado para que o silicone secasse completamente à temperatura ambiente.

Para a condução das medidas de impedância, foi empregada a célula eletroquímica representada na figura 12, composta por eletrodo de trabalho (substrato funcionalizado), eletrodo de referência (Ag/AgCl) e contra-eletrodo (cesta de platina). Como eletrólito foi empregado tampão Tris-HCl 10mM pH 7,4 (fundamental para manter a estabilidade dos anticorpos e venenos) acrescido de KCl 0,1M como eletrólito suporte, num volume total de 40 mL de solução.

Antes de se optar pelo uso do mencionado eletrólito, testes preliminares foram conduzidos com o tampão sem eletrólito suporte e com concentrações diversas de cloreto de potássio, obtendo-se o melhor perfil de curva para o diagrama de Nyquist na EIE para a concentração de 0,1 M deste sal. A partir disso, a condutividade da solução eletrolítica foi aferida num condutímetro Schott CG 853 e foi igual a $7,83 \text{ mS.cm}^{-1}$, sendo este parâmetro mantido em todas as análises eletroquímicas de impedância.

Por fim, o sistema eletroquímico foi submetido a uma perturbação potenciostática com amplitude de 10 mV a partir do OCP estabilizado por 300 segundos (tempo suficiente para que a variação de potencial natural entre os eletrodos fosse de no máximo 5 mV, valor inferior à perturbação induzida durante a medida de impedância), num intervalo de frequência de 10^4 a 10^{-2} Hz, com coleta de 5 pontos por década de frequência num potenciostato Princeton Applied Research VersaStat3.

Figura 12 – Arranjo experimental da célula eletroquímica para os testes de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica



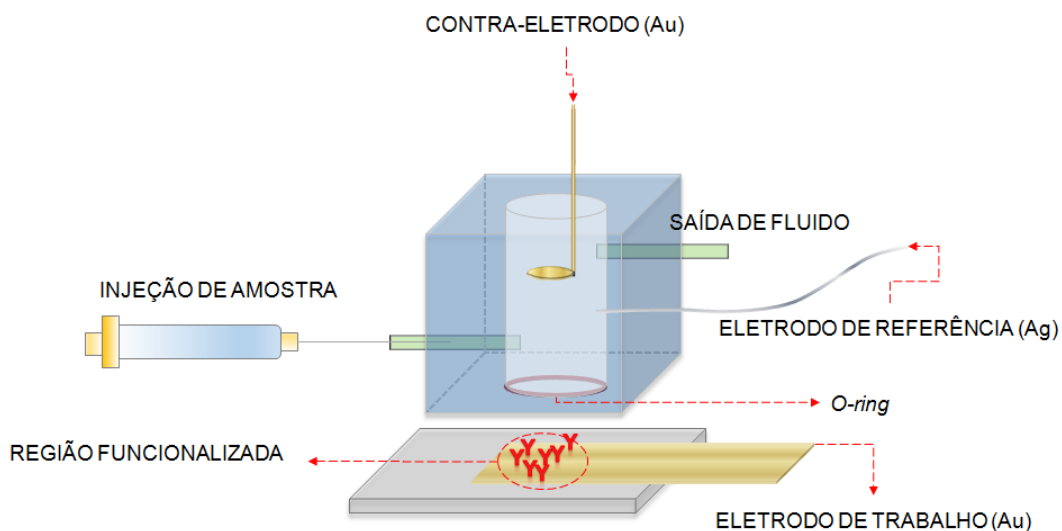
Para a análise impedimétrica dos biossensores, eles foram expostos ao volume de 2 mL de solução de veneno, com tempo de incubação de 20 minutos. Findado este tempo, o excesso de veneno foi lixiviado por meio de imersão do sensor em tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,4 por 5 minutos e, só então, a análise de EIE foi realizada. Após cada medida, o sensor foi exposto a 2 mL de tampão Afilit por 5 minutos para promover a eluição do sistema, isto é, o rompimento das ligações entre antígeno e anticorpo, possibilitando o reuso do dispositivo.

A sensibilidade do biossensor foi avaliada expondo-o a diversas concentrações de veneno botrópico a fim de verificar sua capacidade de fornecer resposta eletroquímica de variação linear com as diferentes quantidades do analito. Ainda, avaliou-se sua característica de especificidade, que é a capacidade de o dispositivo

ser seletivo apenas ao veneno homólogo, isto é, aquele para o qual foi desenvolvido. Para isso, o sensor foi posteriormente exposto a venenos heterólogos de *Crotalus* (veneno crotálico) e de *Micrurus* (veneno elapídico), que não deveriam gerar alteração impedimétrica no sistema por não possuírem afinidade imunológica com os anticorpos antibotrópicos presentes nos transdutores.

A técnica de EIE também foi utilizada nas mesmas condições eletroquímicas anteriormente descritas empregando-se uma microcélula, conforme esquema da figura 13, construída em acrílico e com volume interno de 163 μL . Nela estiveram fixos os eletrodo de referência (fio de prata) e contra-eletrodo, um fio de ouro com uma base circular de 0,6 mm de diâmetro para promover a exposição de uma relativa grande área de troca eletrônica com o eletrodo de trabalho, uma placa de ouro onde uma extremidade foi funcionalizada para desempenhar a função de imunossensor e a outra permaneceu livre para se fazer o contato elétrico com o potenciostato.

Figura 13 – Arranjo experimental da microcélula eletroquímica para os testes de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica



Quando utilizado este microssistema, as soluções foram injetadas num capilar polimérico afixado na lateral inferior do acrílico, enquanto a saída de líquido se dava pelo lado oposto na região superior, estando o capilar posicionado acima da base

circular do contra-eletrodo, garantindo que esta estivesse completamente imersa a todo tempo. Ainda, a fim de evitar o vazamento de líquido no contato entre o acrílico e o substrato de ouro, um *o-ring* plástico foi inserido na base inferior do cubo de acrílico.

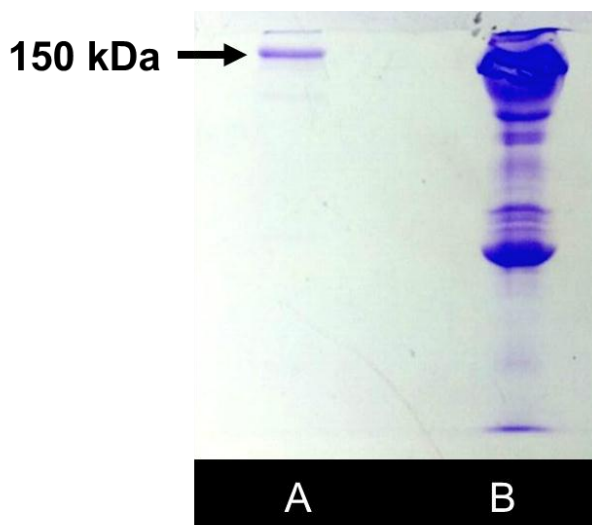
Para o teste de impedância, foram utilizados os seguintes volumes de líquidos: 150 μL de tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,4; 150 μL de tampão Afilit, e 50 μL de veneno, com tempos de incubação de 5 minutos para o tampão Tris, 5 minutos para o tampão Afilit e 20 minutos para o veneno. Ademais, após cada eluição a célula foi lavada com 1,5 mL de água deionizada para remoção do excesso de sais residuais provenientes do tampão, e antes de cada análise foi feita ambientação do volume interno da microcélula com 300 μL de eletrólito.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Purificação dos anticorpos antitetratípicos a partir de plasma equino

A pureza dos anticorpos obtidos por meio da cromatografia de imunoafinidade pode ser vista na figura 14, onde se verifica no gel de poliacrilamida a presença de uma única banda intensa, na região próxima de 150 kDa, relativa às imunoglobulinas G (MAYFORTH, 1993) do plasma equino, a qual aparece em alta intensidade em B. Também se destaca uma banda acima daquela anteriormente citada, de menor intensidade, provavelmente relativa às imunoglobulinas M do mesmo fluido biológico.

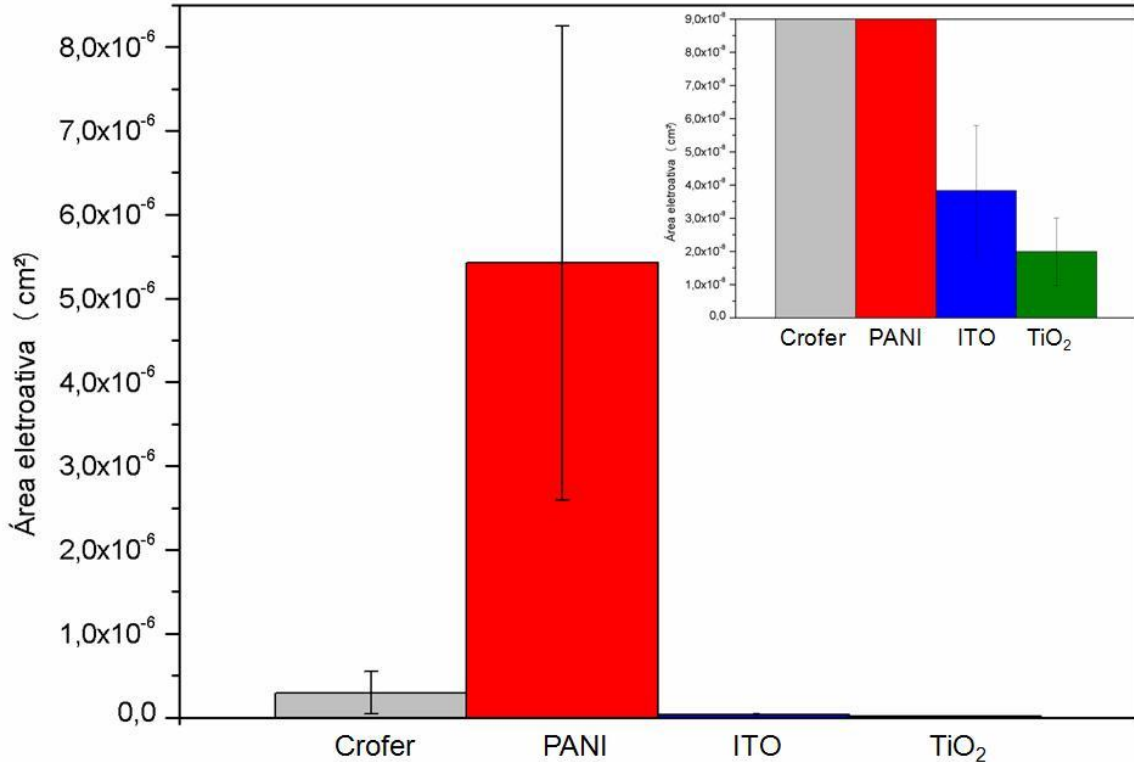
Figura 14 – Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE das amostras de anticorpos purificados(A) e plasma de cavalo hiperimunizado contra veneno de *Bothrops*(B)



Pelo perfil eletroforético de múltiplas bandas proteicas da amostra B é possível confirmar que a purificação dos anticorpos por cromatografia de imunoafinidade foi eficiente, já que vários dos componentes revelados no gel em B não aparecem na amostra purificada A, mas apenas os anticorpos de interesse.

Obtidos os anticorpos em alto grau de pureza, os substratos utilizados como transdutores nesta pesquisa foram inicialmente avaliados quanto à área eletroativa de suas superfícies, com resultado expresso na figura 15.

Figura 15 – Histograma da área eletroativa dos substratos transdutores empregados no desenvolvimento dos imunossensores e ampliação representando valores de área eletroativa até $9,0 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$ para os mesmos materiais



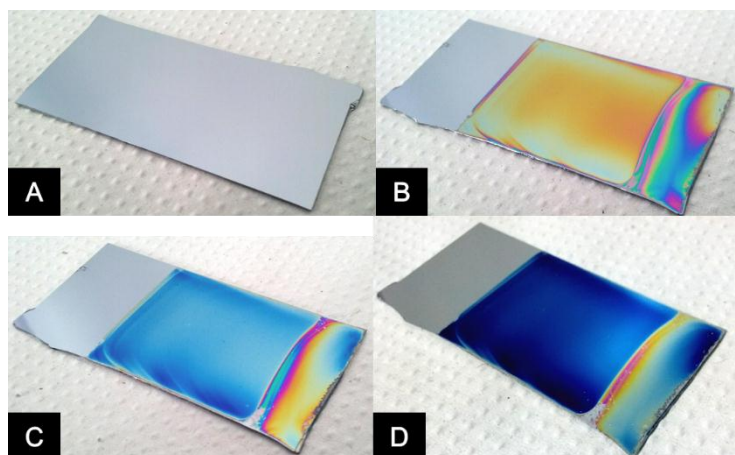
Os valores obtidos apontam para uma maior área eletroativa do transdutor de PANI ($5,42 \cdot 10^{-6} \pm 2,83 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2$), o que provavelmente se deve à alta condutividade do sal de esmeraldina, bem como à expressiva presença de cargas neste polímero, apresentando maiores superfícies de troca de carga com a sonda redox de ferricianeto de potássio. Em seguida, o aço foi o que apresentou maior área eletroativa ($2,97 \cdot 10^{-7} \pm 2,52 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2$), à frente dos substratos de ITO ($3,82 \cdot 10^{-8} \pm 1,98 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2$) e TiO₂ ($1,99 \cdot 10^{-8} \pm 1,02 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2$), que apresentaram valores muito próximos.

De modo geral, considerando as áreas totais dos substratos expostas ao eletrólito, todos apresentaram pequena área eletroquimicamente ativa, característica que deve ser atentamente considerada na avaliação do desempenho dos sensores, de modo que uma possibilidade de otimização da resposta desses dispositivos seria alcançada com a obtenção de maiores áreas passíveis de transferência de carga.

5.2 Biossensor de TiO₂

A figura 16 mostra as etapas de produção do substrato de dióxido de titânio sobre substrato de silício. Após a emersão da placa da solução precursora de tetraisopropóxido de titânio, houve uma região do substrato que aglomerou líquido, gerando uma descontinuidade do filme, como se vê nas imagens.

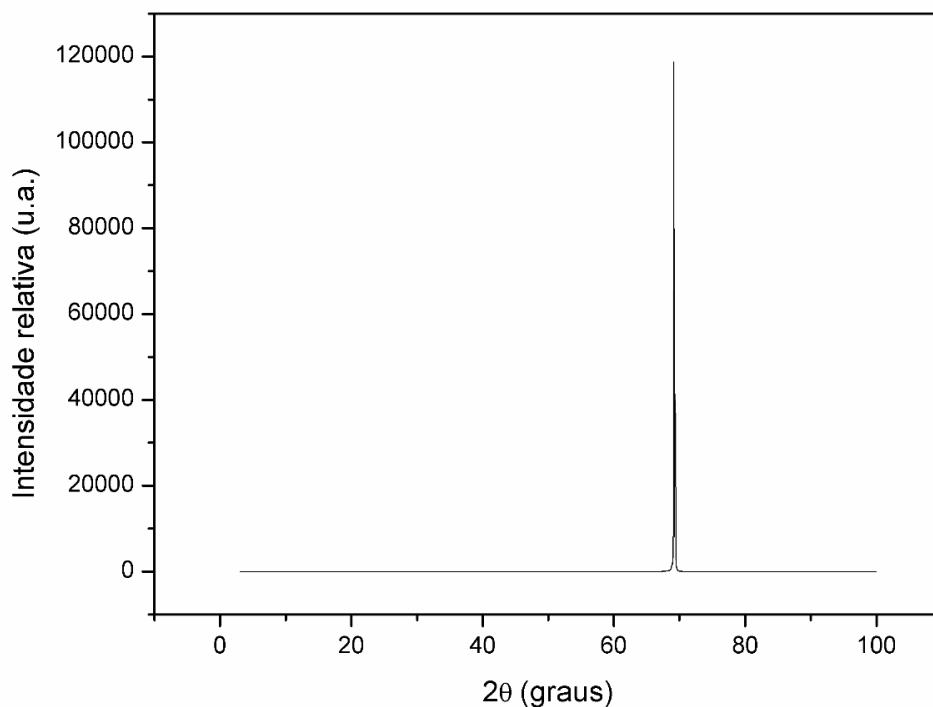
Figura 16 – Produção de TiO₂ pelo método sol-gel: (A) substrato de Si; (B) substrato após emersão na solução precursora; (C) substrato após aquecimento a 100°C por 15 minutos e (D) substrato após aquecimento a 500°C por 2 horas



Para uso como substrato transdutor no imunossensor, a placa de TiO₂ foi cortada em quadrados de área de 1 cm² aproximadamente a partir, exclusivamente, da região mais uniforme (central) do material obtido para evitar áreas de descontinuidade de condutividade e rugosidade na superfície.

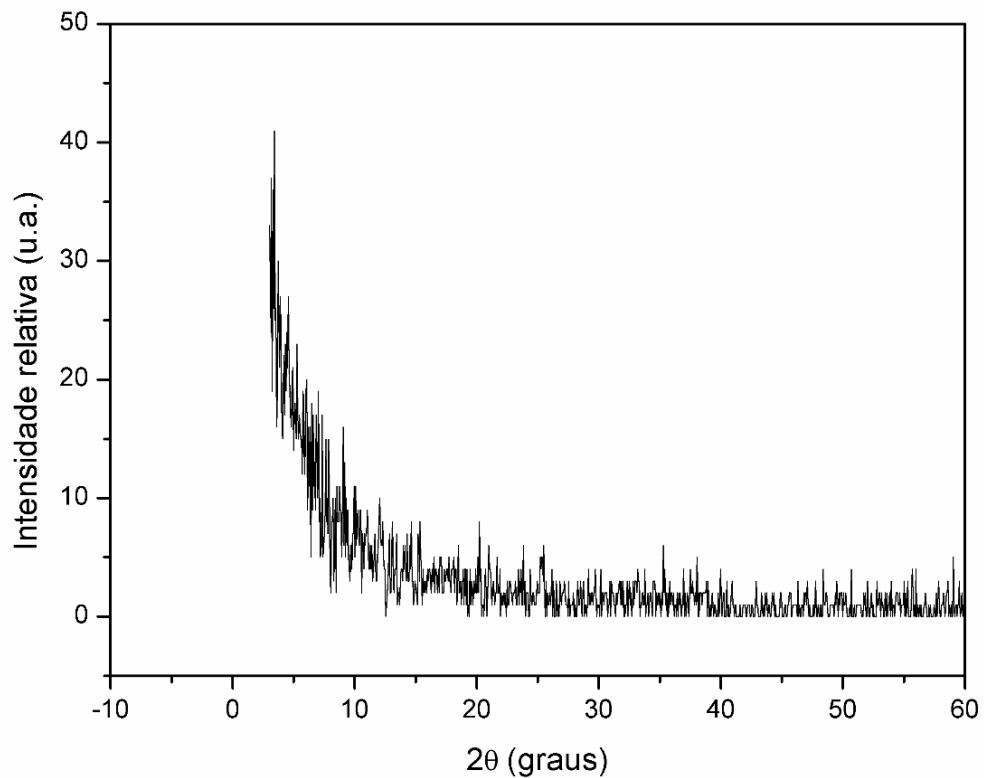
Para todas as análises de DRX, os resultados foram comparados aos padrões da literatura, a partir do banco de dados da *Inorganic Crystal Structure Database* (ICSD, 1997) e *Acta Crystallographica* (NEWNHAM, FANG e SANTORO, 1964), sendo que o primeiro teste realizado, figura 17, constituiu-se de uma análise do substrato contendo o filme depositado pelo método sol-gel usando-se no difratômetro de raios-X um detector pontual em ângulo normal 2 θ .

Figura 17 – DRX da amostra AM160237 (substrato + TiO₂ / pontual / normal)



Por este difratograma é possível observar inicialmente apenas um pico de alta intensidade num ângulo 2θ próximo a 69° . Quando analisado pelo *software*, houve detecção de um pico de distância interplanar “d” igual a $1,35923 \text{ \AA}$, que se comparado aos padrões constantes na literatura para o silício estaria relacionado ao pico de $2\theta = 69,131^\circ$ ($d = 1,35923 \text{ \AA}$), de índices de Müller hkl = (4 0 0), que poderia estar associado ao substrato, uma vez que para o modo normal neste ângulo, os raios-X conseguem permear o filme atingindo o substrato. Além disso, o *software* detectou um pico em $d = 3,53995 \text{ \AA}$, possivelmente correspondente ao pico padrão principal de TiO₂ na fase anatase [$d = 3,5165 \text{ \AA}$, $2\theta = 27,434^\circ$ e hkl = (101)]. Para melhor visualização deste pico, o mesmo gráfico foi plotado até o ângulo de 60° (figura 18) a fim de eliminar o intenso pico anteriormente atribuído ao silício e ampliar outros possivelmente presentes.

Figura18 – DRX ampliado da amostra AM160237 até ângulo de 60°



A rampa observada nos primeiros ângulos é devida ao fato de que neste momento o tubo emissor de raios-X está praticamente em fase com o receptor, não representando portanto uma consequência de difração da amostra. Por este difratograma, não foi possível assegurar a presença do pico relativo ao TiO_2 .

Com o intuito de intensificar os picos no difratograma e obter maior revelação de sinais, facilitando a identificação dos componentes presentes na amostra, um teste usando detector de área no difratômetro foi realizado, já que deste modo os raios-X incidem sobre toda a área do material e não apenas num ponto específico, gerando o resultado apresentado na figura 19 e sua ampliação até o ângulo de 60° na figura 20.

Figura 19 – DRX da amostra AM160238 (substrato + TiO₂ / área / normal)

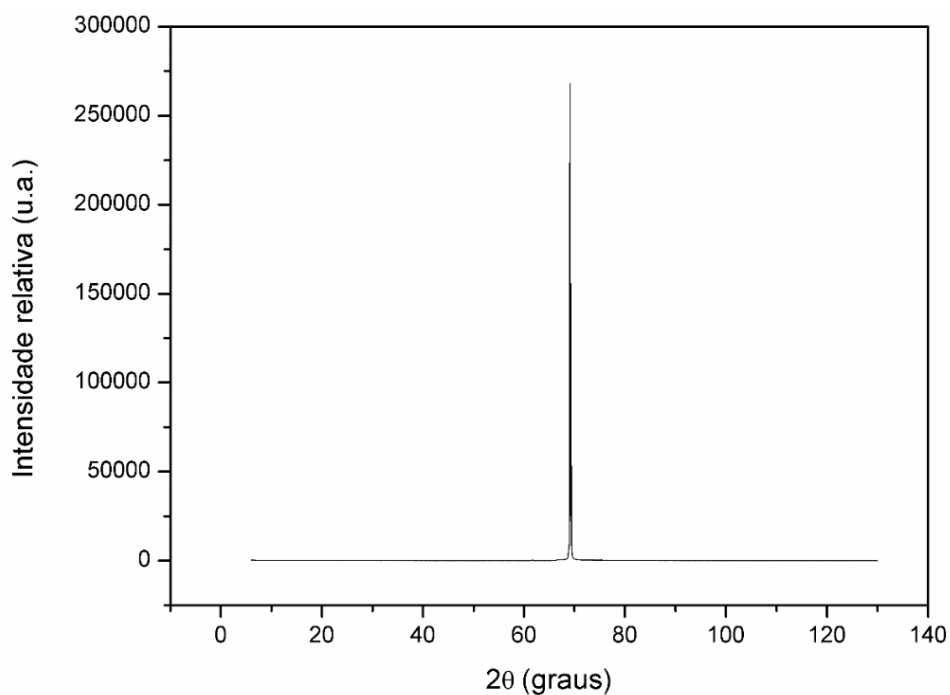
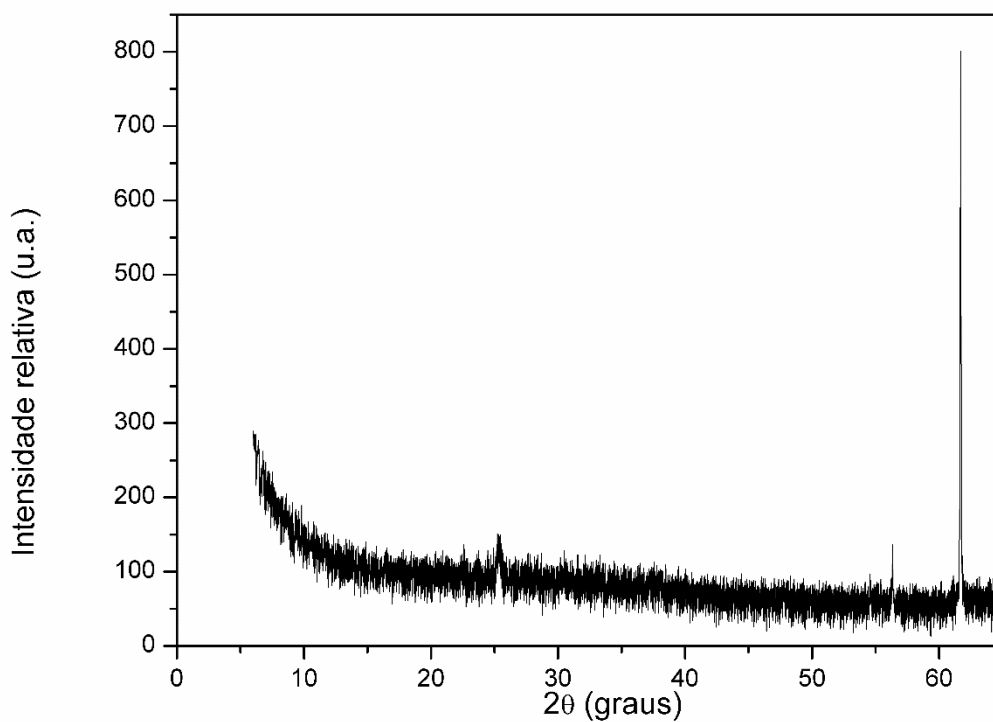


Figura 20 – DRX ampliado da amostra AM160238 até ângulo de 65°

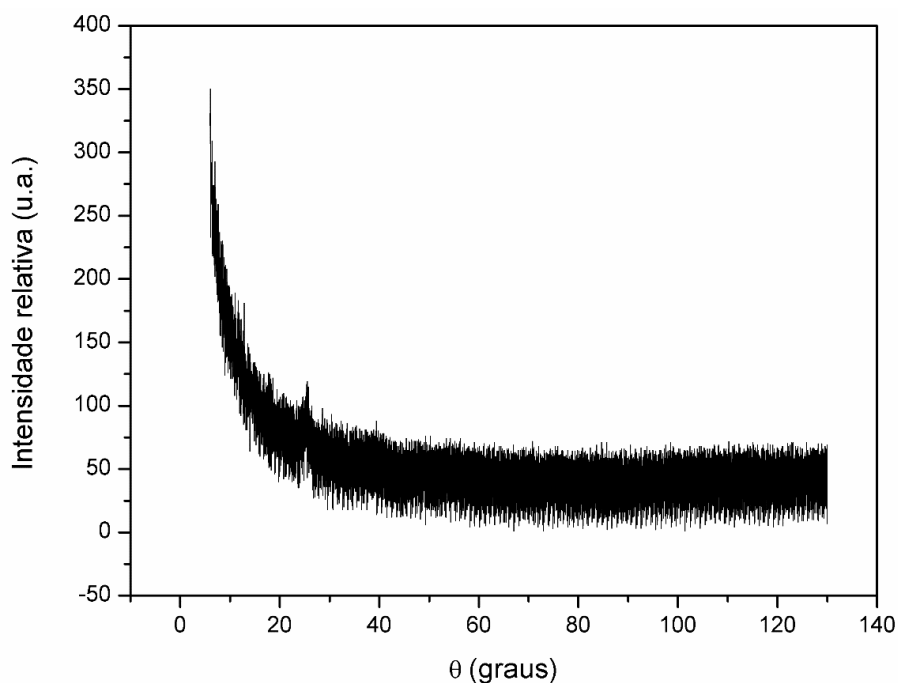


Usando o detector de área, os picos atribuídos ao Si e ao TiO₂ ficaram mais intensos e foram observados também alguns outros. Um pico em $2\theta = 61,6858^\circ$ foi atribuído ao TiO₂ (2 1 3) na fase anatase, já aquele em $2\theta = 56,3478^\circ$ apareceu (deslocado)

também na amostra de Si puro da amostra AM160241, podendo estar associado desta maneira ao Si (3 1 1), especialmente porque este teste ocorreu no modo normal de ângulo 2θ , de modo que os raios-X podem ter atravessado a amostra, atingindo o substrato.

Quando analisado no modo de difração de baixo ângulo, a amostra apresentou o perfil da figura 21 abaixo, com características de suas camadas mais superficiais já que consistiu da difração de raios-X em ângulos rasantes θ .

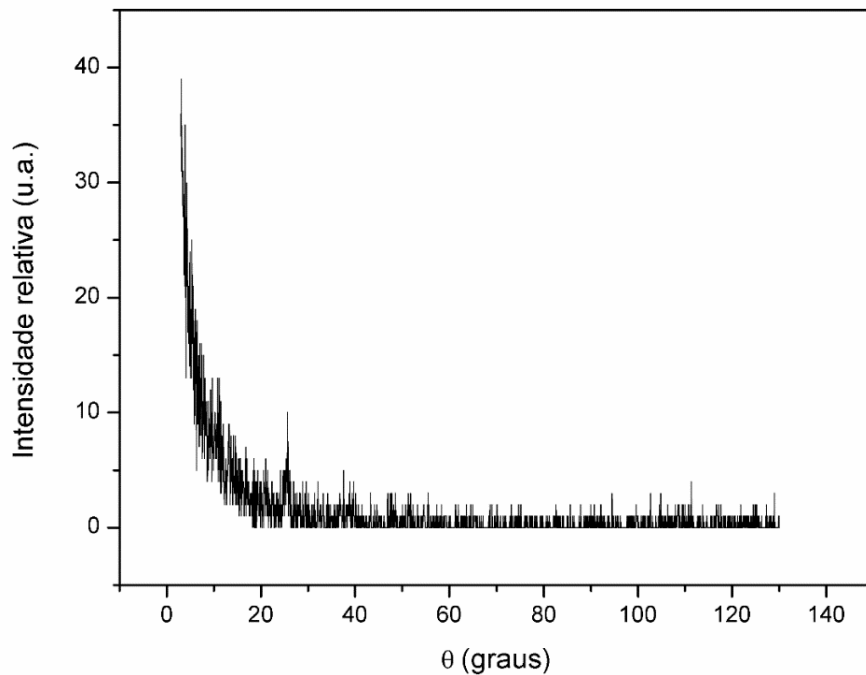
Figura 21 – DRX da amostra AM160239 (substrato + TiO₂ / área / filme)



Verificou-se o aparecimento de um pico próximo a 25°, como já verificado anteriormente e não revelou aquele constatado nas proximidades de 70°, mostrando que de fato não há silício na superfície do material, mas apenas TiO₂.

De maneira geral, os testes usando detector de área foram mais rápidos, mas apresentaram baixa resolução, de modo que a detecção pontual foi mais interessante para esta amostra, produzindo resultados mais nítidos e livres de ruídos, como aquele apresentado na figura 22.

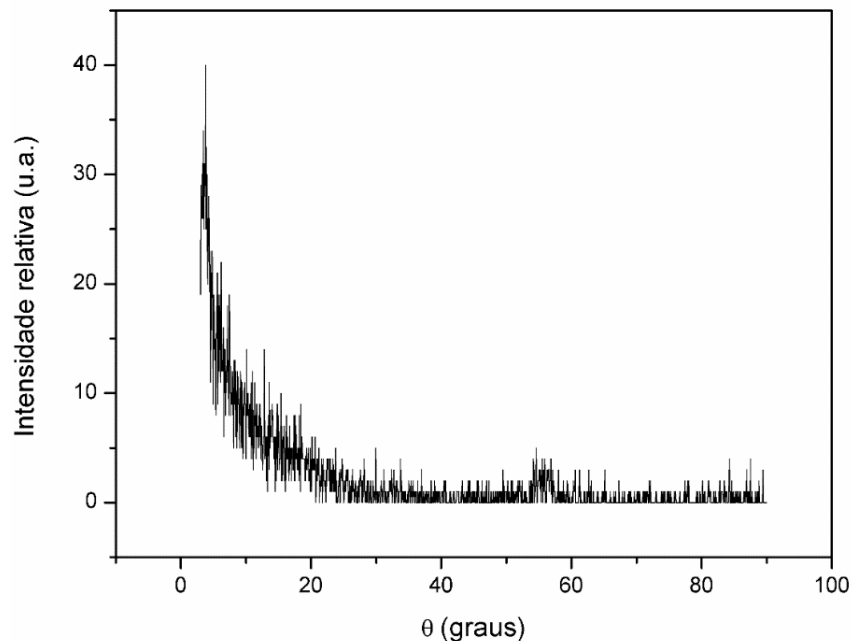
Figura 22 – DRX da amostra AM160240 (substrato + TiO₂ / pontual / filme)



Neste teste, o *software* detectou apenas um pico em um ângulo θ próximo a 25° , característico do TiO₂ (1 0 1) anatásio como no teste anterior, mas mais evidente em função da menor interferência de ruídos.

Com o objetivo de verificar quais picos estavam associados ao substrato e exclusivamente ao filme depositado, a análise de DRX foi feita para o substrato de silício antes da deposição pelo método sol-gel, com o resultado apresentado na figura 23 para ângulos rasantes.

Figura 23 – DRX da amostra AM160241 (substrato puro / pontual / filme)



A contribuição exclusiva do Si foi verificada devido ao não aparecimento do pico próximo de 25°, que fora com razão atribuído ao dióxido de titânio.

Houve ainda o surgimento de um pico próximo a 55°, que também foi encontrado na amostra AM160238 como $2\theta = 56,3478^\circ$, isto é, um pouco deslocado neste teste. Caso este não fosse um sinal ocasionado por ruído, poderia estar associado ao Si (3 1 1) cujo ângulo padrão é de $2\theta = 56,124^\circ$

Quando submetido à difração no modo normal 2θ , figura 24, o material voltou a exibir um pico bastante pronunciado em ângulo próximo a 70° e outro de grande intensidade em 2θ próximo a 35°, que pode ser visto na ampliação mostrada na figura 25, o que se justifica pelo uso do silício monocristalino.

Figura 24 – DRX da amostra AM160242 (substrato puro / pontual / normal)

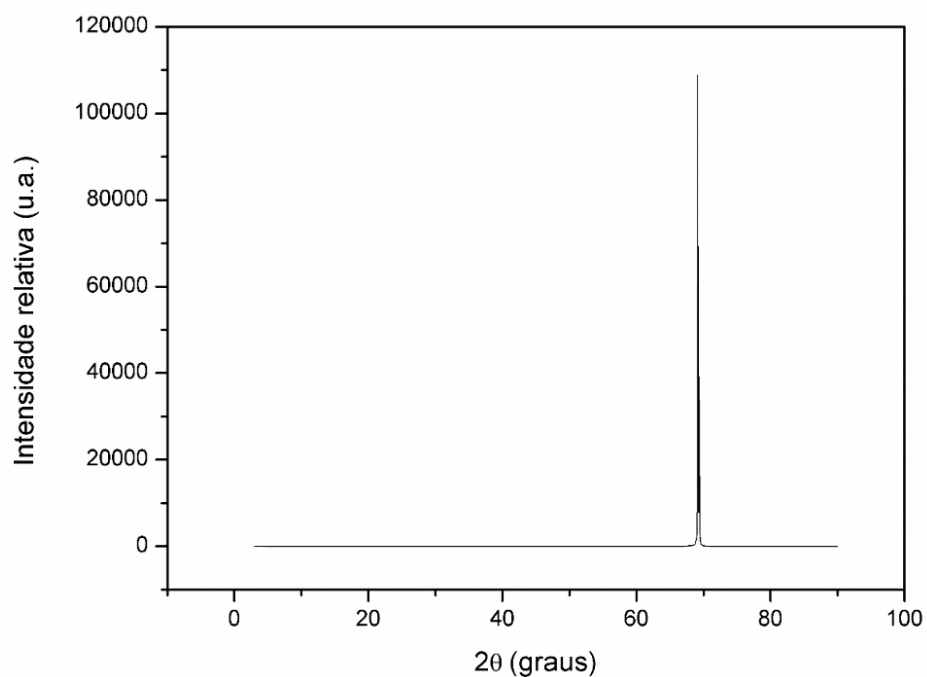
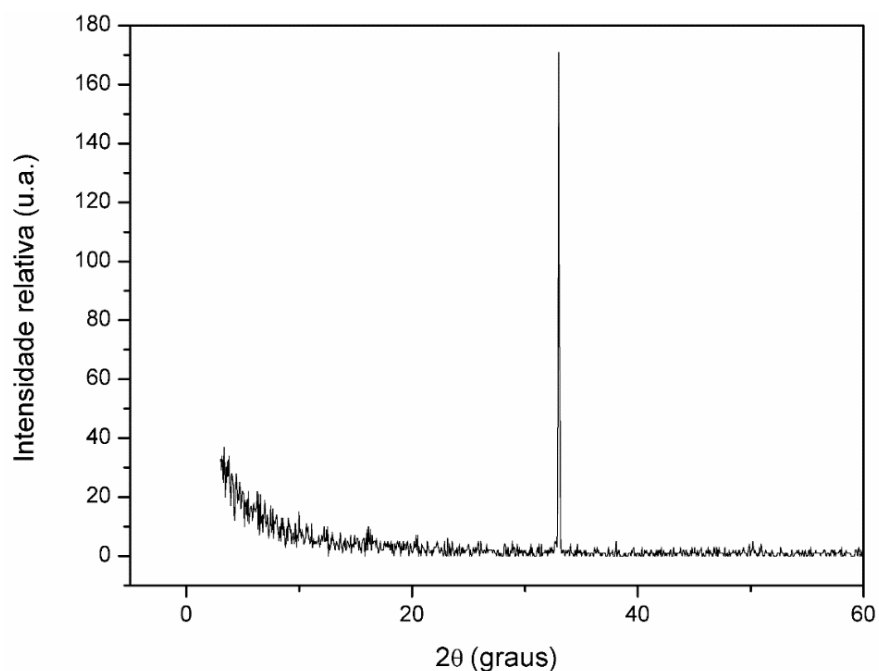


Figura 25 – DRX ampliado da amostra AM160242 até ângulo de 60°

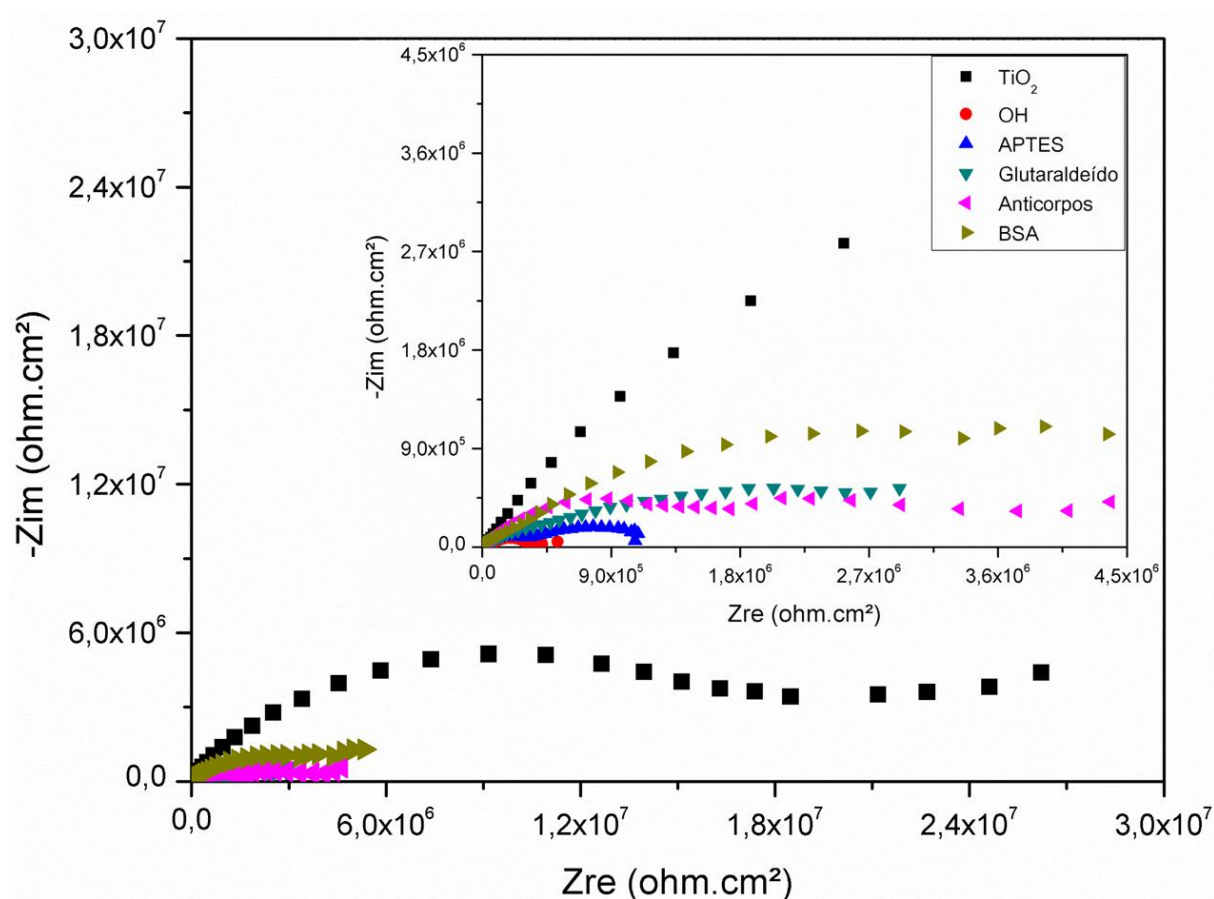


Considerando a referência consultada para a interpretação dos difratogramas (ICSD, 1997), o pico próximo a 70° foi atribuído à orientação (4 0 0) do silício. Todavia, analisando a referência Acta Crystallographica (1964), o pico em $2\theta = 32,97^\circ$, que

não aparece no padrão aludido pela ICSD, seria associado ao Si (1 1 2) de intensidade de 100%.

Uma vez caracterizado o material produzido, o TiO_2 foi avaliado como potencial substrato transdutor para aplicação no imunossensor. Para tanto, inicialmente foi conduzido um teste de EIE para o monitoramento impedimétrico de suas etapas de funcionalização, estando o resultado apresentado na figura 26.

Figura 26 – Monitoramento impedimétrico das etapas de funcionalização do substrato de TiO_2 e ampliação para impedâncias real e imaginária até $3,0 \times 10^7$ ohm.cm²

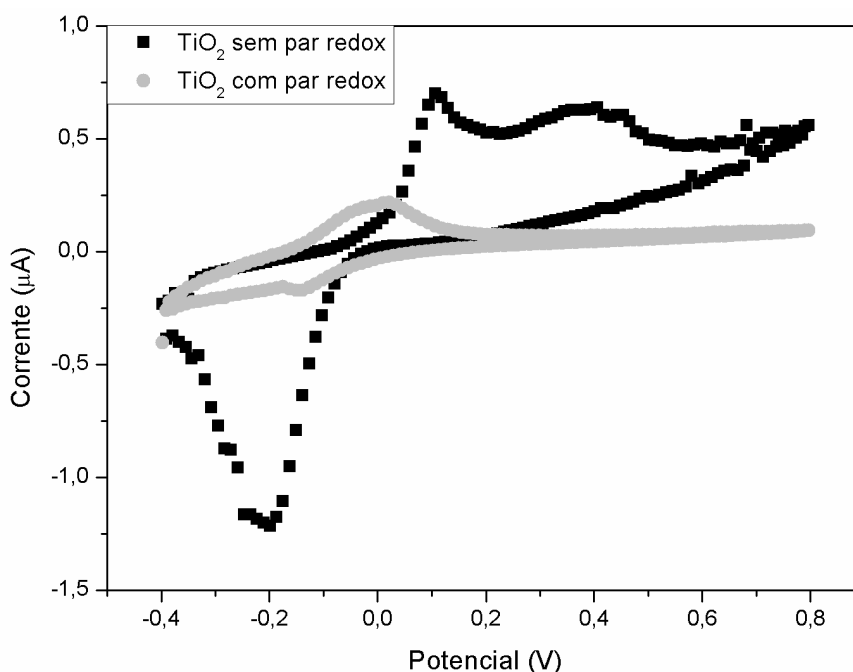


Pela análise do diagrama de Nyquist acima, verifica-se um grande decréscimo de impedância após a hidroxilação do substrato, já que os grupos hidroxila são portadores de carga e potenciais trocadores de elétrons com a sonda redox, ao passo que a etapa de silanização com o APTES provocou um aumento impedimétrico no sistema, visto que este silano possui em sua estrutura química

grupos $-CH_3$ que a ele conferem caráter isolante. O mesmo comportamento foi observado para o glutaraldeído, com proporção de região apolar superior à porção polar, também gerando uma barreira à passagem de corrente elétrica no sistema. Quando imerso nas soluções de anticorpo e albumina, foram verificados maiores aumentos de impedância, especialmente de resistência à transferência de carga, já que o substrato adquiriu caráter ainda mais isolante, o que é razão das extensas cadeias carbônicas dessas proteínas.

Em seguida, um ensaio de voltametria cíclica foi conduzido na ausência e presença de par redox a fim de se verificar o perfil voltamétrico do TiO_2 nessas condições, com resultado apresentado na figura 27.

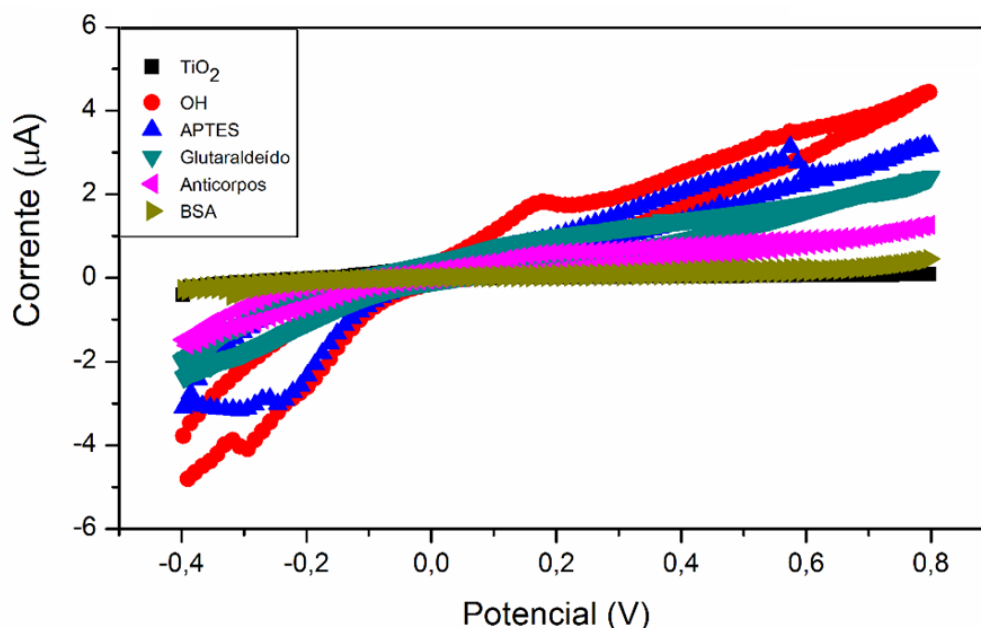
Figura 27 – Perfil voltamétrico do TiO_2 em meio eletrolítico com e sem par redox



Com base neste voltamograma, verificou-se que o TiO_2 na ausência de par redox apresentou picos anódico e catódico mais acentuados que aqueles observados para a condição de presença do par redox, o que tornaria dispensável a aplicação da sonda para o monitoramento voltamétrico de suas etapas de funcionalização. No entanto, para efeito de comparação com os resultados obtidos para os demais materiais estudados nesta pesquisa, a investigação por voltametria cíclica ocorreu com o par $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, que também gerou a formação de picos redox, ainda que

com menores valores de corrente se comparados à primeira condição. O resultado do referido monitoramento voltamétrico é apresentado na figura 28.

Figura 28 – Monitoramento voltamétrico das etapas de funcionalização do substrato de TiO₂



Previamente à adição de qualquer reagente, o substrato revelou a presença dos picos anódico e catódico da sonda redox, sendo a intensidade desses picos aumentada com a hidroxilação do aço, já que os grupos -OH são potenciais trocadores de carga com o par ferro/ferricianeto de potássio. Para as demais etapas, foi observada uma tendência de achatamento dos picos, o que se justifica novamente pelo caráter isolante das soluções empregadas, principalmente aquelas das proteínas, que bloqueiam eletricamente o substrato, impedindo a troca de cargas com o meio e gerando um perfil voltamétrico desprovido de picos de oxidação ou redução.

Diferente do observado no resultado de monitoramento impedimétrico das etapas de funcionalização, o substrato de TiO₂ utilizado para o teste de exposição aos venenos gerou dois semicírculos no diagrama de Nyquist (figura 29), o que significa que houve neste material duas interfaces de troca de carga com o eletrólito, comportamento eletroquímico representado pelo circuito equivalente proposto na figura 30.

Figura 29 – Diagrama de Nyquist do biossensor de TiO₂ frente a veneno botrópico nas concentrações de 0,1; 1; 2; 5 e 10 µg.mL⁻¹ e ampliação do semicírculo a altas frequências

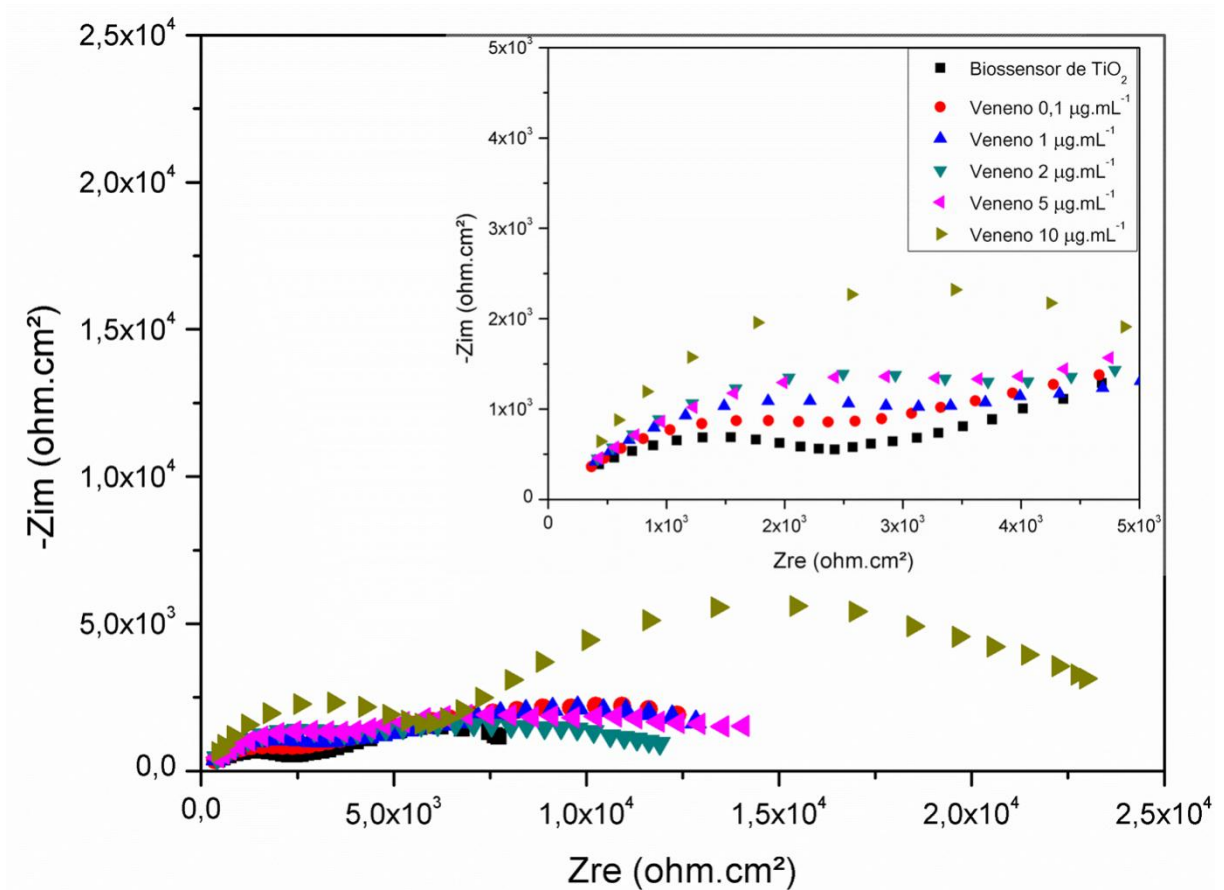
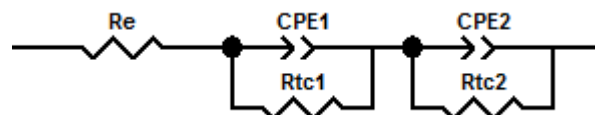


Figura 30 – Circuito equivalente proposto para a simulação dos resultados do biossensor de TiO₂



A presença de uma segunda interface eletrodo-eletrólito neste caso possivelmente está associada ao silício semiconductor onde se depositou o filme de TiO₂, pois o atrito entre as amostras de substrato (que foram armazenadas num mesmo recipiente antes de sua funcionalização) é capaz de gerar ranhuras na superfície do

material, retirando em parte as finas camadas de dióxido de titânio e permitindo que o eletrólito atinja o silício no momento da medida eletroquímica. Dessa maneira, o semicírculo gerado no domínio das altas frequências pode ser atribuído ao TiO₂ (par CPE1-R_{tc1} do circuito equivalente), superfície mais externa e que por ser mais condutora que o Si apresentou menor impedância, enquanto o semicírculo formado em menores frequências pode ser resultado da mencionada exposição do substrato de silício (par CPE2-R_{tc2}).

A fundamentação dessa proposição se deu pela qualidade do ajuste da curva a partir do circuito equivalente proposto, com valores de qui-quadrado, em média, na ordem de 10⁻⁴. Os valores simulados dos elementos do circuito são apresentados na tabela 5.

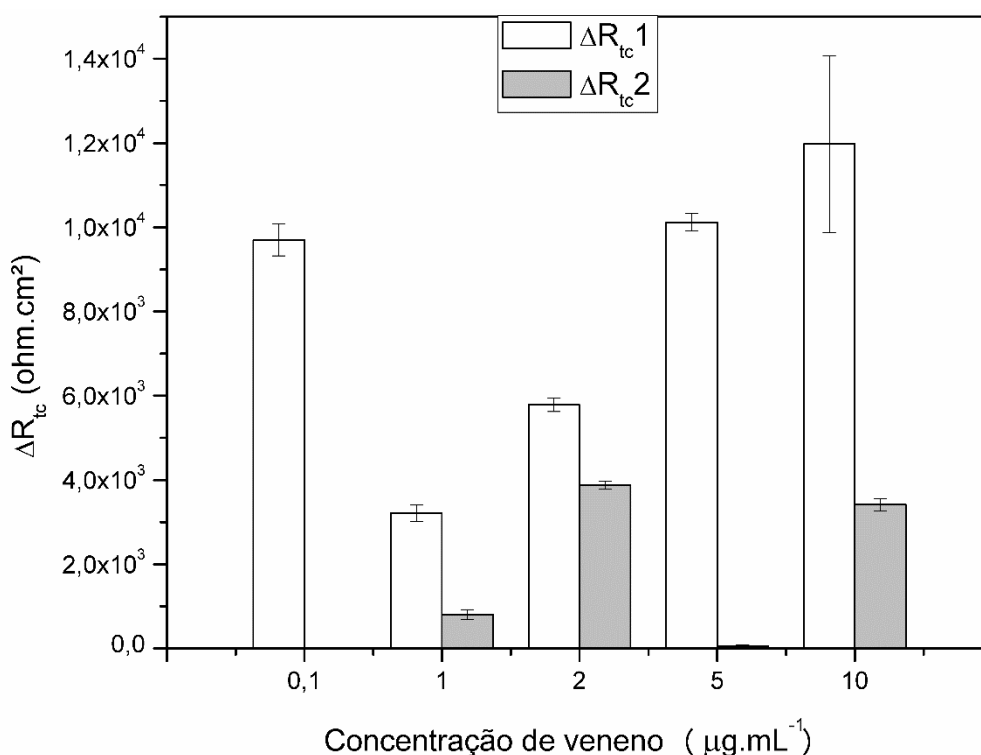
Tabela 5 – Parâmetros do circuito equivalente simulado para o biossensor de TiO₂ na ausência e presença de venenos botrópicos

Amostra	Re (Ω.cm ²)	R _{tc1} (Ω.cm ²)	CPE1 (F.cm ²)	R _{tc2} (Ω.cm ²)	CPE2 (F.cm ²)
Biossensor de TiO ₂	2,46 ± 2,22	8510,67 ± 1014,5	1,54 . 10 ⁻⁴ ± 1,13 . 10 ⁻⁵	2476,00 ± 67,80	2,54 . 10 ⁻⁶ ± 4,36 . 10 ⁻⁸
Veneno 0,1 µg.mL ⁻¹	81,70 ± 19,66	18207 ± 379,04	7,61 . 10 ⁻⁵ ± 8,91 . 10 ⁻⁶	1524,67 ± 114,21	1,09 . 10 ⁻⁶ ± 2,14 . 10 ⁻⁷
Eluição 0,1 µg.mL ⁻¹	18,07 ± 10,12	12725,00 ± 1553,84	9,10 . 10 ⁻⁵ ± 8,42 . 10 ⁻⁶	1562,67 ± 128,10	1,65 . 10 ⁻⁶ ± 3,12 . 10 ⁻⁷
Veneno 1 µg.mL ⁻¹	39,50 ± 12,39	15936,33 ± 188,272	8,00 . 10 ⁻⁵ ± 4,731 . 10 ⁻⁷	2371,33 ± 105,51	1,03 . 10 ⁻⁶ ± 1,01 . 10 ⁻⁸
Eluição 1 µg.mL ⁻¹	16,25 ± 14,70	9195,00 ± 540,90	1,14 . 10 ⁻⁴ ± 1,09 . 10 ⁻⁵	1666,67 ± 92,36	2,18 . 10 ⁻⁶ ± 7,51 . 10 ⁻⁷
Veneno 2 µg.mL ⁻¹	19,66 ± 13,98	14978,00 ± 156,50	3,13 . 10 ⁻⁵ ± 1,42 . 10 ⁻⁶	5544,00 ± 86,18	1,98 . 10 ⁻⁶ ± 2,15 . 10 ⁻⁷
Eluição 2 µg.mL ⁻¹	18,59 ± 16,76	5423,33 ± 585,47	1,93 . 10 ⁻⁴ ± 6,81 . 10 ⁻⁵	1425,67 ± 282,48	1,73 . 10 ⁻⁶ ± 4,07 . 10 ⁻⁷
Veneno 5 µg.mL ⁻¹	271,50 ± 12,50	15531,00 ± 210,15	3,86 . 10 ⁻⁵ ± 9,22 . 10 ⁻⁷	1484,33 ± 25,17	5,48 . 10 ⁻⁷ ± 4,14 . 10 ⁻⁸
Eluição 5 µg.mL ⁻¹	20,94 ± 14,05	5349,33 ± 306,84	2,26 . 10 ⁻⁴ ± 7,95 . 10 ⁻⁵	1809,67 ± 395,18	2,94 . 10 ⁻⁶ ± 3,13 . 10 ⁻⁷
Veneno 10 µg.mL ⁻¹	171,07 ± 13,21	17347,00 ± 2099,81	2,00 . 10 ⁻⁵ ± 3,33 . 10 ⁻⁶	5221,33 ± 142,53	1,38 . 10 ⁻⁷ ± 6,69 . 10 ⁻⁹

O que se observa no diagrama de Nyquist e a partir dos parâmetros constantes na tabela acima é uma resposta impedimétrica mais coerente do ponto de vista

imunológico para o primeiro arco, já que se nota um aumento de seu raio à medida que o sensor foi exposto às maiores concentrações de veneno, ao passo que o semicírculo atribuído ao substrato de silício em baixas frequências apresentou perfil impedimétrico mais randômico. A figura 31 apresenta a relação entre a concentração de veneno botrópico testada e a variação das resistências à transferência de carga associadas ao TiO_2 (ΔR_{tc1}) e ao silício (ΔR_{tc2}), ressaltando-se que para a obtenção do parâmetro ΔR_{tc} foi considerada a diferença entre as resistências R_{tc} para o sensor exposto ao veneno em determinada concentração e para sua condição basal antes desta exposição.

Figura 31 – Variação das resistências à transferência de carga R_{tc1} e R_{tc2} para o biossensor de TiO_2 exposto a veneno botrópico nas concentrações de 0,1; 1; 2; 5 e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$



Para ambas as interfaces em análise houve variação na resistência à transferência carga, no entanto, como a maior sensibilidade de sistemas eletroquímicos a fenômenos de interface se dá no domínio das baixas frequências, acredita-se que um biossensor composto por substrato transdutor de filme homogêneo e uniforme de dióxido de titânio poderia gerar respostas impedimétricas bastante condizentes com

a detecção imunológica do analito. Contudo, em função da baixa disponibilidade de anticorpos e antígenos para esta pesquisa e frente à constatação de que, de modo geral, o dispositivo reconheceu o seu analito de interesse, optou-se por não testar este substrato frente aos venenos heterólogos de *Crotalus* e *Micrurus*. Ademais, o eletrodo de TiO₂ se mostrou como promissor substrato transdutor para a aplicação neste tipo de dispositivo, sendo recomendado novos testes com este material quando se constatar a contribuição impedimétrica exclusiva do filme de dióxido de titânio, avaliando inclusive sua sensibilidade ao veneno homólogo e não aos heterólogos.

5.3 Biossensor de ITO

Com o objetivo de verificar a efetividade da funcionalização do ITO, este substrato teve seu perfil topográfico analisado por Microscopia de Força Atômica. As figuras 32 e 33 tratam-se das imagens obtidas por AFM do substrato de ITO antes de sua funcionalização, e do biossensor de ITO exposto a veneno botrópico.

Figura 32 – Imagem de Microscopia de Força Atômica do substrato de ITO

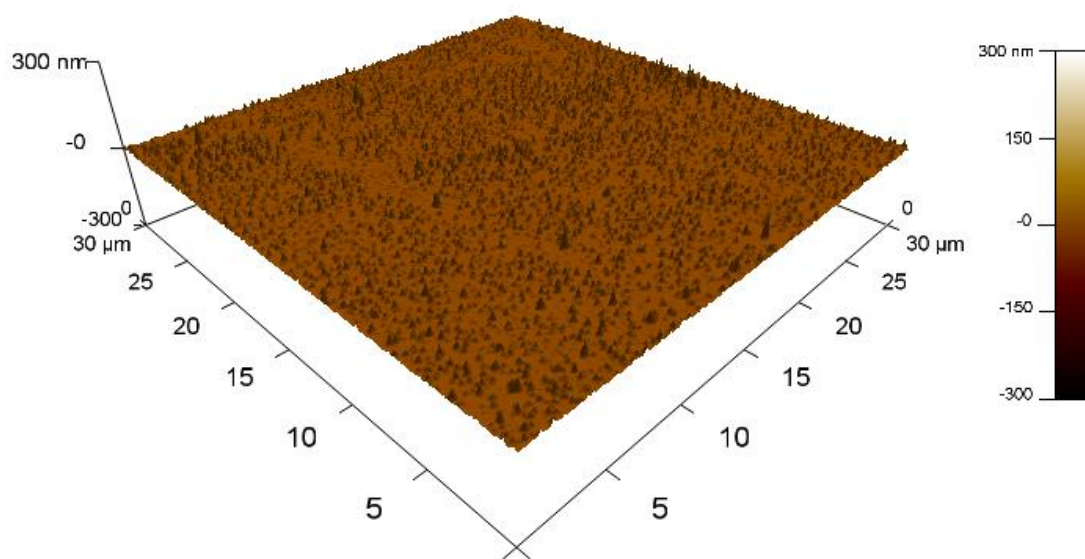
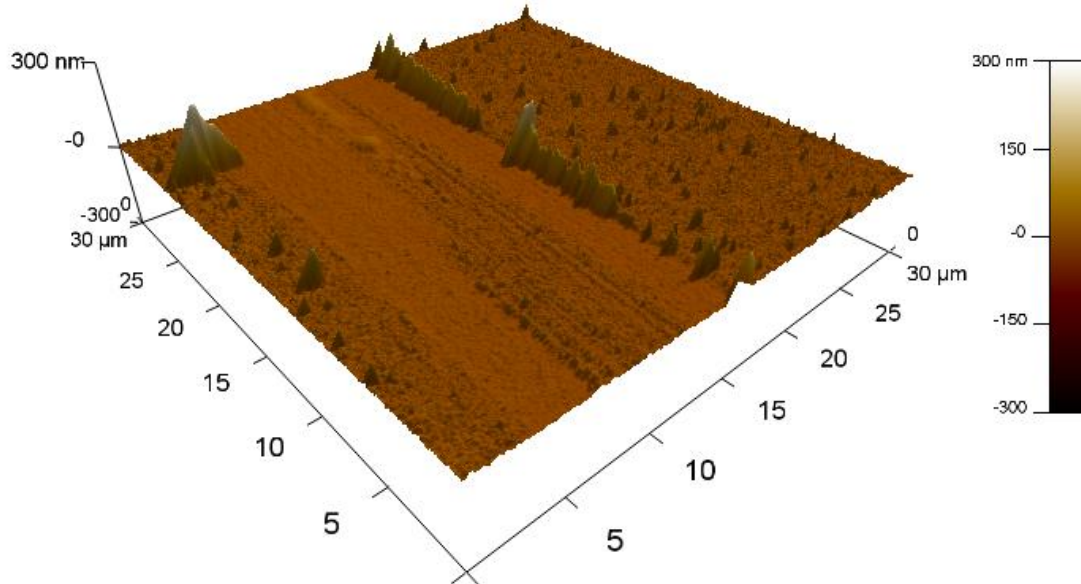


Figura 33 – Imagem de Microscopia de Força Atômica do substrato de ITO funcionalizado contendo veneno botrópico e região de risco induzido para cálculo da espessura da camada de funcionalização e veneno

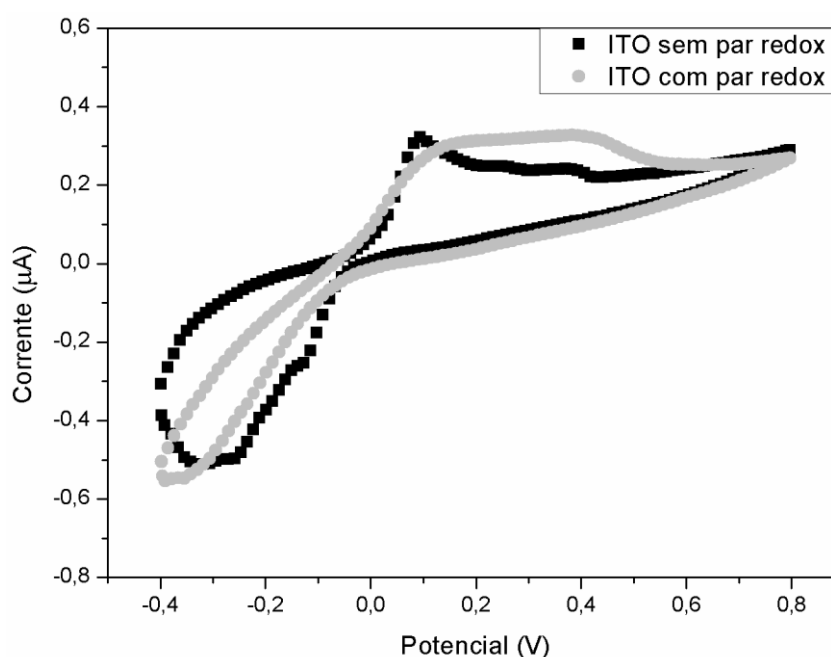


As imagens revelam que antes da funcionalização, o ITO apresentava estrutura relativamente homogênea, com rugosidade média, RMS, de 4,620 nm, ao passo que depois de funcionalizado e exposto ao analito, o sensor apresentou uma rugosidade de 5,499 nm. Ainda, nota-se que na amostra contendo o veneno, picos de maior altitude topográfica estão presentes, o que confirma a efetividade da deposição das camadas automontadas durante a funcionalização. Cabe ressaltar que na figura 33, os maiores relevos se devem a um acúmulo de massa gerado às margens da região de risco, sendo estes desconsiderados para a análise de rugosidade e espessura. O cálculo de espessura realizado pelo *software* do microscópio foi feito a partir da média aritmética das espessuras de três regiões aleatórias da superfície, considerando a diferença de altura entre a área do risco (composta apenas pelo ITO) e uma porção distante desta região. Assim, pôde-se inferir que as etapas de funcionalização e incubação no veneno causaram um ganho de $11,33 \pm 0,58$ nm de espessura, valor muito próximo ao encontrado na literatura para o comprimento de um anticorpo (UCHIYAMA *et al.*, 2010; RETH, 2013 e SABER *et al.*, 2011), que é de fato a molécula de maior contribuição em comprimento entre as empregadas na funcionalização, já que o silano e o aldeído têm cadeia curta e a albumina, que como o anticorpo também é uma proteína, é depositada apenas na base do substrato.

Inúmeros testes preliminares foram conduzidos com o substrato de ITO a fim de verificar a efetividade de sua funcionalização, a estabilidade eletroquímica do sensor, a capacidade de os anticorpos do substrato interagirem com o analito em diversas concentrações e a possibilidade de se reutilizar o sistema usando um tampão de eluição para romper a ligação imuno específica entre antígeno e anticorpo sem interferir na qualidade do dispositivo.

Previamente à análise das etapas da funcionalização do ITO, no entanto, este substrato foi submetido a um teste de voltametria cíclica na ausência e na presença do par redox $K_4[Fe(CN)_6]$ e $K_3[Fe(CN)_6]$ para se avaliar o perfil da curva obtida antes de qualquer modificação bioquímica e a contribuição da sonda no resultado obtido, que é apresentado na figura 34.

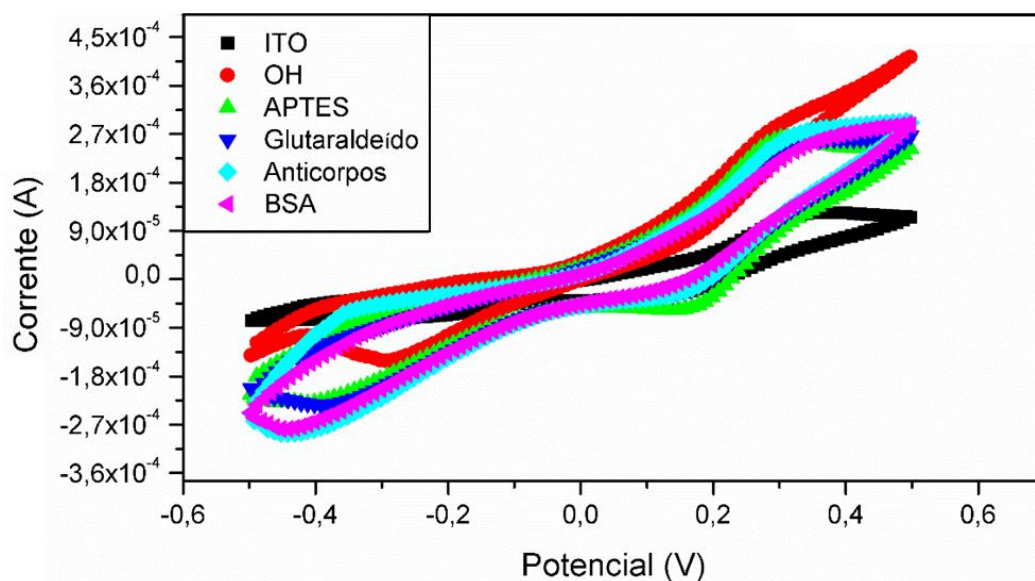
Figura 34 – Perfil voltamétrico do ITO em meio eletrolítico com e sem par redox



O gráfico revela que mesmo na ausência do par redox, o ITO gera um pico bem definido no ramo anódico e outro mais alargado na região catódica, ao passo que na presença dos íons $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, os picos passam a ser menos definidos. No entanto, para as duas situações foram atingidos valores mínimo e máximo de corrente muito próximos, empregando-se, então, o par redox para o posterior estudo voltamétrico. O resultado da voltametria cíclica aplicada à investigação da funcionalização do material consta na figura 35 e teve sua configuração alterada

quanto à janela de potenciais aplicada, usando-se ciclos de -0,5 a +0,5 V, como no protocolo experimental de CANBAZ e SEZGINTÜRK (2014), que também estudaram o comportamento voltamétrico de um imunossensor contendo substrato transdutor de ITO.

Figura 35 – Monitoramento voltamétrico das etapas de funcionalização do substrato de ITO

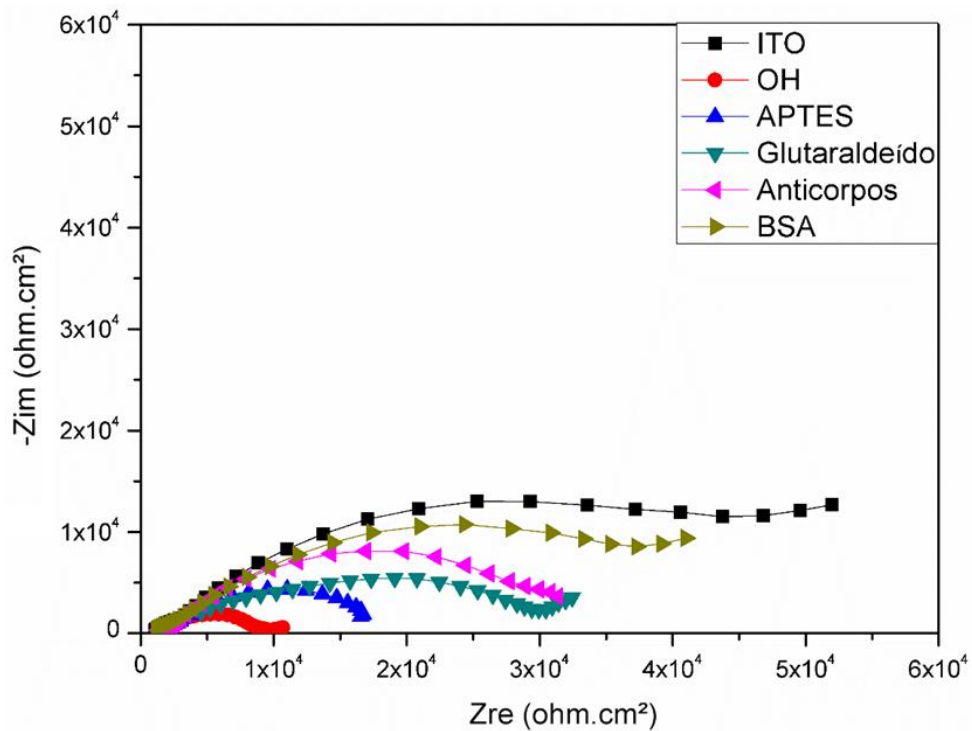


Como apresentado por CANBAZ e SEZGINTÜRK (2014), o substrato de ITO avaliado nesta pesquisa também sofreu um aumento nas correntes de pico anódico e catódico quando sobre sua superfície foram formados grupos hidroxila, efeito que se dá pelo aumento da taxa de transferência eletrônica com a sonda redox. Contudo, à medida que a superfície foi silanizada com o APTES, mesmo com a formação dos grupos amino deste silano, houve um decréscimo dos picos redox do sistema, causado provavelmente pelo caráter isolante conferido pelos grupos carbônicos presentes neste reagente. Para as demais soluções a que foi exposto o substrato, houve grande similaridade das curvas, com um discreto decréscimo das correntes dos picos à medida que as camadas isolantes de glutaraldeído, anticorpos e albumina foram adicionadas, o que dificultou a difusão dos íons do par redox e a consequente transferência eletrônica entre eletrodo e eletrólito.

Assim como no substrato de TiO_2 e devido às mesmas razões, pela figura 36 nota-se que o transdutor de ITO sofreu brusco decréscimo de impedância quando

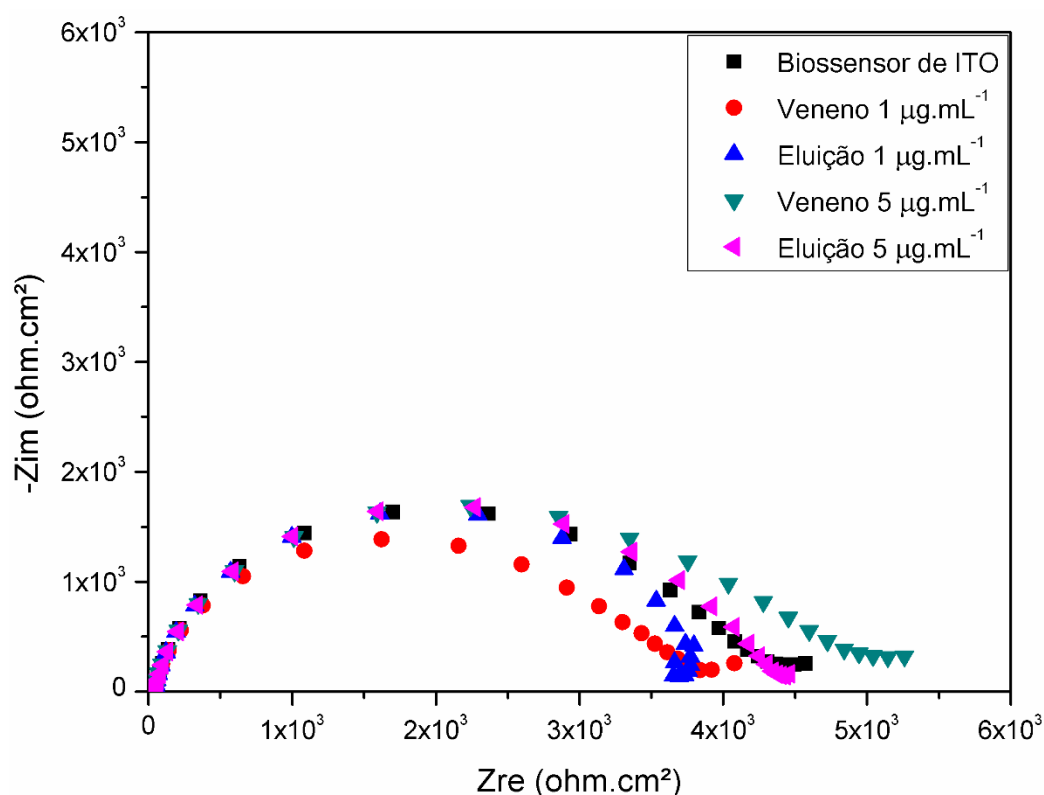
hidroxilado, e sucessivos acréscimos a cada uma das outras etapas da funcionalização, quando foram incorporados a este material reagentes de caráter predominantemente isolante, o que dificulta as trocas de carga entre este eletrodo e o eletrólito onde fora imerso.

Figura 36 – Monitoramento impedimétrico das etapas de funcionalização do substrato de ITO



O primeiro resultado impedimétrico de detecção do biossensor de ITO é apresentado na figura 37 e trata de sua resposta eletroquímica quando posto em soluções de veneno botrópico nas concentrações de 1 e 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Figura 37 – Diagrama de Nyquist do biossensor de ITO frente ao veneno botrópico nas concentrações de 1 e 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

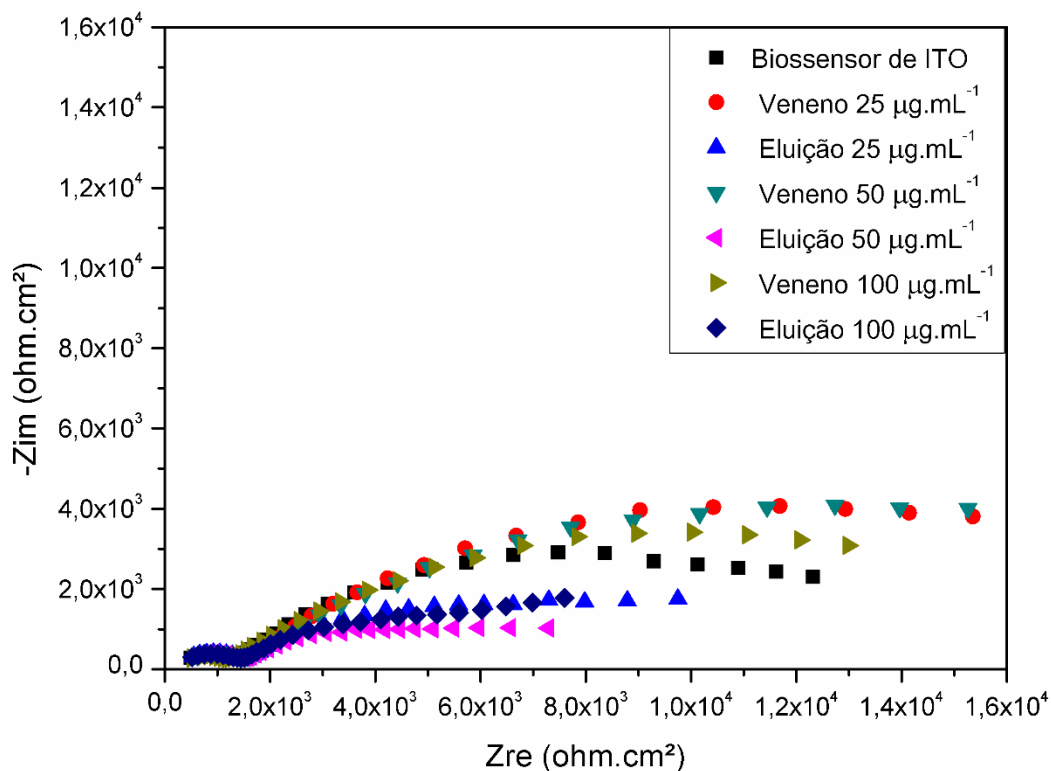


O diagrama de Nyquist acima revela que o biossensor não foi capaz de detectar o veneno na concentração de 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, talvez por se tratar de uma concentração muito baixa e aquém do seu limite de detecção, foi sensível, no entanto, ao veneno a 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, já que houve um aumento de ambas as impedâncias real e imaginária comparadas à condição inicial do sensor.

Ainda, foi possível verificar que o tampão de eluição foi eficiente para remover a ligação entre antígeno e anticorpo, levando o sensor à sua condição original, uma vez que retornou sua impedância a valores muito próximos da condição prévia à adição dos venenos, possibilitando a reutilização do dispositivo nos testes seguintes.

A fim de avaliar a sensibilidade do biossensor a maiores concentrações de analito, este foi testado contra veneno botrópico nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, gerando o resultado apresentado na figura 38.

Figura 38 – Diagrama de Nyquist do biossensor de ITO frente ao veneno botrópico nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

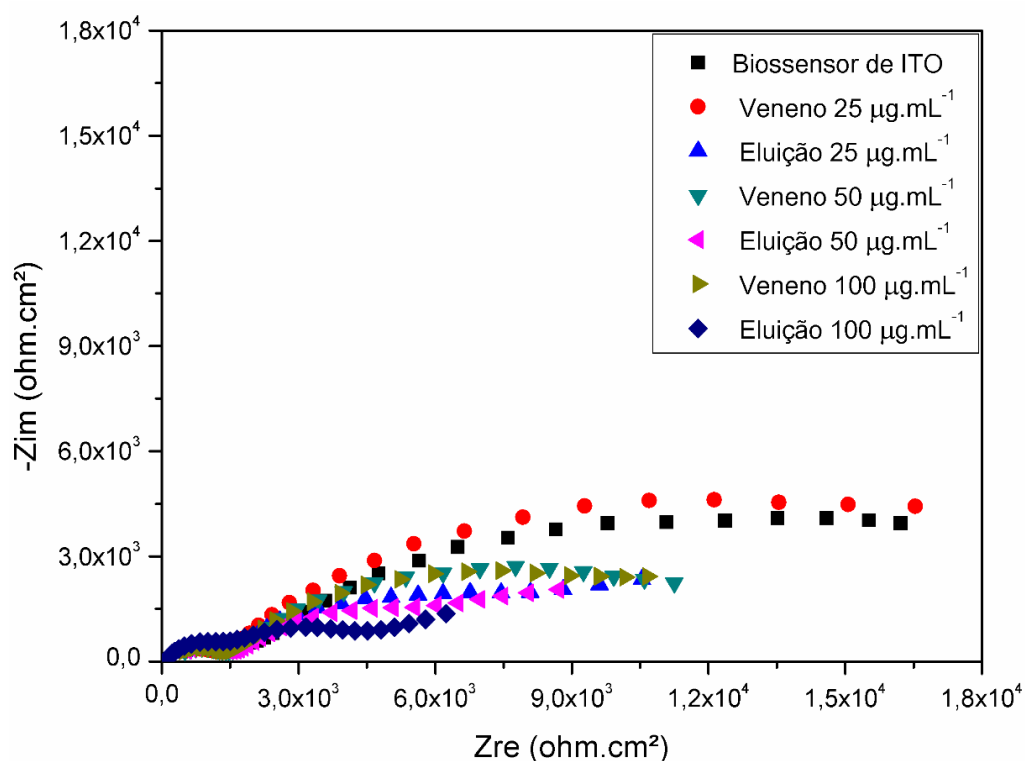


O aparecimento de um primeiro semicírculo na região de altas frequências está provavelmente associado ao cobre metálico que não foi perfeitamente vedado na fase de construção do sensor, provocando a exposição de uma zona condutora ao eletrólito e, conseqüentemente, integrando parte da impedância total do sistema. Esta hipótese é fortalecida pelo fato de que este semicírculo não sofreu relevantes alterações de impedância nas adições de veneno ou de tampão de eluição, pois o cobre não sofreu imobilização de anticorpos e, desta forma, a exposição ao analito em qualquer concentração não geraria a formação do complexo antígeno-anticorpo nem provocaria, portanto, um aumento da impedância.

Pelo diagrama de Nyquist, observa-se que o tampão de eluição gerou um decréscimo de impedância a cada vez que foi utilizado, entretanto a cada posterior adição de veneno, o biossensor permaneceu sensível a esse analito, detectando todas as concentrações a que foi exposto. Houve, então, para as três concentrações um aumento de impedância em relação à sua condição basal de não exposição ao analito.

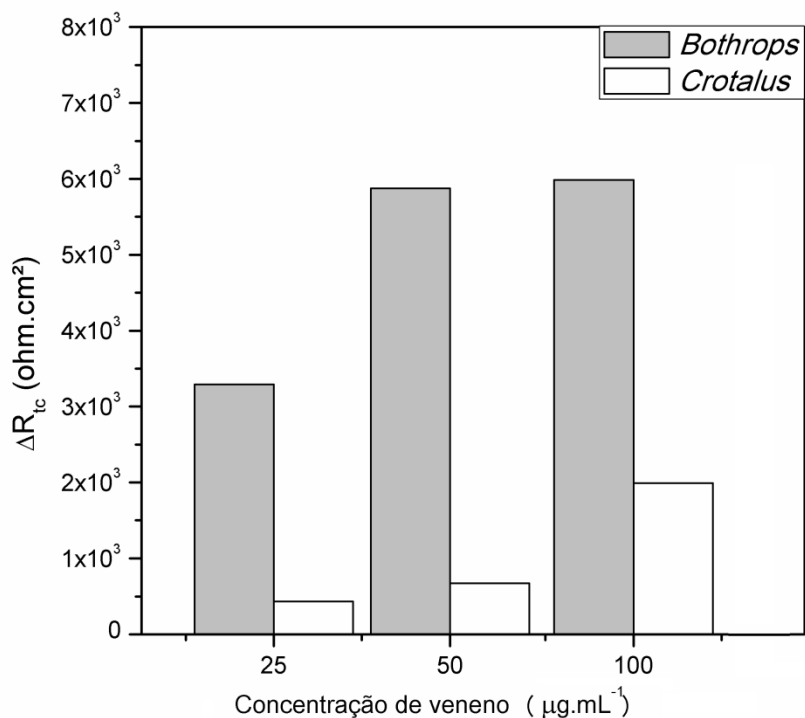
Como a especificidade de um biossensor é uma das suas características mais relevantes, o dispositivo foi testado contra veneno de outro gênero de cobra, *Crotalus*, isto é, um analito diferente daquele para o qual se espera seu reconhecimento, estando o resultado apresentado na figura 39.

Figura 39 – Diagrama de Nyquist do biossensor de ITO frente ao veneno crotálico nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$



Como esperado, o semicírculo na região de altas frequências foi novamente observado, já que se trata do mesmo dispositivo anteriormente testado. Por este diagrama é observada a mesma tendência de aumento de impedância a cada acréscimo de analito e diminuição a cada eluição imposta ao sistema. Entretanto, a principal e mais importante diferença neste caso é que os valores de impedância atingidos foram consideravelmente menores do que quando o biossensor foi testado frente ao veneno de seu reconhecimento, o botrópico. Para melhor visualização deste teste de especificidade, a figura 40 mostra a variação da resistência à transferência de carga do sensor diante das três concentrações dos venenos botrópico e crotálico.

Figura 40 – Variação da resistência à transferência de carga (R_{tc}) do sensor botrópico de ITO frente aos venenos de *Bothrops* e *Crotalus* nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$



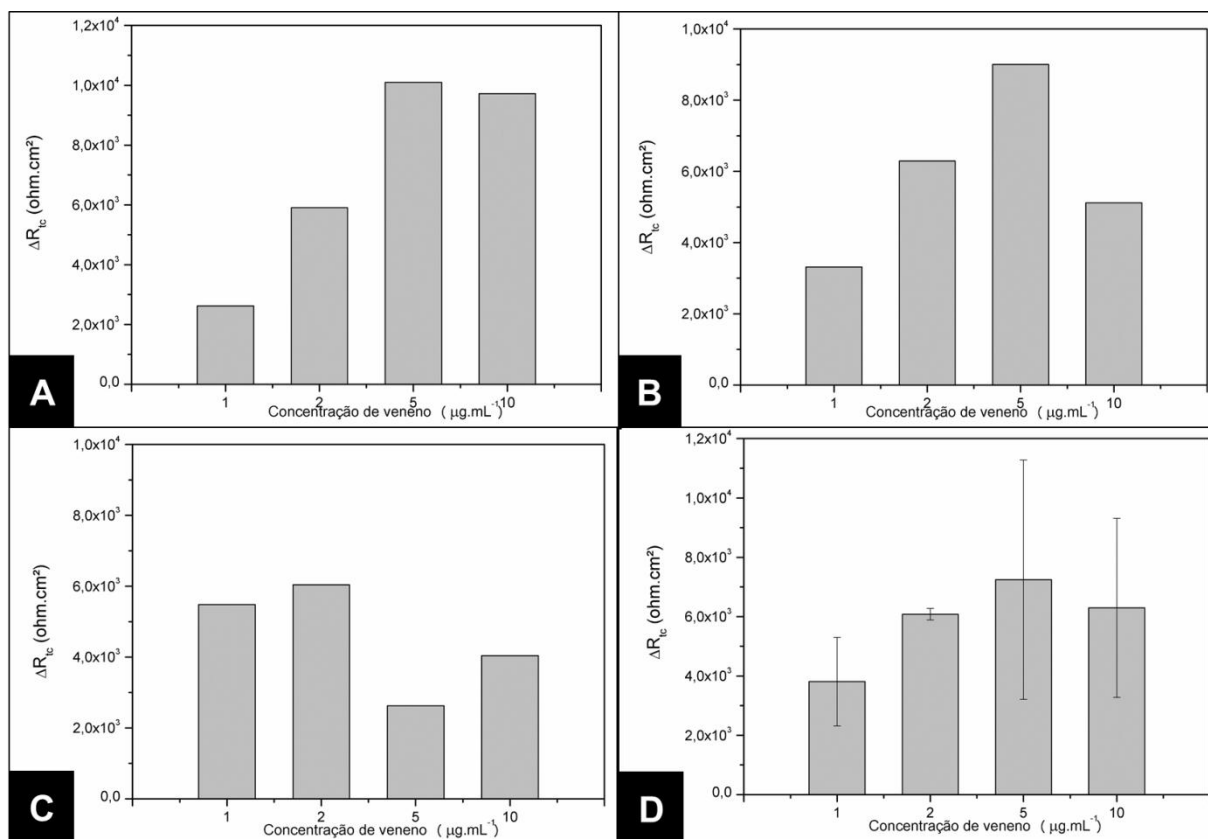
A análise do gráfico permite a clara verificação da alta especificidade do dispositivo para o veneno botrópico, já que revela uma diferença percentual da resistência à transferência de carga entre os dois analitos de 661,3% para a concentração de $25\mu\text{g.mL}^{-1}$, 776,5% para a de $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ e de 200,4% para $100\mu\text{g.mL}^{-1}$. O fato de que a maior concentração do veneno heterólogo gerou uma impedância mais que duas vezes menor que a concentração mais baixa do veneno homólogo revela a excelente performance do biossensor, apresentando este as duas mais importantes características deste tipo de dispositivo: alta sensibilidade e especificidade.

O gráfico revela ainda uma tendência de crescimento do valor de ΔR_{tc} à medida que se aumenta a concentração de veneno botrópico, mas não de maneira proporcional. Possivelmente os valores de 50 e $100\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram muito altos e a grande quantidade de moléculas presentes no meio dificulta por impedimento estérico a ligação dos antígenos com todos os anticorpos presentes no substrato do sensor, atingindo um valor de saturação que pode ser entendido como um limite máximo de detecção.

Dado o reconhecimento do biossensor às altas concentrações de analito, o dispositivo foi novamente testado contra menores concentrações de veneno, quais sejam: 1, 2, 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para que se pudesse inferir sobre seu limite mínimo de detecção. O resultado revelou, desta vez, o reconhecimento do biossensor mesmo às concentrações mais baixas do analito testado.

Uma vez que a resistência à transferência de carga é gerada a partir das baixas frequências no teste de impedância, este parâmetro é bastante representativo dos fenômenos que ocorrem na interface eletrodo-eletrólito, assim, este elemento do circuito equivalente foi empregado para gerar os resultados constantes na figura 41 para se melhor avaliar o comportamento do sensor quando exposto ao veneno nas diferentes concentrações ora citadas.

Figura 41 – Variação da resistência à transferência de carga do biossensor de ITO frente às concentrações de 1, 2, 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do veneno homólogo, com triplicata em “A”, “B” e “C”, e média em “D”



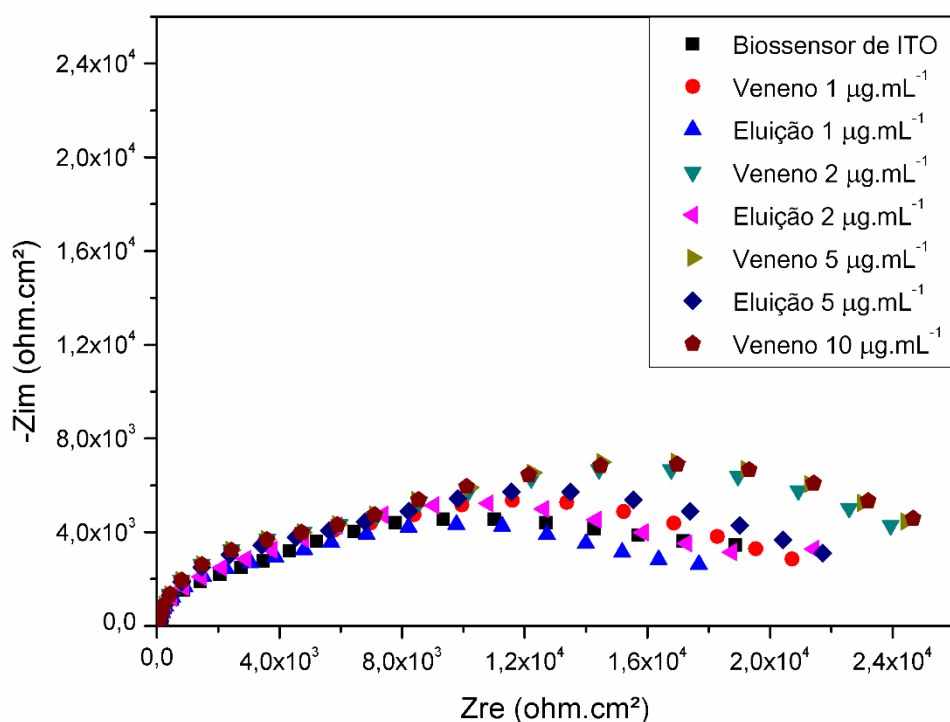
Na figura, as letras “A”, “B” e “C” se referem respectivamente as replicatas realizadas para o teste das concentrações de veneno, e “D” é o resultado compilado em média. Observa-se que entre as replicatas, “A” e “B” apresentam comportamento muito similar nas concentrações de 1, 2 e 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e uma maior variação da resistência à transferência de carga para a maior concentração. Por outro lado, o resultado em “C” indica grande disparidade em relação aos demais, o que gerou um aumento considerável do desvio padrão para todos os valores de concentração testado, exceto para 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Este comportamento está provavelmente associado ao fato de que durante o experimento, foram feitas alíquotas de todas as concentrações do analito a fim de se evitar numerosos ciclos de descongelamento e congelamento da amostra-matriz de veneno concentrado, evitando possíveis perdas de atividade e desnaturação de suas proteínas, todavia, o volume preparado das amostras não foi suficiente para contemplar a triplicata, exceto para o veneno de concentração 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo necessário o preparo de novas soluções das demais concentrações, o que pode ter implicado em diferentes atividades imunológicas das amostras preparadas e, conseqüentemente, gerou a diferença observada na resposta eletroquímica do sensor.

A partir da média dos valores apresentados em “D”, e mesmo do diagrama de Nyquist que o originou, verifica-se que o sensor foi também sensível à variação da concentração de veneno testada, de modo que quanto maior a concentração avaliada, maior foi a variação à transferência de carga observada, exceto para o analito a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, que apresentou um abaixamento de impedância em relação ao observado para o veneno 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Tal fato pode estar relacionado a um estado de saturação do dispositivo, isto é, a quantidade de anticorpos livres para ligação estaria limitada a interagir com no máximo a massa de analito presente em 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; ou, ainda, pode ser que a alta concentração de veneno tenha ocasionado um alto impedimento estérico nas proximidades do anticorpo do biossensor, dificultando a ligação de todas as moléculas naquela interface. Deve-se salientar que os biossensores são construídos manualmente, de modo que algumas de suas características podem variar de um dispositivo para o outro (ainda que empregando o mesmo substrato transdutor). Isso pode ocorrer devido à geometria do substrato que pode sofrer pequenas variações, mesmo mantendo a mesma área de 1 cm^2 , a posição dos fios de cobre afixados com fita também de cobre ao substrato e mesmo

a posição do eletrodo de trabalho na célula eletroquímica, que não foi mantida invariante para todos os testes. Como consequência deste fato, o biossensor de ITO apresentado no histograma da figura 40 foi capaz de detectar o veneno de interesse em concentração de até $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto aquele cujo resultado foi apresentado na figura 41 parece ter atingido um estado de saturação em até $10\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Para avaliar a capacidade de o sensor detectar especificamente apenas o analito para o qual foi desenvolvido, o dispositivo foi exposto a veneno de *Crotalus* nas mesmas concentrações do teste anterior, estando o resultado representado no diagrama da figura 42 a seguir.

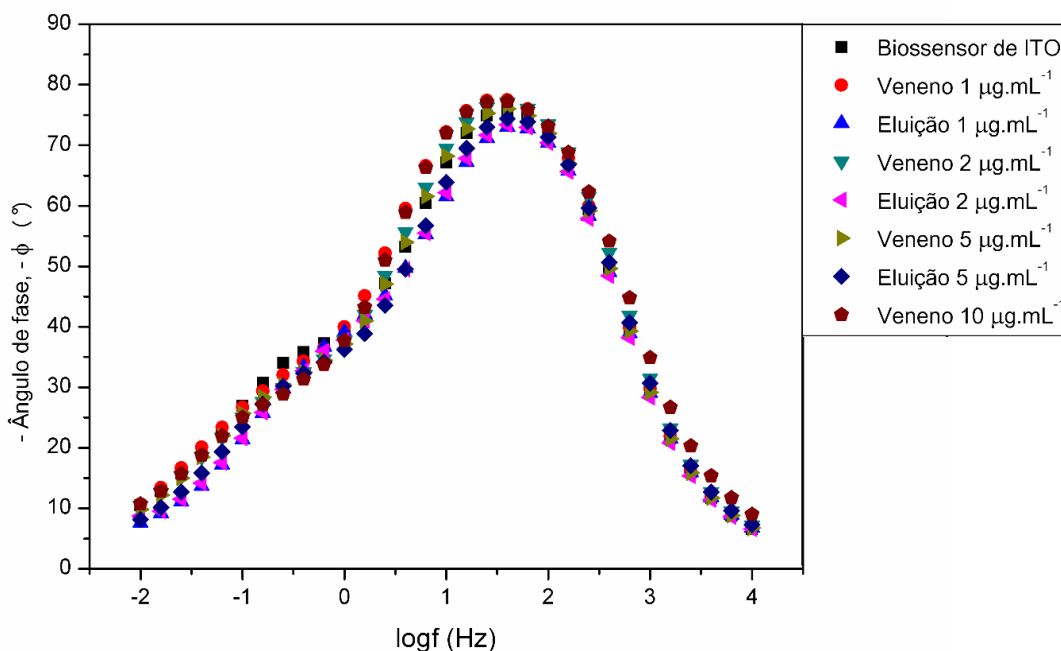
Figura 42 – Diagrama de Nyquist do biossensor de ITO frente a veneno heterólogo de *Crotalus* nas concentrações de 1, 2, 5 e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$



Inicialmente, a análise do diagrama de Nyquist da figura acima sugere a presença de dois arcos impedimétricos para todas as curvas. Por esta razão, uma interpretação complementar dos dados de que tratam este resultado foi realizada por meio do diagrama de Bode da figura 43 abaixo, uma vez que o este formato de diagrama de ângulo de fase em função do logaritmo da frequência é mais sensível

que o modelo de Nyquist, permitindo uma melhor visualização do real número de interfaces de troca de carga.

Figura 43 – Diagrama de Bode do biossensor de ITO frente a veneno heterólogo de *Crotalus* nas concentrações de 1, 2, 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$



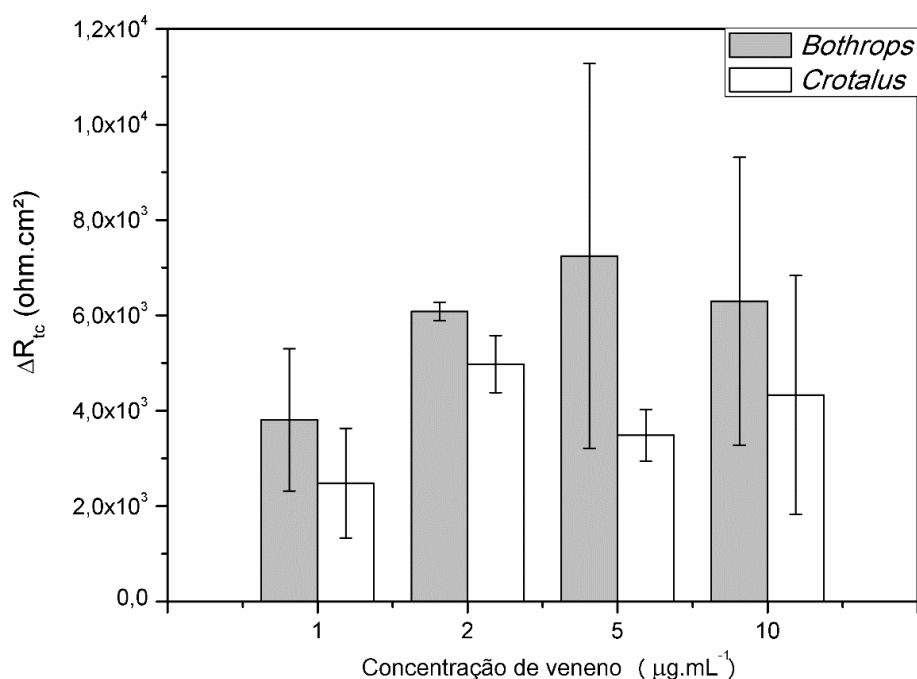
Por este diagrama de Bode está confirmada a presença de duas constantes de fase (dois semicírculos no diagrama de Nyquist da figura 42), pois há um arco bem definido em ângulo de fase máximo em aproximadamente 80° para as curvas em frequências intermediárias, e um ombro abaxias frequências em aproximadamente 40° , diferindo este resultado daquele perfil obtido no teste com veneno de *Bothrops*. Este fenômeno, como descrito anteriormente, é causado quando duas interfaces de troca de carga estão presentes no sistema, razão pela qual foi utilizado o mesmo circuito equivalente proposto para o substrato de TiO_2 , que consta de dois pares CPE- R_{tc} . Deve-se salientar que neste momento do experimento foi verificado um discreto deslocamento do cabo contendo os fios de cobre do sensor, fato ao qual é atribuído o aparecimento do semicírculo nas regiões de alta frequência, pois o cobre é um elemento metálico, por isso condutor, e geraria então um perfil de baixa impedância e não deveria ser sensível às adições ou eluições de veneno já que não foi submetido a funcionalização, exatamente como se nota no gráfico.

Diante do veneno crotálico, o sensor sofreu variação impedimétrica em todas as concentrações, no entanto não houve uma tendência de aumento da impedância

com o aumento da concentração, mas houve uma resposta randômica, o que revela certo grau de inespecificidade das ligações imunológicas associadas a uma possível adsorção física das moléculas de veneno em regiões diversas do substrato.

A especificidade do biossensor pode ser melhor entendida pela interpretação da figura 43, que mostra uma comparação da resposta do sensor diante das diferentes concentrações testadas para ambos os venenos de *Bothrops* e *Crotalus*.

Figura 43 – Comparação da variação da resistência à transferência de carga do biossensor de ITO frente às concentrações de 1, 2, 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dos venenos homólogo e heterólogo



Além das tendências ora discutidas, é notório o maior reconhecimento ao veneno homólogo em qualquer das concentrações testadas, o que confirma a especificidade do dispositivo. Apesar disso, os altos valores obtidos para o veneno de *Crotalus* comprometem a qualidade deste biossensor, pois em algumas concentrações a resposta deste veneno heterólogo foi superior a outras do analito botrópico, podendo gerar incerteza no diagnóstico quando aplicado em situação real de acidente ofídico.

Acredita-se que fragilidades da metodologia tenham sido responsáveis pelos altos valores de impedância detectados, especialmente, nas medidas eletroquímicas

usando veneno crotálico. Além da exposição dos fios de cobre, acarretando o aparecimento de duas interfaces de troca de carga e dificultando o ajuste da curva ao circuito equivalente, o fato de o eletrodo de trabalho ser removido da célula e novamente inserido a cada exposição às soluções de veneno e tampão gera uma variação na sua distância em relação aos outros eletrodos, fazendo com que os elétrons e íons tenham maior ou menor facilidade de serem transportados em cada uma das medidas, o que pode ter sido responsável, inclusive, pelos altos valores de desvio padrão encontrados para algumas concentrações de veneno. Desta maneira, a própria posição do eletrodo de trabalho é responsável por uma quantidade de impedância nos diagramas de Nyquist que não foi considerada na interpretação dos resultados anteriores.

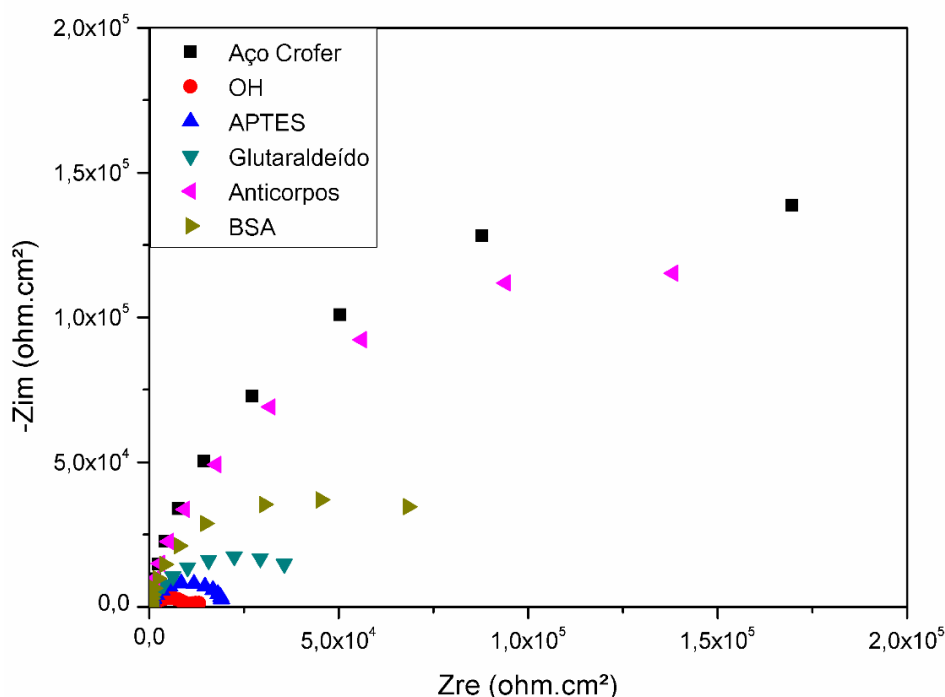
Para superar a exposição do cobre ao eletrólito em qualquer das futuras análises, foi feita uma tentativa de não imergir completamente o biossensor, mas apenas a região funcionalizada do ITO, de maneira que a região contendo a fita e os fios de cobre ficassem completamente acima do eletrólito.

A imersão parcial do eletrodo de trabalho na solução eletrolítica foi eficaz, porque dessa forma se obteve novamente o aparecimento de apenas um semicírculo, comprovando que realmente o cobre era responsável pelo aparecimento de uma segunda interface de troca de cargas com o eletrólito nos resultados precedentes. Contudo, houve novamente uma dificuldade de se manter fixa a posição do eletrodo na solução, com o adendo de que neste experimento ainda havia de se considerar a posição vertical do sensor. A não reprodutibilidade da resposta, nas concentrações já testadas em outras análises, esteve provavelmente associada a essas variações no sistema, não sendo possível inferir com precisão sobre a resposta analítica do sensor neste caso. A partir deste resultado, foi considerado utilizar outro material para vedar o cobre metálico do sensor, pois o silicone até então empregado apresentava poros durante as etapas de funcionalização. Assim, testes foram realizados com resina epóxi da marca Araldite®, obtendo-se resultados satisfatórios de isolamento elétrico da fita e cabo de cobre constatados pela obtenção de apenas um semicírculo nos diagramas de Nyquist;

5.4 Biossensor de aço Crofer 22 APU

O monitoramento impedimétrico das etapas de funcionalização do aço Crofer é apresentado na figura 44.

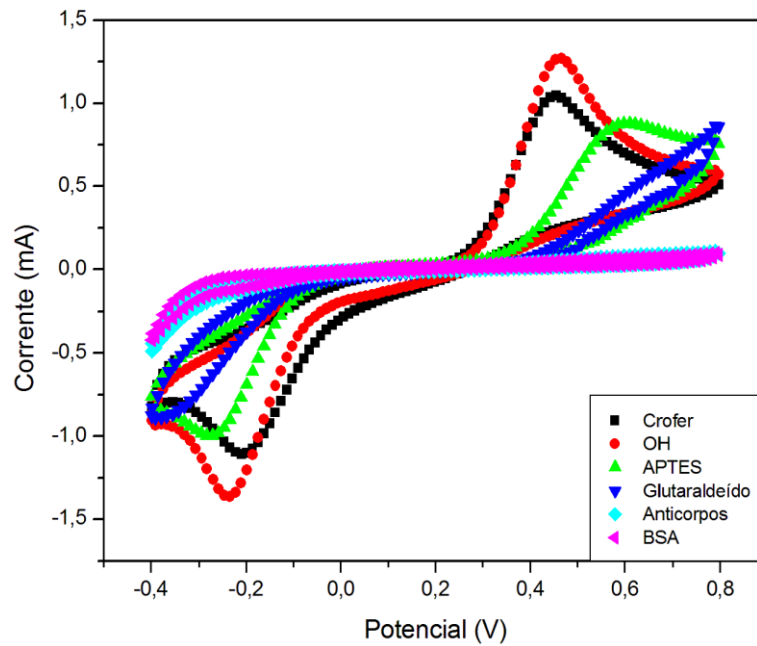
Figura 44 – Monitoramento impedimétrico das etapas de funcionalização do substrato de aço Crofer 22 APU



O espectro de impedância acima revela o mesmo comportamento observado para o monitoramento das etapas de funcionalização dos outros substratos estudados nesta pesquisa, entretanto, as variações de impedância neste material foram maiores que aquelas observadas para o TiO₂ e ITO, razão provavelmente associada à maior área eletroativa do aço, que foi verificada em resultados outrora discutidos.

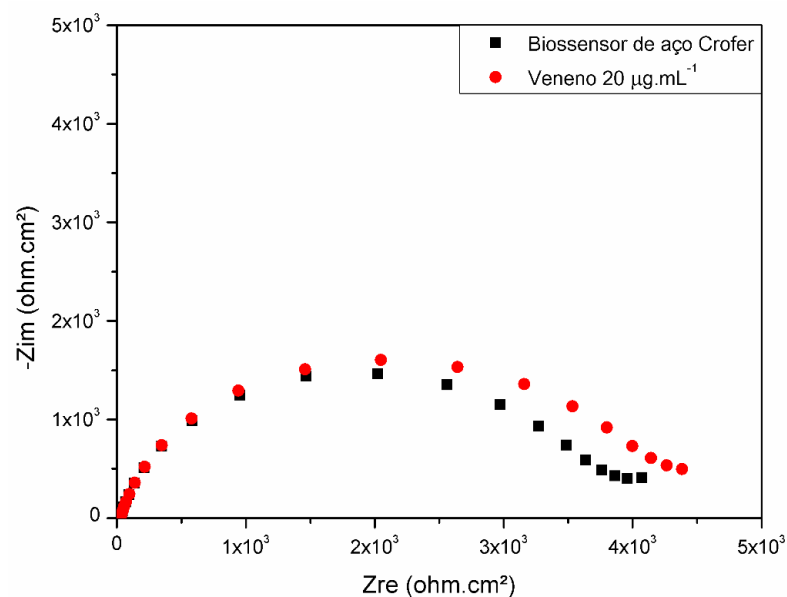
As informações obtidas pela análise de EIE foram complementadas pelo monitoramento voltamétrico das etapas de funcionalização do aço Crofer (figura 45) que também confirmaram os resultados prévios para outros transdutores, havendo um aumento da intensidade dos picos redox causado pela adição dos grupos hidroxila ao aço, e posteriores diminuições das correntes anódica e catódica em consequência do caráter isolante dos demais reagentes da funcionalização.

Figura 45 – Monitoramento voltamétrico das etapas de funcionalização do substrato de aço Crofer 22 APU



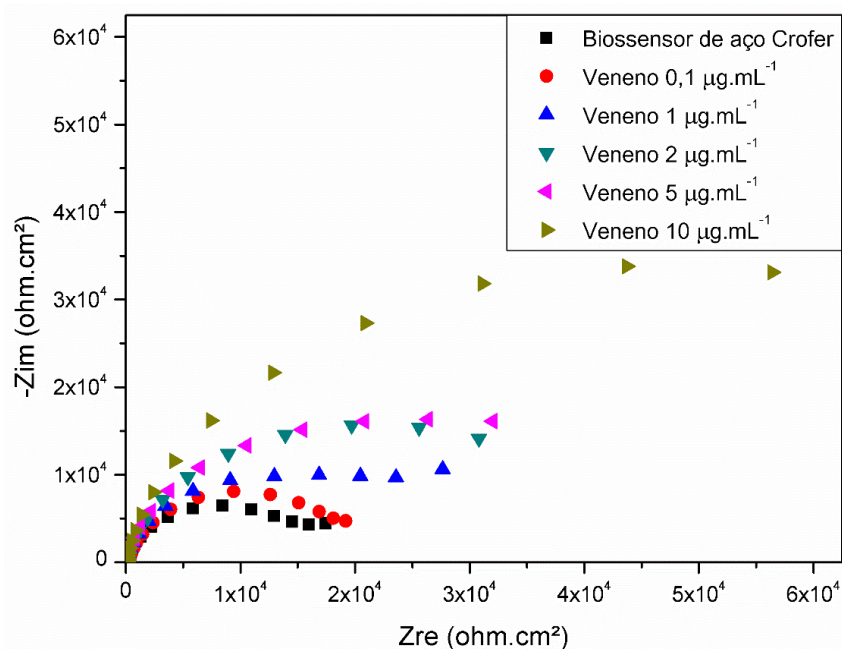
Após verificar que as etapas de funcionalização foram bem sucedidas também para este substrato, o aço Crofer foi exposto a veneno botrópico na concentração de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para verificar a atividade imunológica dos anticorpos nele imobilizados, resultado que é apresentado na figura 46.

Figura 46 – Diagrama de Nyquist do biossensor de aço Crofer 22 APU frente a veneno botrópico na concentração de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$



Notoriamente há um aumento da impedância total do sistema associada à detecção do analito, revelando que os anticorpos presentes no transdutor permaneceram com a capacidade de reconhecerem o veneno de *Bothrops* após a funcionalização do substrato. Então, outro biossensor de aço Crofer foi produzido, sendo exposto, desta vez, a veneno botrópico nas concentrações de 0,1; 1; 2; 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e a figura 47 se trata do diagrama de Nyquist resultante deste ensaio.

Figura 47 – Diagrama de Nyquist do biossensor de aço Crofer 22 APU frente a veneno botrópico nas concentrações de 0,1; 1; 2; 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$



O comportamento impedimétrico do biossensor de Crofer frente ao veneno botrópico mostra que ele foi capaz de detectar de forma eficaz este analito, visto que há um claro distanciamento entre as curvas de impedância das diferentes concentrações de veneno e aquela referente ao sensor antes de qualquer exposição. A confirmação de sua capacidade de detecção pode ser vista pelos valores simulados a partir do equivalente, que constam na tabela 6 e mostram a tendência de aumento de R_{tc} à medida que o biossensor foi exposto às maiores concentrações de veneno.

Tabela 6 – Parâmetros do circuito equivalente simulado para o biossensor de aço Crofer na ausência e presença de venenos botrópicos

Amostra	Re ($\Omega.cm^2$)	R _{tc} ($\Omega.cm^2$)	CPE1 (F.cm ²)
Biossensor de aço Crofer	200,71 ± 152,56	19756,33 ± 485,73	8,73 . 10 ⁻⁵ ± 2,95 . 10 ⁻⁶
Veneno 0,1 µg.mL ⁻¹	23,84 ± 3,2105	28873,00 ± 5174,00	8,92 . 10 ⁻⁵ ± 4,07 . 10 ⁻⁶
Eluição 0,1 µg.mL ⁻¹	14,70 ± 47,06	19937,00 ± 5970,90	4,38 . 10 ⁻⁵ ± 3,27 . 10 ⁻⁵
Veneno 1 µg.mL ⁻¹	28,34 ± 2,72	27844,33 ± 11850,00	9,58 . 10 ⁻⁵ ± 8,33 . 10 ⁻⁶
Eluição 1 µg.mL ⁻¹	42,36 ± 15,74	18440,00 ± 1701,60	8,75 . 10 ⁻⁵ ± 4,92 . 10 ⁻⁶
Veneno 2 µg.mL ⁻¹	62,77 ± 61,46	45612,00 ± 8778,70	8,77 . 10 ⁻⁵ ± 8,98 . 10 ⁻⁶
Eluição 2 µg.mL ⁻¹	32,49 ± 12,04	15179,33 ± 2815,90	9,65 . 10 ⁻⁵ ± 2,83 . 10 ⁻⁶
Veneno 5 µg.mL ⁻¹	85,50 ± 98,50	43477,00 ± 3178,90	9,35 . 10 ⁻⁵ ± 1,36 . 10 ⁻⁵
Eluição 5 µg.mL ⁻¹	17,84 ± 13,33	23480,00 ± 5862,10	4,60 . 10 ⁻⁵ ± 3,33 . 10 ⁻⁵
Veneno 10 µg.mL ⁻¹	26,62 ± 0,69	80230,33 ± 45,61	7,95 . 10 ⁻⁵ ± 1,10 . 10 ⁻⁶

A análise da mesma tabela, no entanto, revela certa instabilidade eletroquímica do sistema, o que pode ser visto pelos altos valores de desvio padrão e a grande variação entre as médias das resistências ao eletrólito (R_e), o que não tem coerência física já que foi empregada mesma solução eletrolítica para a obtenção de todos os espectros de impedância. Controversamente, obteve-se um ajuste de qualidade da curva ao circuito de Randles proposto, fato constatado pelos baixos valores de qui-quadrado (χ^2) desta simulação (aproximadamente igual a 10⁻³).

Para a verificação da especificidade do biossensor, esse foi exposto às mesmas concentrações de venenos de *Crotalus*, cujos resultados são expressos na figura 48 e tabela 7, e de *Micrurus* (figura 49 e tabela 8).

Figura 48 – Diagrama de Nyquist do biossensor de aço Crofer 22 APU frente a veneno crotálico nas concentrações de 0,1; 1; 2; 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

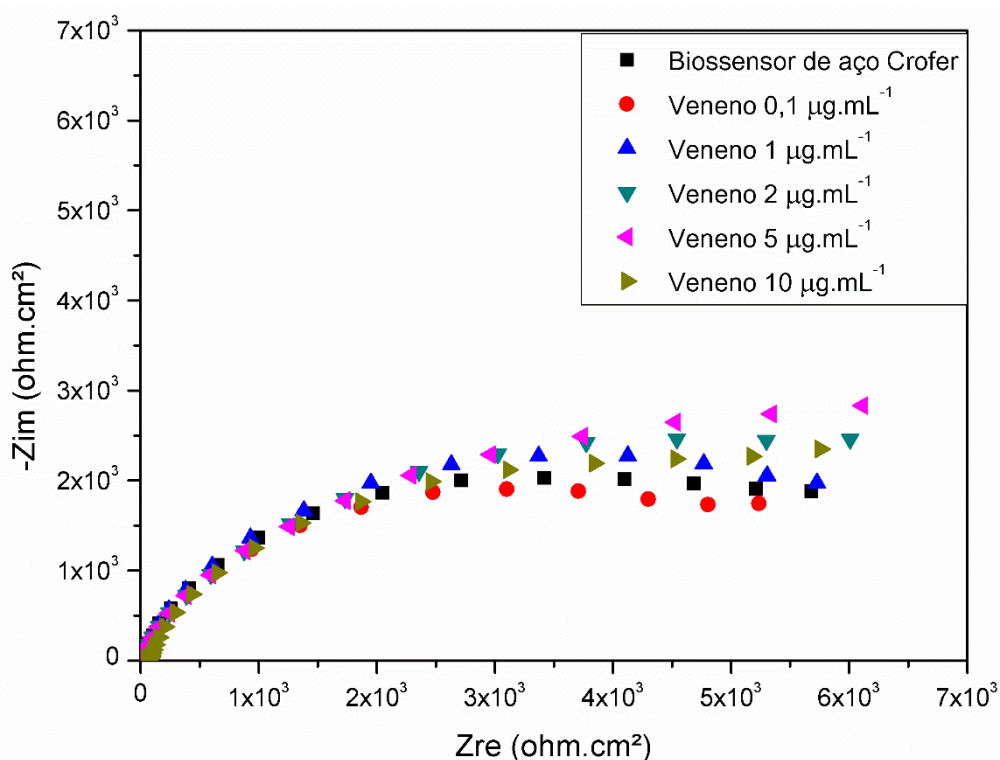


Tabela 7 – Parâmetros do circuito equivalente simulado para o biossensor de aço Crofer na ausência e presença de venenos crotálicos

Amostra	Re ($\Omega.\text{cm}^2$)	R _{tc} ($\Omega.\text{cm}^2$)	CPE1 (F. cm^2)
Biossensor de aço Crofer	16,37 ± 0,76	15553,50 ± 1125,01	6,63 . 10 ⁻⁵ ± 4,79 . 10 ⁻⁶
Veneno 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	14,71 ± 0,27	12621,00 ± 1260,06	8,20 . 10 ⁻⁵ ± 2,44 . 10 ⁻⁶
Eluição 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	14,17 ± 0,11	9867,50 ± 1621,40	8,72 . 10 ⁻⁵ ± 7,54 . 10 ⁻⁷
Veneno 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	13,99 ± 0,04	7070,00 ± 449,72	8,85 . 10 ⁻⁵ ± 3,56 . 10 ⁻⁷
Eluição 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	14,00 ± 0,06	6306,50 ± 630,03	8,74 . 10 ⁻⁵ ± 1,84 . 10 ⁻⁶
Veneno 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	14,19 ± 0,18	5402,00 ± 50,91	8,66 . 10 ⁻⁵ ± 1,19 . 10 ⁻⁶
Eluição 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	14,89 ± 0,03	5469,00 ± 52,32	8,81 . 10 ⁻⁵ ± 3,93 . 10 ⁻⁷
Veneno 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	14,85 ± 2,67	5775,50 ± 109,60	8,96 . 10 ⁻⁵ ± 4,35 . 10 ⁻⁷
Eluição 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	17,38 ± 0,61	5992,00 ± 41,01	9,03 . 10 ⁻⁵ ± 3,68 . 10 ⁻⁸
Veneno 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	15,95 ± 0,14	6238,50 ± 81,32	9,11 . 10 ⁻⁵ ± 5,18 . 10 ⁻⁷

Figura 49 – Diagrama de Nyquist do biossensor de aço Crofer 22 APU frente a veneno elapídico nas concentrações de 0,1; 1; 2; 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

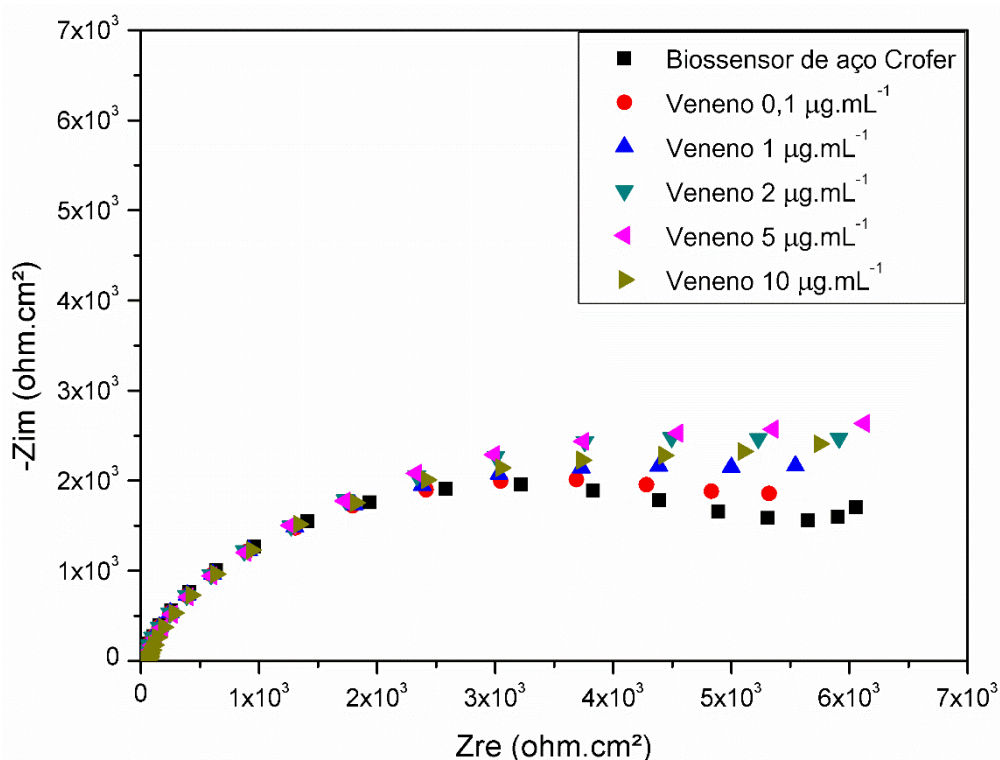
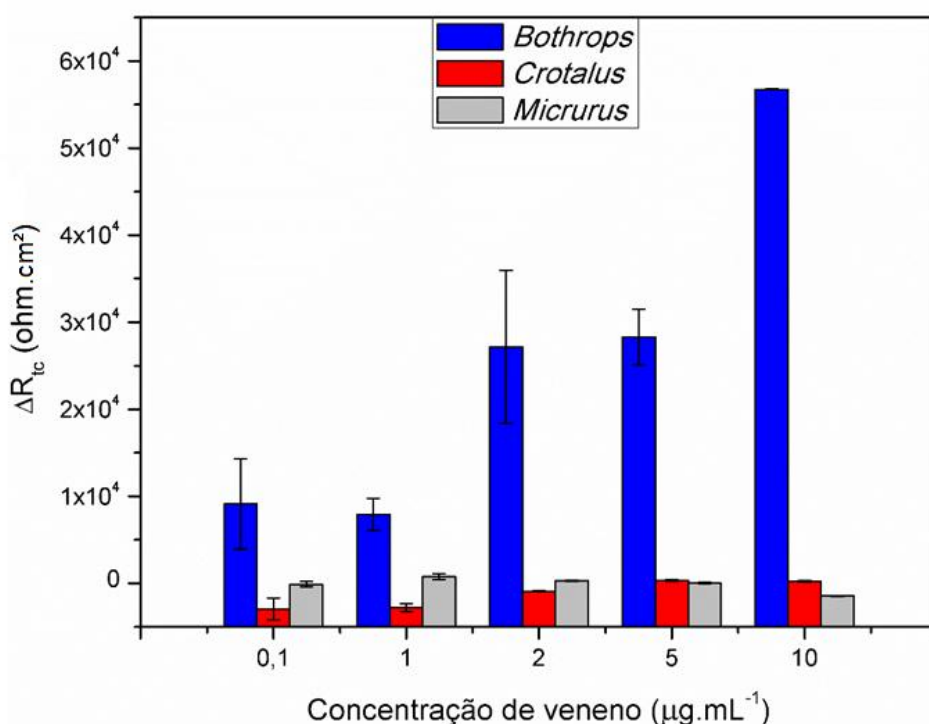


Tabela 8 – Parâmetros do circuito equivalente simulado para o biossensor de aço Crofer na ausência e presença de venenos elapídicos

Amostra	Re ($\Omega.\text{cm}^2$)	R _{tc} ($\Omega.\text{cm}^2$)	CPE1 (F.cm ²)
Biossensor de aço Crofer	16, 23 ± 0,07	5659,50 ± 143,54	8,58 . 10 ⁻⁵ ± 4,31 . 10 ⁻⁶
Veneno 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	15,06 ± 1,58	5556,00 ± 2,83	3,37 . 10 ⁻⁵ ± 4,77 . 10 ⁻⁶
Eluição 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	14,10 ± 0,01	5428,50 ± 593,26	9,88 . 10 ⁻⁵ ± 1,93 . 10 ⁻⁷
Veneno 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	12,18 ± 0,13	6188,00 ± 335,17	9,54 . 10 ⁻⁵ ± 6,04 . 10 ⁻⁶
Eluição 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	13,04 ± 0,04	6259,50 ± 260,92	1,04 . 10 ⁻⁴ ± 8,63 . 10 ⁻⁷
Veneno 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	13,88 ± 1,12	6528,00 ± 84,85	1,03 . 10 ⁻⁴ ± 7,21 . 10 ⁻⁷
Eluição 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	14,55 ± 0,06	6825,00 ± 91,92	1,03 . 10 ⁻⁴ ± 5,02 . 10 ⁻⁷
Veneno 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	29,09 ± 21,30	6857,50 ± 79,90	1,10 . 10 ⁻⁴ ± 4,36 . 10 ⁻⁶
Eluição 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	97,47 ± 11,4	7984,00 ± 916,41	1,25 . 10 ⁻⁴ ± 4,11 . 10 ⁻⁵
Veneno 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	54,49 ± 6,89	6521,5 ± 62,93	1,11 . 10 ⁻⁴ ± 9,97 . 10 ⁻⁷

Em ambas as situações de exposição a veneno heterólogo, os valores dos elementos sofreram pouca variação, o que em relação à R_e indica que se atingiu uma condição de maior estabilidade eletroquímica do sistema, e em relação aos demais parâmetros mostra que não houve detecção desses venenos. Uma melhor visualização dessas características do sensor é apresentada na figura 50, onde o parâmetro R_{tc} foi comparado às concentrações dos venenos homólogo e heterólogo.

Figura 50 – Variação da Resistência à transferência de carga (ΔR_{tc}) do biossensor de aço Crofer com substrato de aço Crofer 22 APU diante de diferentes concentrações dos venenos de *Bothrops*, *Crotalus* e *Micrurus*



O histograma acima reitera a conclusão de que o biossensor de Crofer foi eficiente na detecção de todas as concentrações do veneno botrópico, e apresentou alta seletividade para este analito, quando não sofreu considerável aumento de R_{tc} para os venenos heterólogos a que foi exposto, com valores de ΔR_{tc} muito próximos a 0 Ω e outros negativos. A interpretação do gráfico permite inferir que há uma tendência linear de aumento dos valores de ΔR_{tc} relacionada ao aumento da concentração de veneno homólogo, exceto para a menor concentração que parece ter gerado um aumento de resistência superior àquela ocasionada pela concentração de 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

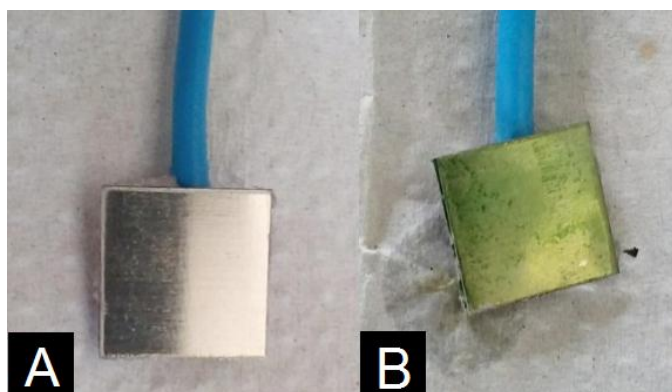
Todavia, considerando o desvio padrão associado a este resultado, é possível que a concentração de $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ esteja relacionada ao menor valor de ΔR_{tc} .

Finalmente, uma inferência sobre o limite de detecção deste dispositivo pode ser feita com base na resposta impedimétrica obtida, já que para a menor concentração de analito homólogo testada obteve-se $\Delta R_{tc} = 9166,67 \pm 7907,33 \Omega.\text{cm}^2$, sendo possível assumir que este biossensor provavelmente é capaz de detectar concentrações ainda menores do veneno de *Bothrops*.

5.5 Biossensor de Polianilina

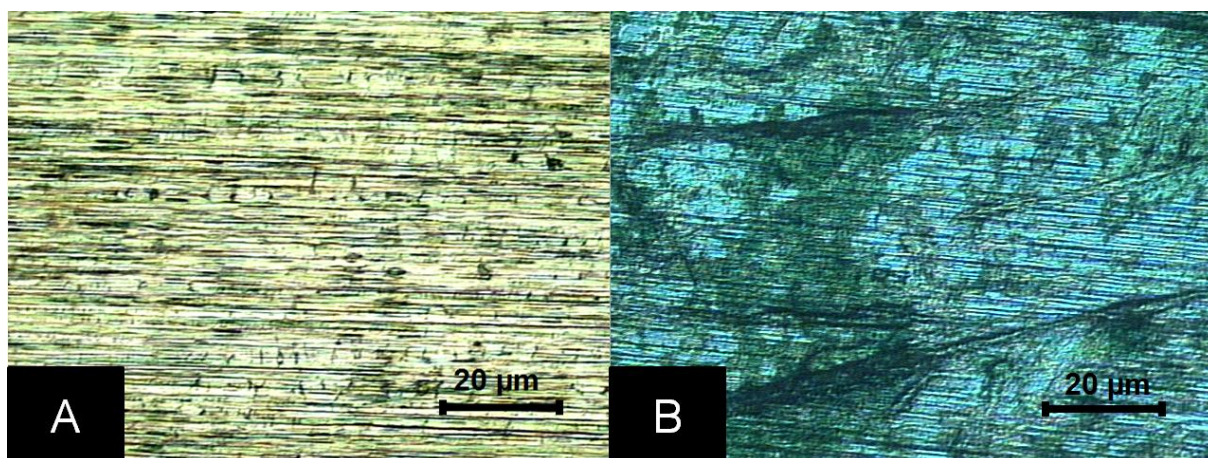
A eletrodeposição da PANI foi eficaz e pode ser claramente verificada devido à mudança de cor no aço (figura 51), cuja coloração verde indica a formação do sal de esmeraldina, fase condutora deste polímero.

Figura 51 – Substrato de Crofer antes (A) e após (B) eletrodeposição de PANI



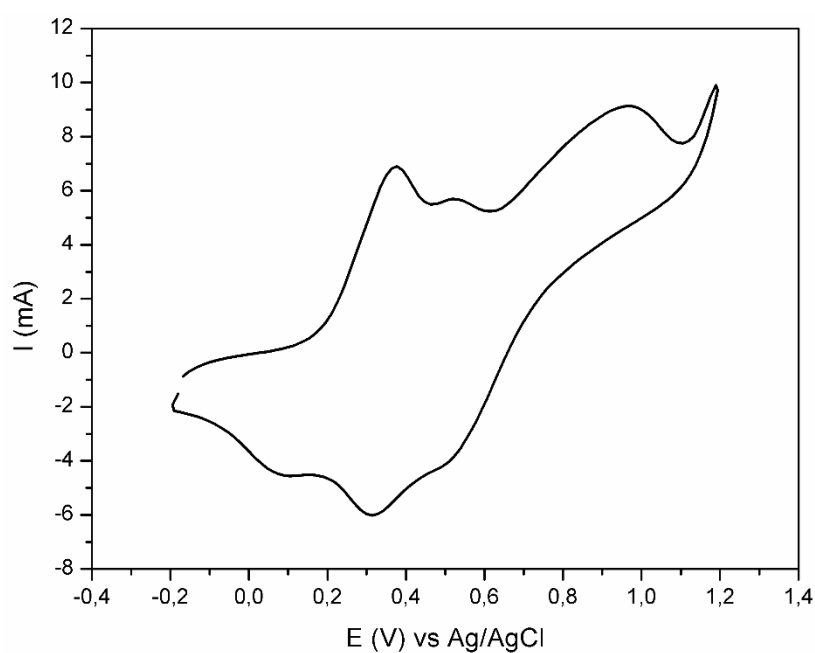
Imagens de Microscopia Óptica também foram obtidas para verificação dos depósitos de sal formados sobre o substrato. Pela figura 52, nota-se o aparecimento de regiões mais escuras e com aglomerados de matéria no aço contendo a PANI, evidenciando, novamente, a deposição do polímero.

Figura 52 – Imagens de microscopia óptica do substrato de Crofer antes (A) e após (B) a eletrodeposição (ampliação de 100x)

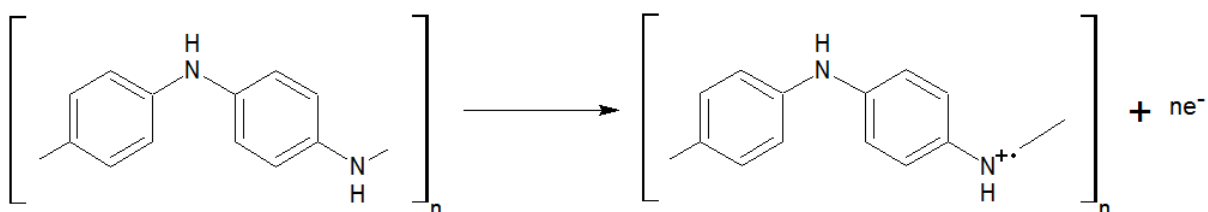


O comportamento eletroquímico da polianilina é comumente estudado na literatura pela técnica de voltametria cíclica devido a seus picos típicos de oxidação e redução, e a figura 53 apresenta a curva obtida para a PANI depositada no aço Crofer, com direção de varredura partindo do potencial de -0,2 V até +1,2 V e retornando o ciclo para o potencial negativo inicial.

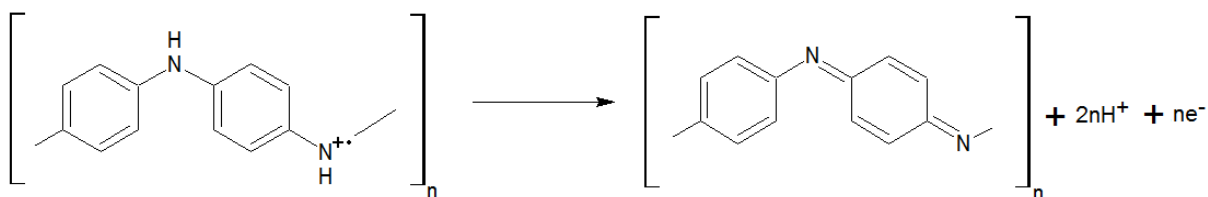
Figura 53 – Voltamograma cíclico da Polianilina eletrodepositada no substrato de aço Crofer



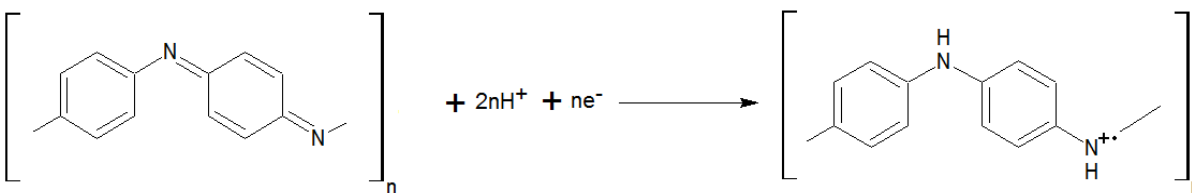
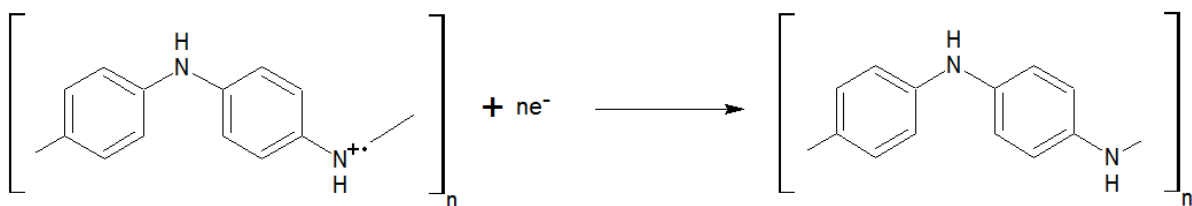
A curva apresenta duas regiões de atividade redox, dispondo a porção superior de dois picos anódicos e a inferior de dois picos catódicos, como igualmente observado por Song e Choi (2013). Na primeira região, atribui-se ao pico registrado em +0,39 V a conversão da fase completamente reduzida leucoesmeraldina para a fase parcialmente oxidada base esmeraldina, conforme a reação:



A segunda reação de oxidação, indicada abaixo, ocorreu em potenciais em torno de +0,96 V, estando relacionado à transformação da base esmeraldina na fase completamente oxidada, pernigranilina.



Avaliando-se a região catódica do voltamograma, os picos revelados em +0,33 V e +0,06 V são atribuídos, respectivamente, às seguintes reações eletroquímicas:



Nunziante e Pistoia (1989) relatam que a assimetria dos picos catódicos em relação aos seus correspondentes anódicos, como observado neste resultado, pode ser entendida como uma transição de condutividade nos potenciais onde se encontram. Além disso, os autores apontam a existência de uma relação entre a velocidade de varredura e a altura dos picos, o que é indicativo de um processo limitado pela transferência de elétrons.

Pelos mecanismos de formação estudados, verifica-se que o pico anódico na região de +0,39 V e seu correspondente catódico em +0,06 V correspondem a processos em que não há dependência do pH do meio, uma vez que dependem apenas da transferência de elétrons para ocorrerem. Por outro lado, o pH é fundamentalmente importante para os fenômenos geradores do outro par de picos, já que as correspondentes transformações demandam o consumo ou a produção de íons H⁺. Diante disso, pode-se inferir que os deslocamentos de pico observados neste resultado frente a dados da literatura podem estar associados a diferentes ácidos usados e à concentração empregada em cada estudo.

Ainda, deve-se considerar o efeito da velocidade de varredura utilizada, que pode provocar também o deslocamento de picos. Um aumento da velocidade de varredura provoca um aumento da corrente desenvolvida no sistema, levando à geração de maior queda ôhmica e, conseqüentemente, um deslocamento dos potenciais anódicos para maiores valores e dos potenciais catódicos para menores valores.

A queda ôhmica é uma expressão da Lei de Ohm (equação 15), seguindo a relação de proporcionalidade entre o potencial “U” e o produto entre a resistência eletrolítica “R” e a corrente “I” que atravessa o sistema.

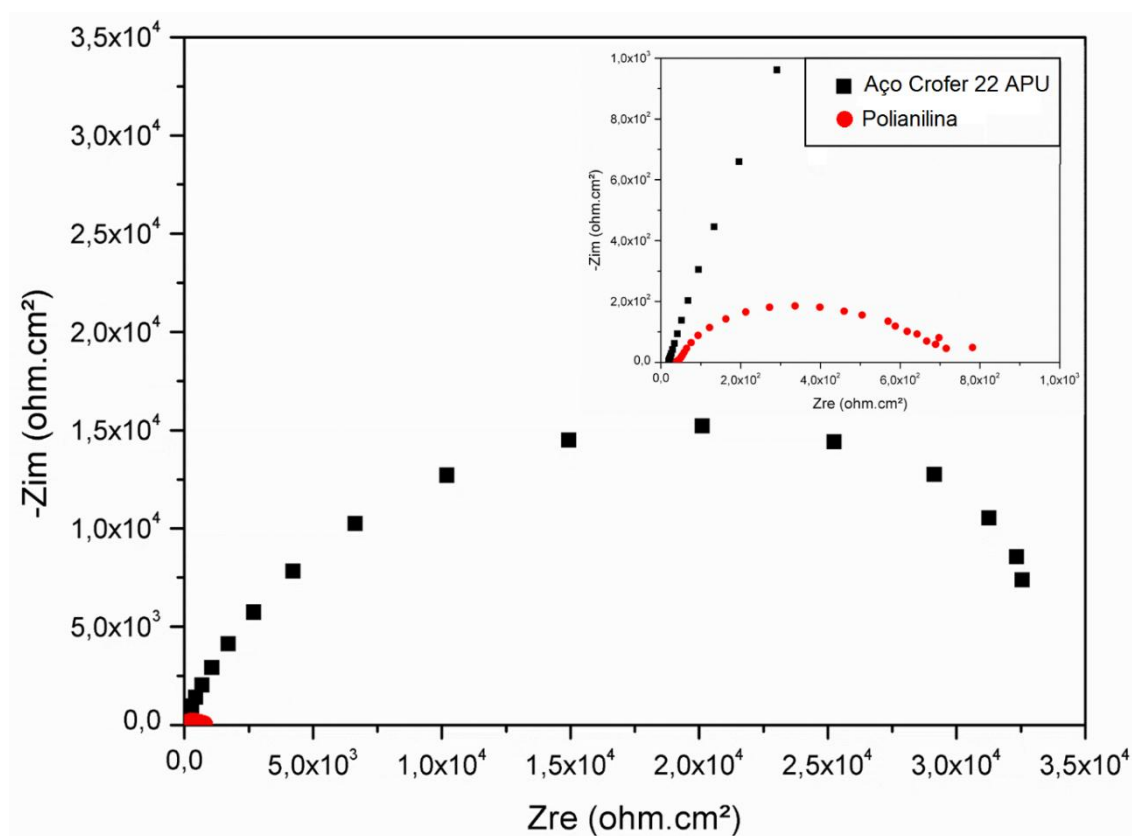
$$U = RI \quad (\text{Eq. 15})$$

A resistência eletrolítica é dada pela equação 16, que relaciona a resistividade elétrica “ρ” da solução de eletrólito (anilina 0,3 M + ácido sulfúrico 0,3 M), a distância “d” entre o eletrodo de trabalho (substrato onde ocorreu a eletrodeposição da PANI) e o eletrodo de referência, bem como a área eletroativa “A” do substrato.

$$R = \frac{\rho \cdot d}{A} \quad (\text{Eq. 16})$$

Quanto ao seu caráter condutivo, a análise por EIE revelou um considerável decréscimo de impedância para a amostra contendo PANI em relação ao aço. Tendo em vista que a impedância é uma propriedade de resistência à passagem de corrente elétrica, ou seja, é inversa à condutividade, o diagrama de Nyquist apresentado na figura 54 confirma o expressivo ganho de condutividade elétrica do substrato contendo o polímero.

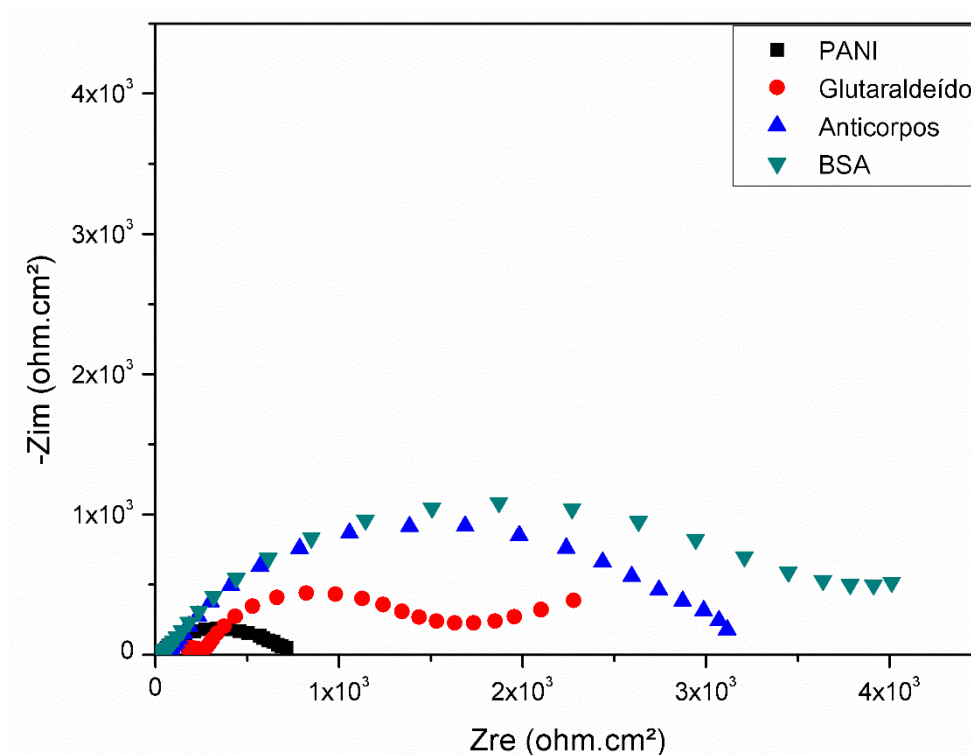
Figura 54 – Diagrama de Nyquist por impedância da Polianilina eletrodepositada no substrato de Crofer e ampliação da região de impedâncias real e imaginária até $1,0 \times 10^3 \text{ ohm.cm}^2$



Uma vez produzida e caracterizada, a PANI foi estudada quanto à sua funcionalização para obtenção do biossensor. Para tanto, monitoramentos impedimétrico e voltamétrico foram empregados a fim de se estudar a eficácia da incorporação das camadas de funcionalização ao polímero. A figura 55 abaixo trata

da resposta impedimétrica do substrato frente às adições de glutaraldeído, anticorpos e albumina.

Figura 55 – Monitoramento impedimétrico das etapas de funcionalização do substrato de PANI

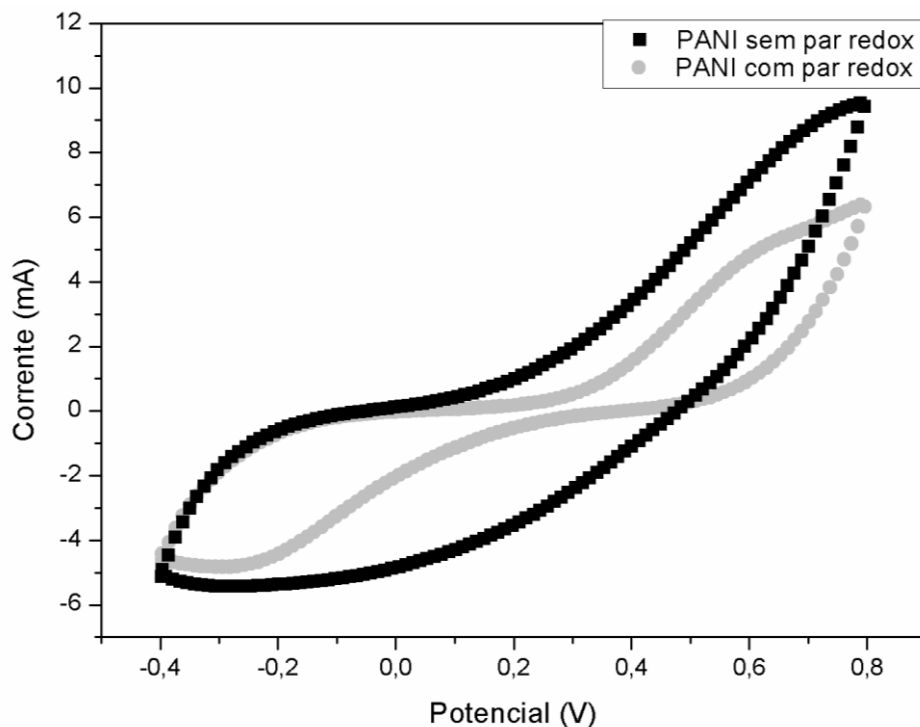


O diagrama de Nyquist confirma o comportamento esperado de impedância do sistema, apresentando ganhos de impedância à adição de cada solução reagente em virtude do caráter predominantemente isolante do silano e das proteínas (essas que possuem longas cadeias carbônicas desprovidas de elétrons livres para propiciar fácil transferência de elétrons).

Quando analisado o comportamento da PANI por voltametria cíclica, foram conduzidos testes nas condições de ausência e presença da sonda redox, a fim de verificar se o polímero apresentava picos de oxidação e redução no eletrólito suficientemente grandes para mascarar a presença dos picos relativos ao par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. O resultado é apresentado na figura 56 e mostra que apesar dos portadores de carga da PANI, principalmente o nitrogênio do monômero que contém elétrons livres e a ressonância advinda dos anéis aromáticos, não foram gerados picos bem definidos na ausência da sonda, revelando que o monitoramento

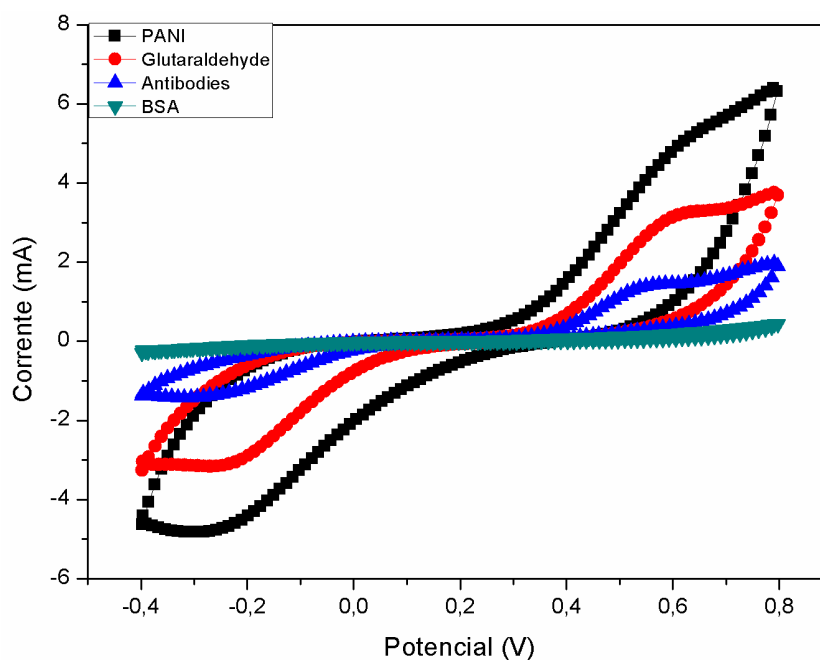
voltamétrico deveria ser baseado nos picos anódico e catódico decorrentes da presença do par redox.

Figura 56 – Perfil voltamétrico da PANI em meio eletrolítico com e sem par redox



Quando exposta ao eletrólito contendo o par redox (figura 57), a PANI apresentou os picos anódico e catódico com maior valor de corrente, estando este fato associado à troca de carga entre substrato e sonda nos dois sentidos da voltametria. À medida que foram incorporados o glutaraldeído e as proteínas, a superfície do polímero passível de troca de carga foi bloqueada por essas camadas isolantes, o que ocasiona um achatamento dos picos redox, indo de encontro ao fenômeno observado no monitoramento impedimétrico e, sobretudo, confirmando a deposição de cada uma das camadas da funcionalização.

Figura 57 – Monitoramento voltamétrico das etapas de funcionalização do substrato de PANI



Após a confirmação da funcionalização da PANI, o substrato foi analisado por Microscopia Eletrônica de Varredura. As figuras 58, 59, 60, 61 e 62 foram geradas por meio da técnica supracitada e tratam do aço antes e após a eletrodeposição da PANI, bem como do polímero funcionalizado antes e depois de sua exposição ao veneno de *Bothrops*.

As diferenças verificadas na figura 59 em relação à figura 58 confirmam a deposição da PANI sobre o aço e revela o perfil estrutural do polímero obtido.

Figura 58 – MEV da amostra de aço Crofer 22 APU (ampliação de 100.000x)

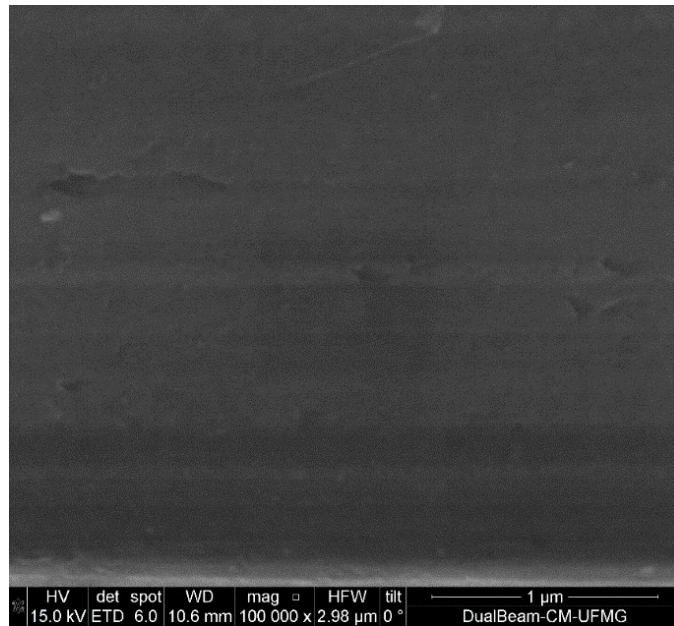
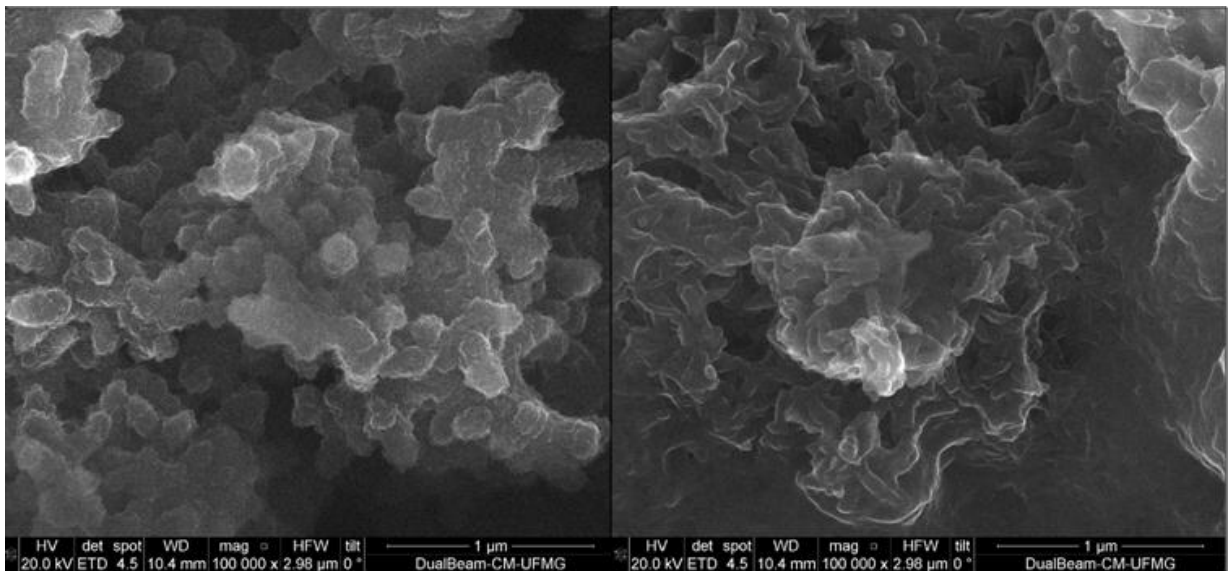


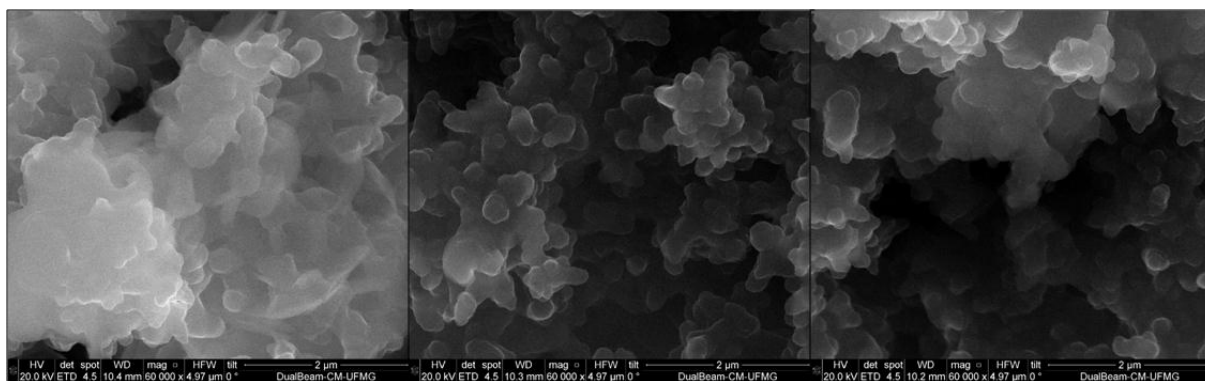
Figura 59 – Imagens de MEV da amostra de PANI depositada sobre aço Crofer 22 APU (ampliação de 100.000x)



Na mesma ampliação de 60.000 vezes, é notável expressiva diferença da PANI após sua funcionalização (figura 60), sendo que as imagens do polímero funcionalizado revelam estruturas mais volumosas e agrupadas, com regiões mais arredondadas provavelmente devido à incorporação dos anticorpos, que são

grandes proteínas e estão localizadas na extremidade superior das camadas de funcionalização. Além disso, o contraste de tons nas imagens sugere a formação das camadas automontadas, onde os anticorpos parecem estar dispostos de forma empilhada, relativamente distantes do nível do substrato.

Figura 60 – MEV da amostra de PANI funcionalizada para aplicação como biossensor (ampliação de 60.000x)



Ao adicionar o analito ao sensor, o substrato adquiriu tal caráter isolante que impossibilitou a aquisição de imagens de boa resolução em ampliações muito elevadas como as anteriores, de modo que foram obtidas as ampliações das figuras 61 e 62. Essas imagens notavelmente revelam a presença de uma estrutura de complexos mais densos e de geometria ainda mais arbitrária, características distintas daquelas do substrato funcionalizado, comprovando a interação dos anticorpos com o veneno.

Figura 61 – MEV da amostra de biossensor de PANI contendo veneno de *Bothrops* 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (ampliação de 10.000x)

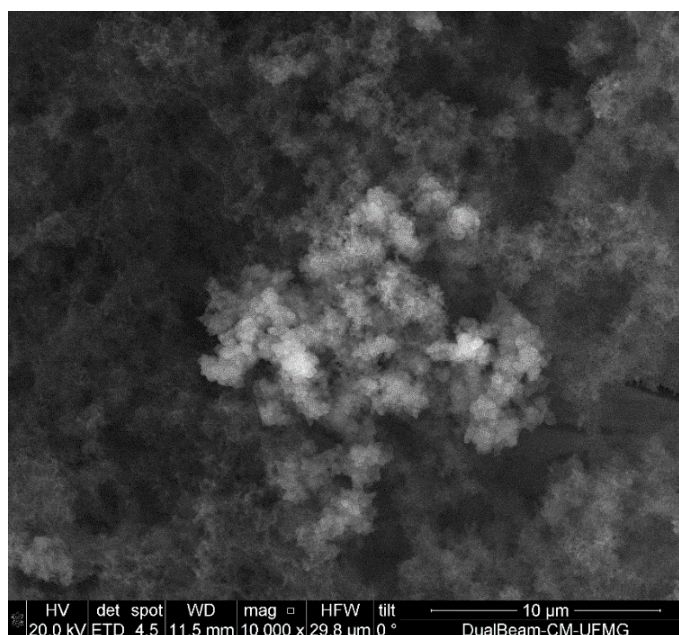
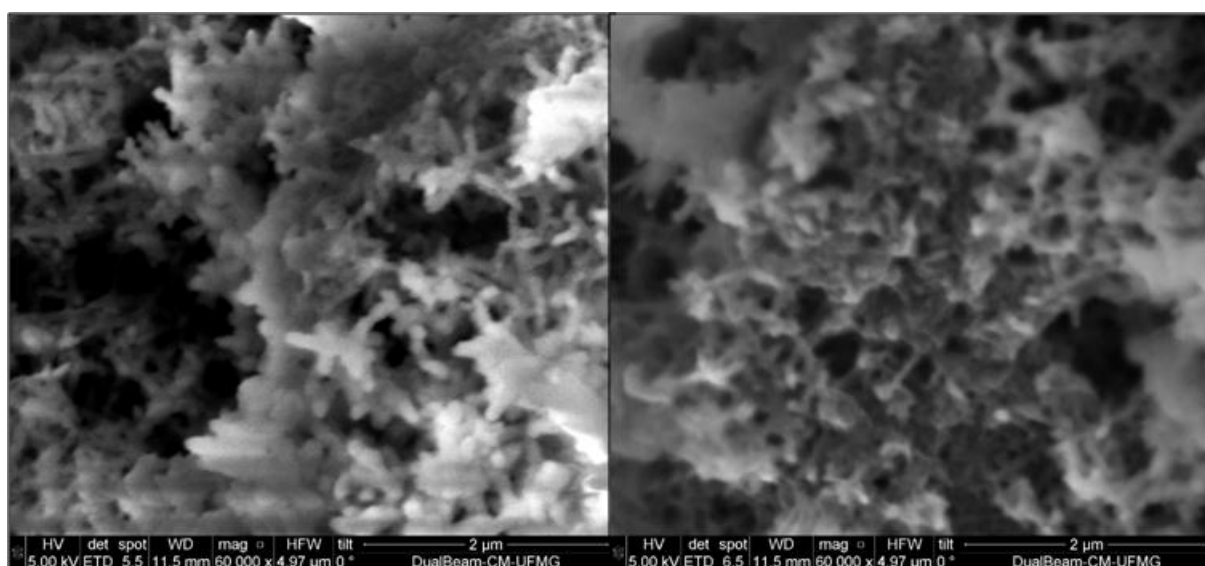


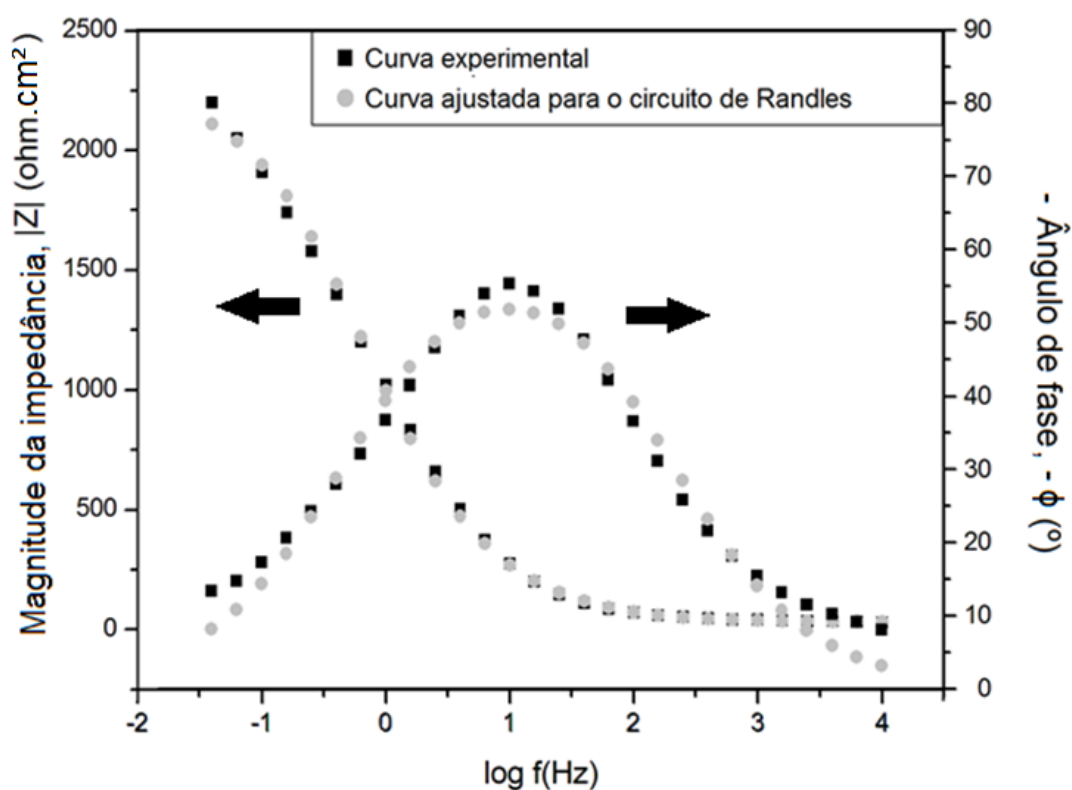
Figura 62 – MEV da amostra de biossensor de PANI contendo veneno de *Bothrops* 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (ampliação de 60.000x)



Finalmente, o biossensor de PANI foi avaliado quanto à sua capacidade de reconhecer o analito nas concentrações de 0,1; 1; 2; 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo as curvas impedimétricas experimentais ajustadas para o circuito equivalente de

Randles. A qualidade do ajuste foi constatada pela obtenção dos parâmetros do circuito com valor do parâmetro qui-quadrado entre 10^{-2} e 10^{-3} e do diagrama de Bode da figura 63, que apresenta as curvas experimental e teórica do biossensor.

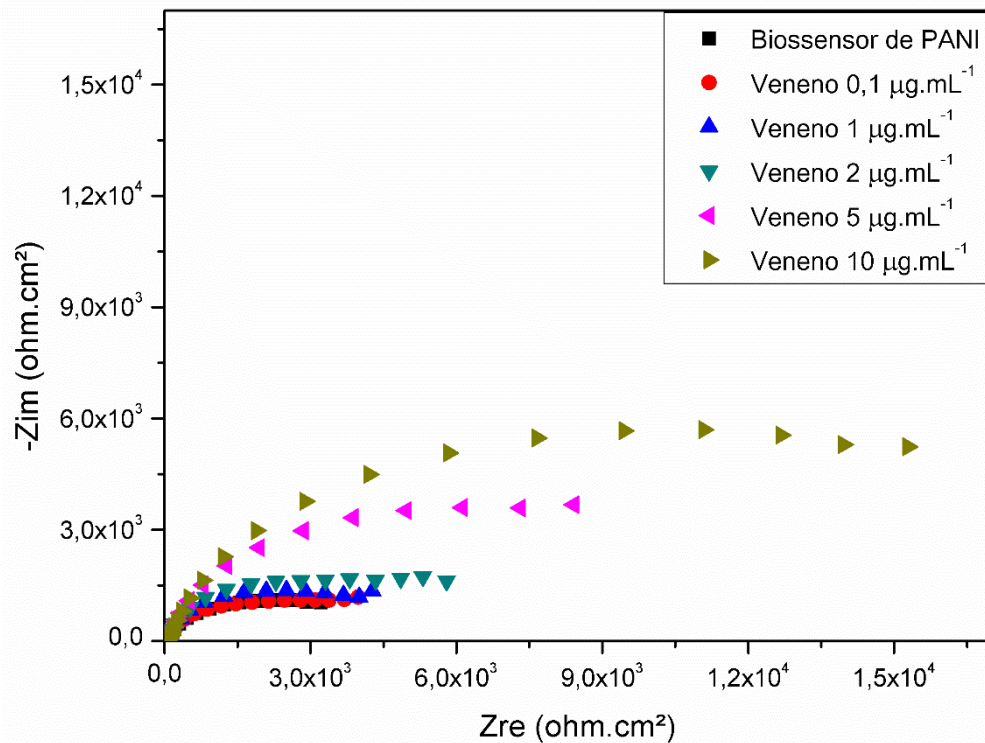
Figura 63 – Diagrama de Bode para o Espectro de Impedância do biossensor de PANI e seu ajuste ao circuito equivalente de Randles



O diagrama mostra que as curvas experimental e ajustada estão praticamente sobrepostas, o que indica que o circuito equivalente proposto representa adequadamente o perfil impedimétrico do biossensor nas condições experimentais estudadas, isto é, o sensor apresentou comportamento eletroquímico condizente com o sentido físico aduzido pelo circuito.

No que tange à detecção do veneno botrópico, o biossensor de PANI gerou o espectro de impedância da figura 64, revelando sua sensibilidade a todas as concentrações testadas do analito.

Figura 64 – Diagrama de Nyquist do biossensor de PANI frente a veneno botrópico nas concentrações de 0,1; 1; 2; 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$



A partir da análise dos valores simulados dos elementos de circuito para este biossensor, que constam na tabela 9, é possível assegurar que houve uma correlação entre a concentração de veneno e a resposta impedimétrica do dispositivo, havendo um aumento do parâmetro resistência à transferência de carga à medida que maiores quantidades do analito eram expostas ao sensor. Este comportamento se deve ao fato de que os anticorpos presentes na superfície do transdutor interagem com o analito formando o imunocomplexo antígeno-anticorpo, que devido ao seu caráter isolante advindo principalmente das numerosas cadeias carbônicas dessas proteínas, dificulta a transferência de carga entre o eletrodo e o meio contendo veneno.

Tabela 9 – Parâmetros do circuito equivalente simulado para o biossensor de PANI na ausência e presença de venenos botrópicos

Amostra	Re ($\Omega.cm^2$)	R _{tc} ($\Omega.cm^2$)	CPE1 (F.cm ²)
Biossensor de PANI	31,52 ± 1,34	2994,33 ± 739,72	1,89 . 10 ⁻⁴ ± 9,46 . 10 ⁻⁶
Veneno 0,1 µg.mL ⁻¹	25,99 ± 0,67	3378,33 ± 208,89	1,62 . 10 ⁻⁴ ± 3,98 . 10 ⁻⁶
Eluição 0,1 µg.mL ⁻¹	27,1 ± 2,19	2667,33 ± 506,17	1,76 . 10 ⁻⁴ ± 1,33 . 10 ⁻⁵
Veneno 1 µg.mL ⁻¹	32,21 ± 1,68	4094,67 ± 288,03	1,30 . 10 ⁻⁴ ± 1,57 . 10 ⁻⁶
Eluição 1 µg.mL ⁻¹	21,88 ± 0,19	2097,00 ± 276,60	1,90 . 10 ⁻⁴ ± 9,75 . 10 ⁻⁶
Veneno 2 µg.mL ⁻¹	35,62 ± 2,31	5413,00 ± 304,97	1,17 . 10 ⁻⁴ ± 6,88 . 10 ⁻⁷
Eluição 2 µg.mL ⁻¹	19,8 ± 0,24	2407,67 ± 96,70	1,93 . 10 ⁻⁴ ± 1,16 . 10 ⁻⁶
Veneno 5 µg.mL ⁻¹	42,76 ± 1,76	11020,67 ± 261,45	1,07 . 10 ⁻⁴ ± 2,55 . 10 ⁻⁶
Eluição 5 µg.mL ⁻¹	19,75 ± 0,80	2848,33 ± 326,86	1,85 . 10 ⁻⁴ ± 1,04 . 10 ⁻⁵
Veneno 10 µg.mL ⁻¹	40,35 ± 0,77	18060,67 ± 676,12	1,06 . 10 ⁻⁴ ± 2,31 . 10 ⁻⁶

Pela tabela, é possível verificar também que o elemento de constante fase (CPE1), que está relacionado à capacitância do sistema e é empregado quando se assume a não idealidade da superfície (em função de suas imperfeições e não uniformidade), também varia à medida que o sensor é exposto ao veneno. No entanto, as mencionadas variações ocorrem em diminuta ordem de grandeza (aproximadamente 10⁻⁵ Fs^(α -1)), assim, a análise da capacidade de detecção deste biossensor foi feita a partir do elemento R_{tc}, cujas variações ocorreram na ordem de até milhares de ohms, mostrando-se mais sensível às respostas imunológicas. Rezaei, Havakeshian e Ensafi (2013) também consideraram a R_{tc} para avaliar a capacidade de um imunossensor com transdutor de aço detectar a doxorrubicina, um antibiótico usado no tratamento de câncer. Os autores verificaram o aumento dessa resistência relacionando-o ao aumento da concentração do analito em virtude da dificuldade de transferência eletrônica causada pela camada isolante formada pelo imunocomplexo na superfície do sensor.

Verificada a efetiva sensibilidade do biossensor de PANI ao seu veneno homólogo, sua especificidade foi estudada expondo-o aos venenos heterólogos de *Crotalus* (figura 65 e tabela 10) e de *Micrurus* (figura 66 e tabela 11).

Figura 65 – Diagrama de Nyquist do biossensor de PANI frente a veneno crotálico nas concentrações de 0,1; 1; 2; 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

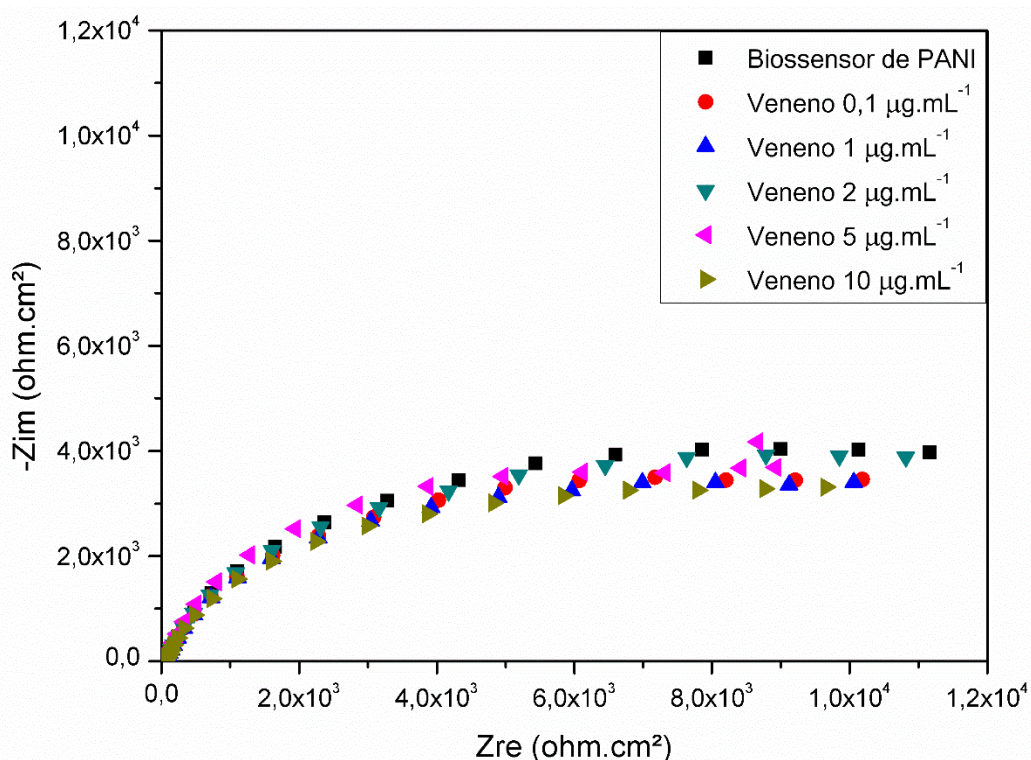


Tabela 10 – Parâmetros do circuito equivalente simulado para o biossensor de PANI na ausência e presença de venenos crotálicos

Amostra	Re ($\Omega.\text{cm}^2$)	R _{tc} ($\Omega.\text{cm}^2$)	CPE1 (F.cm ²)
Biossensor de PANI	38,59 ± 1,64	12967,50 ± 796,91	1,45 . 10 ⁻⁴ ± 2,98 . 10 ⁻⁶
Veneno 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	37,64 ± 0,96	11756,00 ± 151,32	1,50 . 10 ⁻⁴ ± 4,31 . 10 ⁻⁷
Eluição 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	38,39 ± 0,09	11530,50 ± 31,82	1,50 . 10 ⁻⁴ ± 1,27 . 10 ⁻⁷
Veneno 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	39,19 ± 0,87	11486,50 ± 23,33	1,50 . 10 ⁻⁴ ± 4,10 . 10 ⁻⁷
Eluição 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	34,24 ± 0,37	11604,50 ± 102,53	1,52 . 10 ⁻⁴ ± 9,19 . 10 ⁻⁸
Veneno 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	36,40 ± 2,29	12230,50 ± 1000,56	1,49 . 10 ⁻⁴ ± 4,48 . 10 ⁻⁶
Eluição 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	34,75 ± 0,04	11185,50 ± 16,26	1,54 . 10 ⁻⁴ ± 7,78 . 10 ⁻⁸
Veneno 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	35,76 ± 0,23	11433,50 ± 68,59	1,53 . 10 ⁻⁴ ± 6,36 . 10 ⁻⁸
Eluição 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	39,83 ± 5,99	11311,00 ± 104,65	1,30 . 10 ⁻⁴ ± 3,21 . 10 ⁻⁵
Veneno 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	35,16 ± 0,17	11328,00 ± 12,73	1,53 . 10 ⁻⁴ ± 3,32 . 10 ⁻⁷

Figura 66 – Diagrama de Nyquist do biossensor de PANI frente a veneno elapídico nas concentrações de 0,1; 1; 2; 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

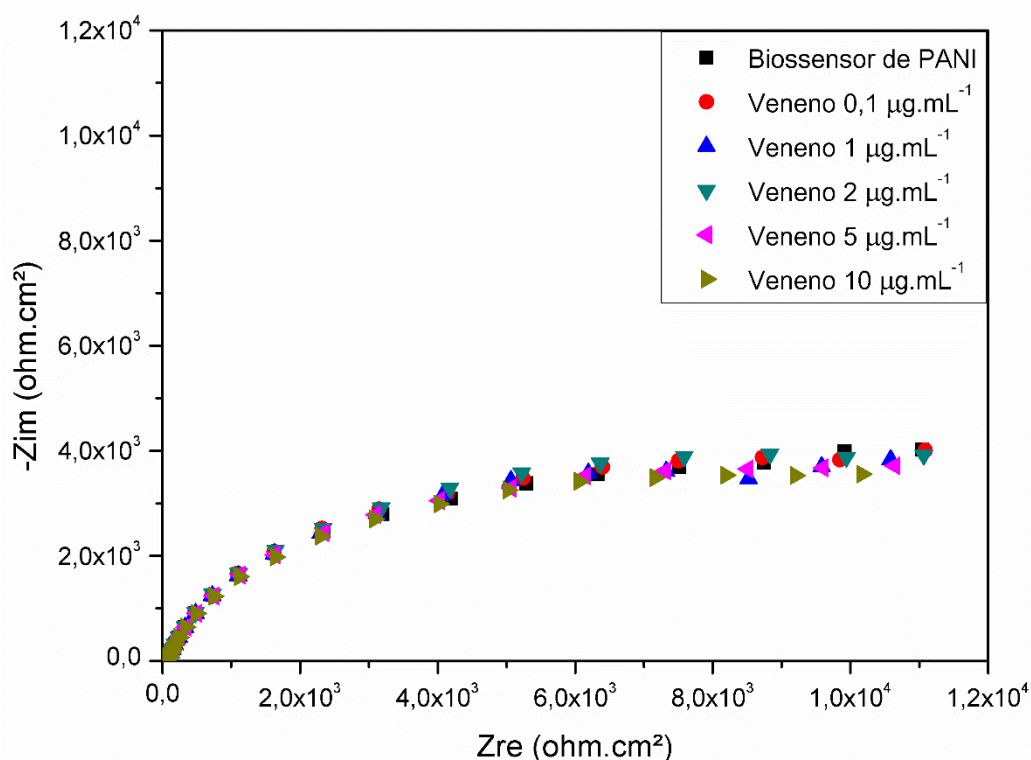


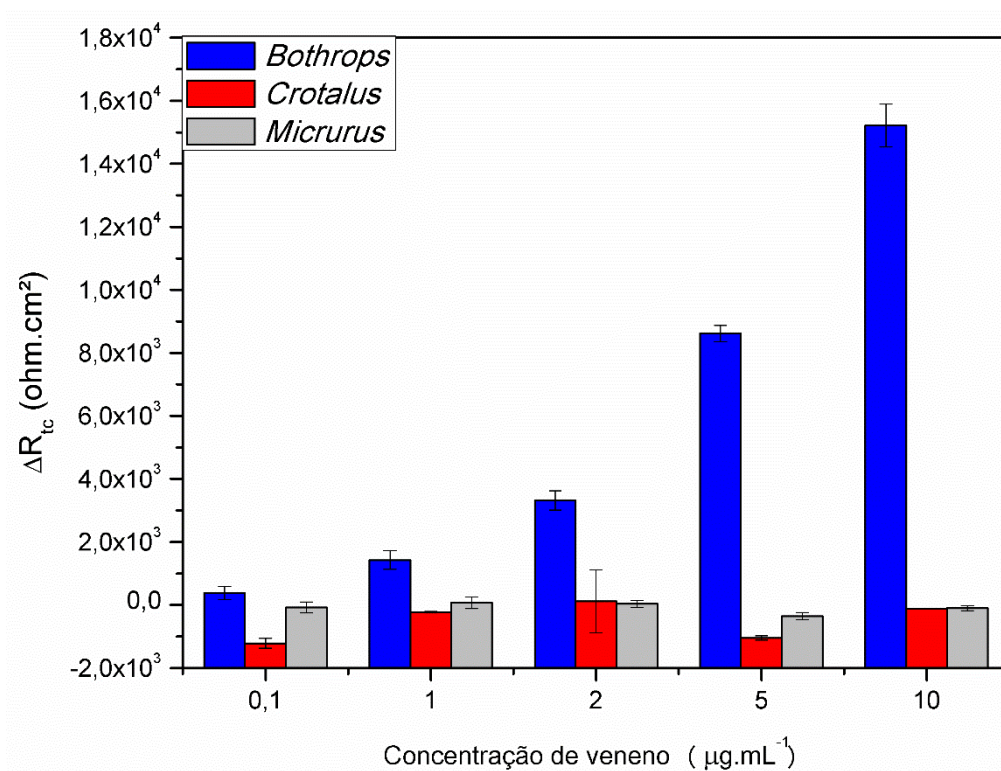
Tabela 11 – Parâmetros do circuito equivalente simulado para o biossensor de PANI na ausência e presença de venenos elapídicos

Amostra	Re ($\Omega.\text{cm}^2$)	R _{tc} ($\Omega.\text{cm}^2$)	CPE1 (F. cm^2)
Biossensor de PANI	38,81 ± 0,71	12882,00 ± 248,90	1,45 . 10 ⁻⁴ ± 5,66 . 10 ⁻⁷
Veneno 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	37,83 ± 0,11	12801,00 ± 172,53	1,47 . 10 ⁻⁴ ± 1,27 . 10 ⁻⁷
Eluição 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	37,49 ± 0,14	12452,00 ± 101,82	1,48 . 10 ⁻⁴ ± 8,63 . 10 ⁻⁷
Veneno 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	37,41 ± 0,06	12524,00 ± 188,09	1,48 . 10 ⁻⁴ ± 8,49 . 10 ⁻⁸
Eluição 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	37,54 ± 0,20	12987,00 ± 192,33	1,47 . 10 ⁻⁴ ± 1,22 . 10 ⁻⁶
Veneno 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	37,70 ± 0,04	13023,50 ± 111,01	1,46 . 10 ⁻⁴ ± 1,48 . 10 ⁻⁷
Eluição 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	43,20 ± 0,18	12607,00 ± 135,76	1,46 . 10 ⁻⁴ ± 7,07 . 10 ⁻⁷
Veneno 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	41,10 ± 2,70	12250,00 ± 114,55	1,48 . 10 ⁻⁴ ± 9,90 . 10 ⁻⁷
Eluição 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	40,68 ± 5,57	11989,50 ± 47,38	1,48 . 10 ⁻⁴ ± 1,31 . 10 ⁻⁶
Veneno 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	40,19 ± 2,70	11888,00 ± 76,37	1,48 . 10 ⁻⁴ ± 1,63 . 10 ⁻⁷

Diante dos resultados apresentados, como esperado, constatou-se que o biossensor foi incapaz de detectar qualquer dos venenos heterólogos, pois os anticorpos presentes em seu transdutor foram produzidos para a detecção exclusiva do analito botrópico. Dessa forma, a não interação dos anticorpos com as moléculas presentes nos venenos crotálico e elapídico, mesmo nas concentrações mais altas, não forma o imunocomplexo e, portanto, não altera a impedância do sistema.

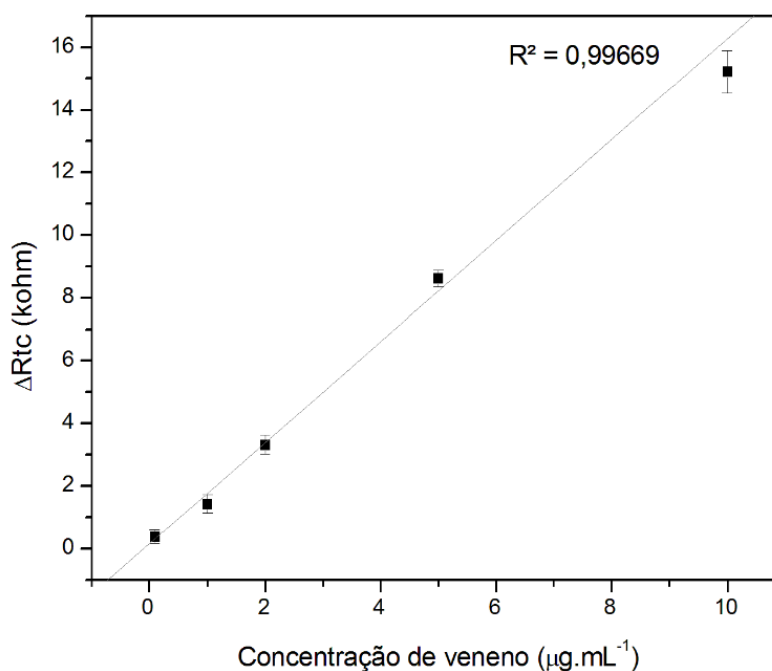
As características de sensibilidade e especificidade do biossensor são ilustradas no histograma da figura 67, que mostra a variação da resistência à transferência de carga do imunossensor diante das concentrações dos venenos homólogo e heterólogos, mostrando a alta especificidade do dispositivo construído, que foi capaz de detectar o analito de interesse em todas as concentrações testadas e respondeu de forma aleatória e com baixas resistências às adições dos venenos de *Crotalus* e *Micrurus*, mostrando que não houve reconhecimento desses.

Figura 67 – Variação da Resistência à transferência de carga (ΔR_{tc}) do biossensor de PANI diante de diferentes concentrações dos venenos de *Bothrops*, *Crotalus* e *Micrurus*



Uma tendência de aumento de R_{tc} com o aumento da concentração do veneno homólogo pode ser observada no histograma ora citado, e este comportamento foi comprovado quando traçada a reta de regressão linear para os dados de ΔR_{tc} vs concentração do analito. A figura 68 mostra a proximidade dos pontos obtidos com a reta de regressão linear, e o valor encontrado do coeficiente de regressão linear, $R^2 = 0,99669$, indica que há uma íntima relação entre os mencionados parâmetros, o que confirma novamente o reconhecimento específico do sensor e sua capacidade de detectar o analito em diversas concentrações.

Figura 68 – Regressão linear para a variação da resistência à transferência de carga do sensor de PANI exposto a veneno botrópico em diferentes concentrações



A validação estatística dos resultados obtidos foi feita aplicando-se teste t-student, num intervalo de confiança de 95%, pelo qual se avaliou as seguintes possibilidades:

- Hipótese nula, H_0 : a média dos valores de R_{tc} dos venenos é desprezível diante da média dos valores dos basais do imunossensor;
- Hipótese alternativa, H_1 : a média dos valores de R_{tc} dos venenos é maior que a média dos valores dos basais do imunossensor.

A análise permitiu verificar que para todas as concentrações do veneno homólogo foi possível rejeitar a hipótese nula, de modo que o imunossensor apresentou significativo aumento de resistência à transferência de carga mesmo para a concentração mais baixa, o que ainda permite inferir que seu limite de detecção é um valor inferior a $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

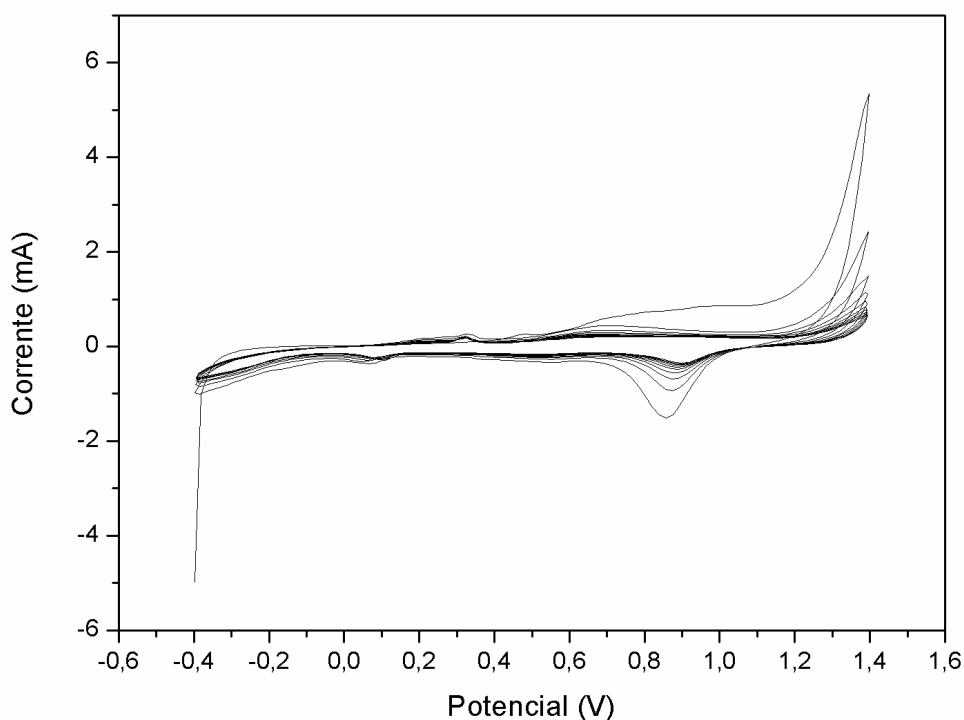
Por outro lado, a hipótese nula não pôde ser rejeitada para a resposta do imunossensor aos venenos heterólogos, o que permite afirmar que no nível de confiança avaliado, não houve ganho significativo de R_{tc} suficiente para indicar que o dispositivo reconheceu qualquer dos venenos crotálico ou elapídico.

Além disso, o mesmo teste foi realizado no sentido de avaliar se havia diferença estatística entre as médias dos valores de ΔR_{tc} para cada concentração em relação aos venenos homólogo e heterólogo. Uma vez que os valores-p para todas as concentrações, comparando-se a resposta ao veneno de *Bothrops* e *Crotalus* e também *Bothrops* e *Micrurus*, foi menor que o nível de significância (0,05), a hipótese nula de similaridade entre as respostas impedimétricas aos analitos homólogo e heterólogos pôde ser rejeitada, o que significa que o imunossensor foi altamente seletivo e específico exclusivamente para o gênero de serpente para o qual foi desenvolvido.

5.6 Biossensor de Ouro

Para a remoção das sujidades presentes no substrato de ouro, o material foi submetido à limpeza eletroquímica em meio ácido por voltametria cíclica, gerando o voltamograma apresentado na figura 69.

Figura 69 – Voltamograma cíclico (10 ciclos) do substrato de ouro imerso em solução de H₂SO₄ 0,1M



O voltamograma cíclico gerado é similar ao obtido por ZHANG *et al.* (2015), que usaram a mesma técnica para avaliar o comportamento do ouro em solução de H₂SO₄ 0,5 M. O procedimento eletroquímico também teve sua eficácia comprovada quando o substrato foi submetido a um novo procedimento de voltametria cíclica, mas em eletrólito contendo o par redox [Fe(CN)₆]^{3-/4-}.

As figuras 70 e 71 mostram o perfil voltamétrico do ouro antes e após a limpeza eletroquímica, respectivamente, sendo avaliado ainda se a repetição da metodologia de limpeza poderia otimizar a eliminação de sujidades e impurezas deste material.

Figura 70 – Voltamograma cíclico (10 ciclos) do substrato de ouro antes da limpeza eletroquímica em solução de KCl 0,1 M + $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5 mM

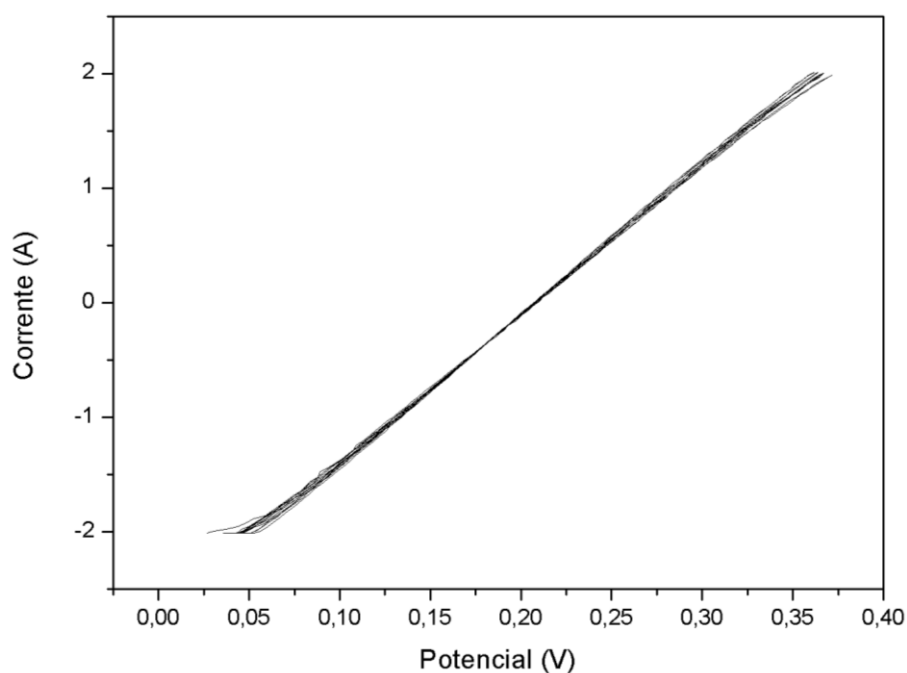
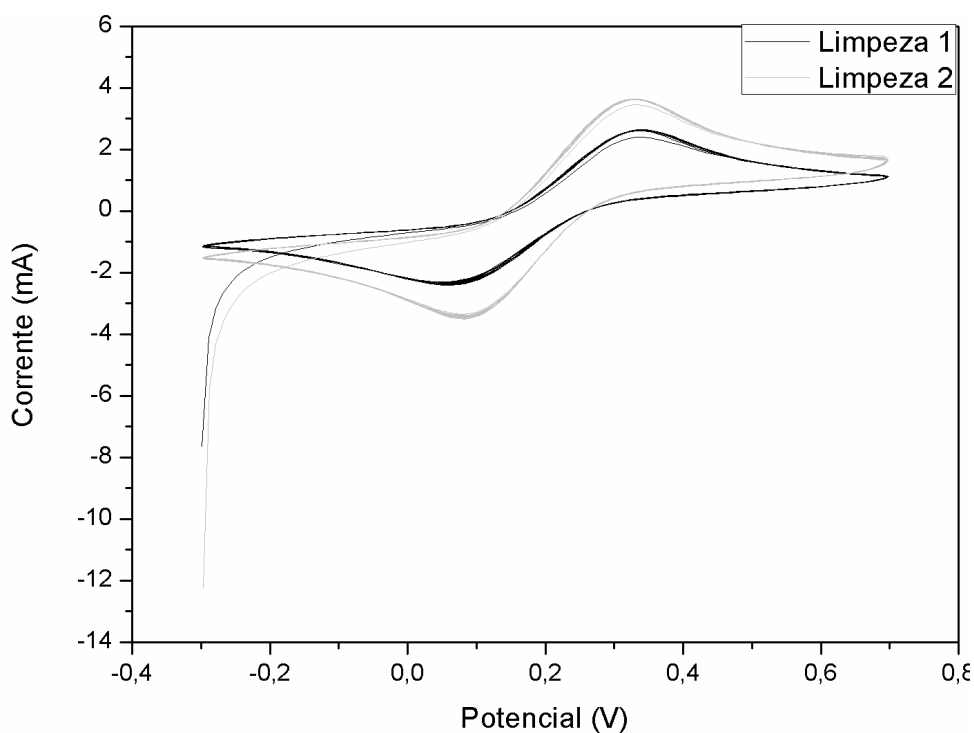


Figura 71 – Voltamograma cíclico (10 ciclos) do substrato de ouro em solução de KCl 0,1 M + $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5 mM após duas limpezas eletroquímicas em ácido sulfúrico



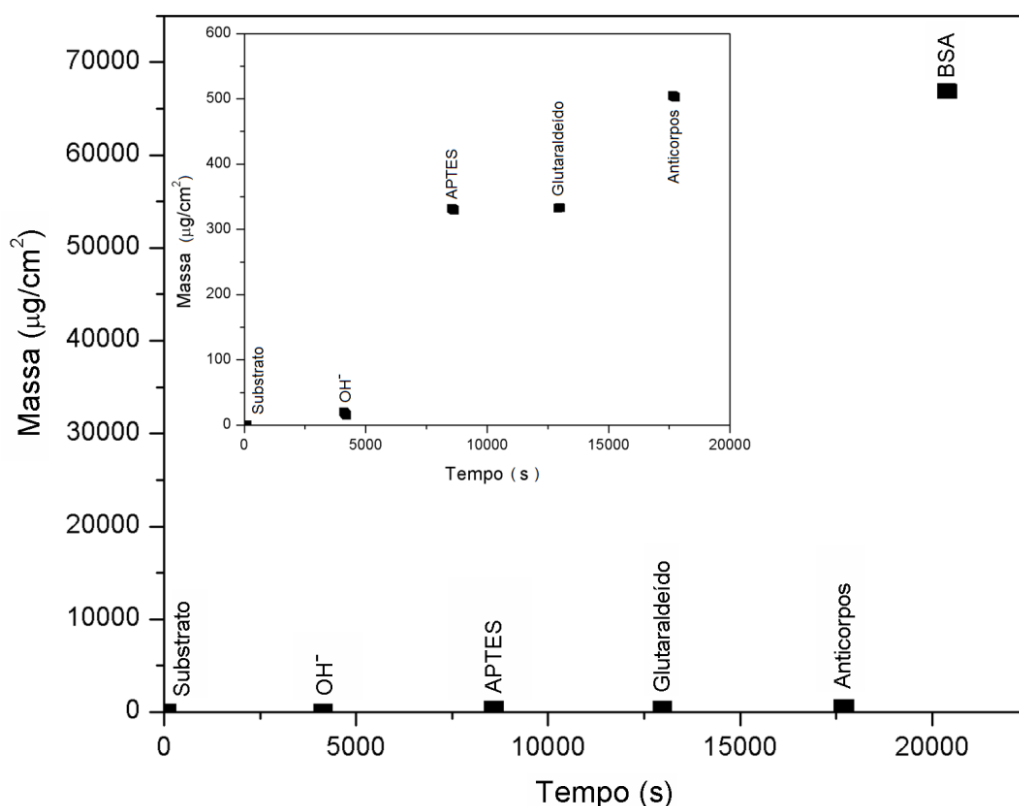
A análise dos voltamogramas permite verificar que a curva relativa à amostra antes da limpeza coibiu o aparecimento dos picos de oxidação e redução do par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, ao passo que após a limpeza, os picos ficaram mais evidentes.

Em relação à variação entre os potenciais anódico e catódico, obteve-se, a partir do segundo ciclo, $\Delta E_p = 283,09$ mV, distanciado em 310,5% do valor de 58 mV adotado como ideal para uma superfície de ouro perfeita, como enunciado por Fischer *et al.* (2009). O valor encontrado foi dado como suficiente e indicativo de boa limpeza do substrato, pois este não foi completamente imerso na solução de limpeza, quando fora exposta apenas uma área um pouco maior do que aquela onde ocorreria a funcionalização com deposição de anticorpos. Tal consideração foi adotada porque a região não imersa, contendo, portanto, irregularidades e imperfeições, tem a função apenas de servir como contato elétrico entre o substrato e o potenciostato. Ademais, verificou-se pouca diferença entre os perfis voltamétricos do ouro submetido a uma ou duas limpezas, inferindo-se que um único deste procedimento eletroquímico poderia ser adotado para este substrato.

Quanto ao emprego deste substrato como transdutor para o biossensor, para verificar os ganhos de massa ocasionados pelos reagentes empregados em sua funcionalização, uma Microbalança de Cristal de Quartzo foi usada coletando-se as informações de frequência de ressonância de um cristal de quartzo contendo eletrodo de ouro a cada etapa deste procedimento.

Ao se verificar a efetividade da funcionalização do substrato de ouro usando a QCM, figura 72, foram constatados os aumentos de massa: discreto para a hidroxilação, devido à pequena massa dos grupos OH^- , e mais pronunciados para os demais reagentes.

Figura 72 – Monitoramento piezoelétrico das etapas de funcionalização do substrato de ouro usando glutaraldeído 0,1%



Considerando a estequiometria da reação entre o silano e o aldeído, espera-se que cada molécula de APTES, por meio de seu grupo NH_2 , reaja com uma molécula de glutaraldeído (pela interação com o oxigênio ligado a carbono insaturado). No entanto, o glutaraldeído foi adicionado em concentração 10 vezes menor que a do silano, não obedecendo à estequiometria da reação. Além disso, as duas terminações da molécula do aldeído são iguais, podendo então fazer com que uma molécula de glutaraldeído reaja com duas moléculas de APTES. As figuras 73 e 74 a seguir representam as duas possibilidades de ligação entre os mencionados reagentes.

Figura 73 – Possibilidade 1: ligação de uma molécula de glutaraldeído a duas moléculas de APTES

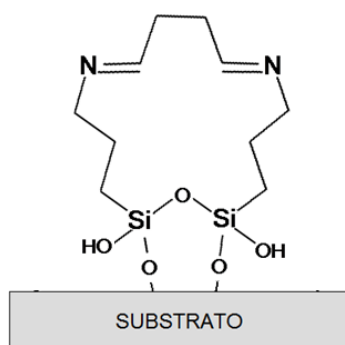
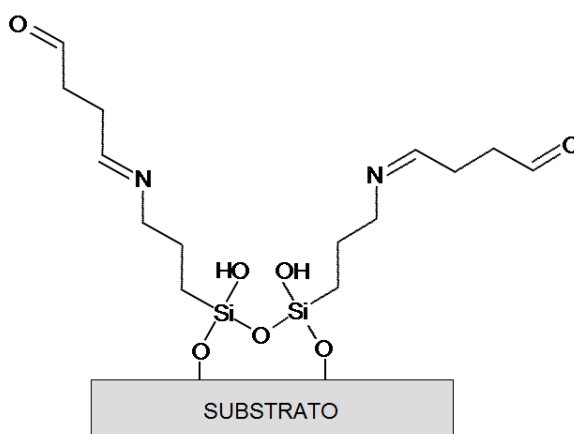


Figura 74 – Possibilidade 2: ligação de uma molécula de glutaraldeído a cada uma molécula de APTES



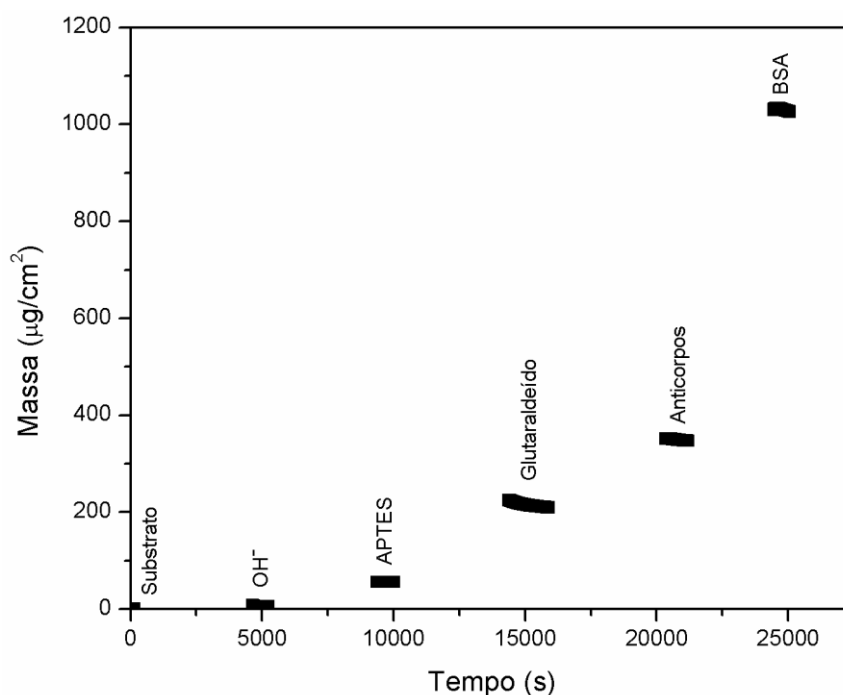
No caso da possibilidade 1, os nitrogênios de ambas as moléculas vizinhas de APTES estariam ligados aos carbonos insaturados de uma mesma molécula de glutaraldeído, impossibilitando que o aldeído tenha uma terminação de oxigênio disponível para se ligar ao anticorpo na próxima etapa da funcionalização. Por outro lado, a possibilidade 2 indica uma situação ideal na qual a razão de APTES e glutaraldeído é 1:1, permitindo que as moléculas de aldeído estejam livres para interagir com o anticorpo na etapa seguinte.

Acredita-se que o protocolo experimental usando glutaraldeído 0,1% provoca a reação enunciada na possibilidade 1. Esta hipótese é ainda fundamentada quando se verifica o aumento de massa decorrente da adição de anticorpos, pois no volume

de 50 μL de solução de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dessas proteínas, há $0,5 \mu\text{g}$ dessas proteínas, massa exatamente igual à do APTES, considerando seu peso molecular de $221 \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e o mesmo volume de $50 \mu\text{L}$ empregado. Dessa forma, era esperado um ganho de massa similar nas duas etapas, o que não foi verificado no resultado, onde os anticorpos contribuíram com menor valor.

A fim de verificar as hipóteses *a priori* discutidas, uma nova funcionalização foi realizada, desta vez empregando concentração de glutaraldeído de 1%, assim, haveria tal quantidade de aldeídos em solução que os grupamentos amino do APTES se ligariam a essas moléculas logo as saturando e não havendo tempo para o rearranjo formado na possibilidade 1. O resultado desta tentativa consta na figura 75 e revela a consistência da suposição estudada.

Figura 75 – Monitoramento piezoelétrico das etapas de funcionalização do substrato de ouro usando glutaraldeído 1%



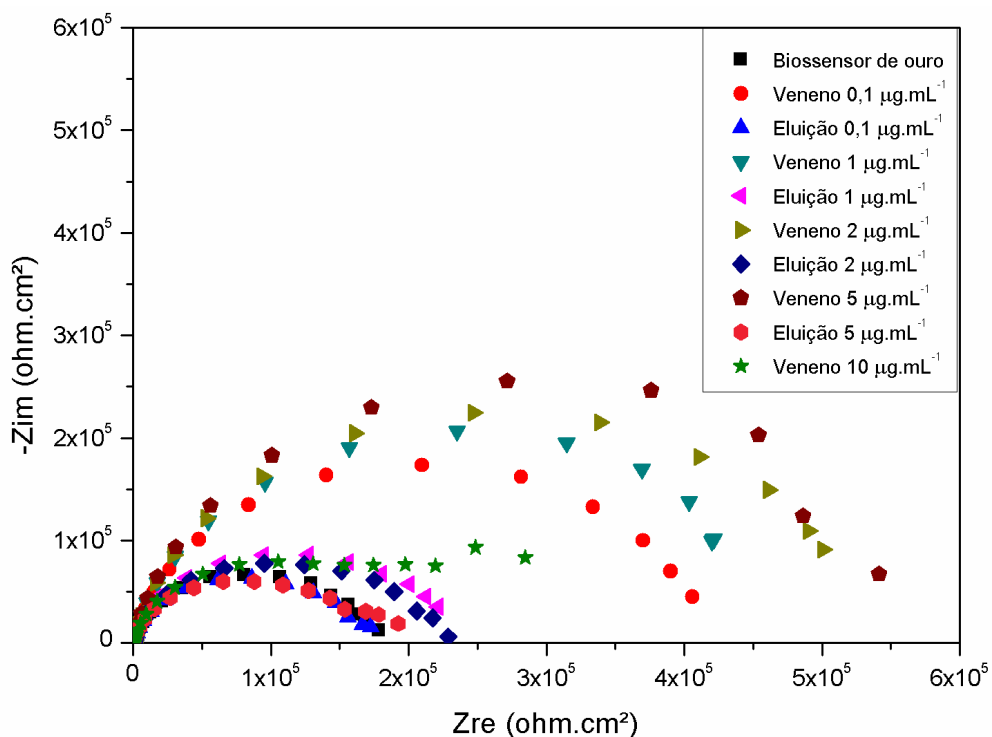
Lançando mão do novo procedimento, o ganho de massa ocasionado pela adição de anticorpos ($134,35 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) foi superior àquele decorrido da silanização ($50,36 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), levando a crer que mais oxigênios livres do glutaraldeído estiveram disponíveis para se ligarem aos anticorpos. Embora adicionada a mesma massa de anticorpos e APTES, é esperado que, por unidade de área, haja mesmo maior

quantidade mássica da proteína como se constatou, uma vez que seu peso molecular é de $150000 \text{ g.mol}^{-1}$, valor superior ao do silano. A partir deste resultado, a funcionalização de todos os materiais foi realizada usando glutaraldeído na concentração de 1%.

Outra grande diferença foi também observada entre os ganhos de massa nos cristais submetidos aos diferentes modos de funcionalização: a variação piezoelétrica causada pela adição de albumina. Embora a proteína tenha sido adicionada na mesma concentração nos dois procedimentos, aquele onde se usou glutaraldeído em maior concentração gerou um menor acréscimo gravimétrico devido à BSA, o que pode ser explicado pelo fato de que na adição de glutaraldeído 0,1%, maior quantidade de anticorpo pôde ser inserida ao transdutor, gerando alto impedimento estérico em sua superfície e, conseqüentemente, dificultando que BSA se deslocasse do seio da solução até a base do ouro, adsorvendo-se em menor quantidade a essa superfície.

Para as medidas impedimétricas deste substrato, foi utilizada a microcélula descrita na seção 4.4 desta dissertação. Os resultados do biossensor diante de veneno botrópico nas concentrações de 0,1; 1; 2; 5 e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ são expressos na figura 76.

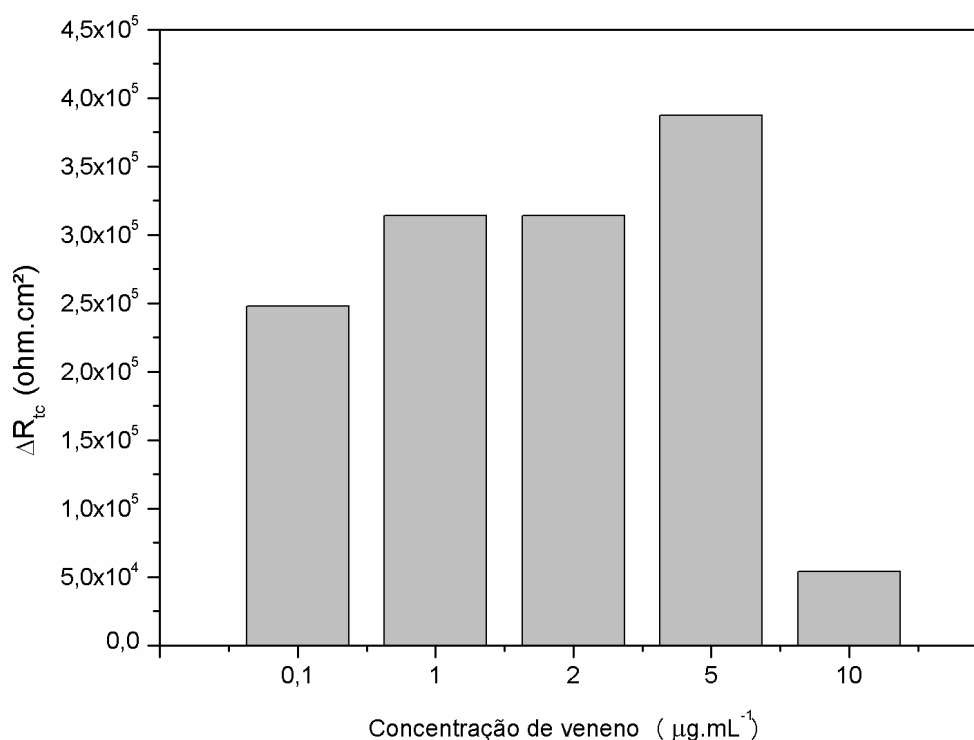
Figura 76 – Diagrama de Nyquist do biossensor de ouro frente a veneno de *Bothrops* nas concentrações de 0,1; 1; 2; 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$



O diagrama de Nyquist revela que o biossensor foi capaz de detectar todas as concentrações do veneno botrópico, com ganhos de impedância conforme se aumentava a concentração do analito. Ainda, uma característica interessante deste dispositivo foi a reprodutibilidade das eluições, vide o fato de que os semicírculos relativos a essas medidas estiveram bem próximos em todos os casos.

Para a melhor visualização da sensibilidade do dispositivo às diferentes quantidades de veneno botrópico, a figura 77 apresenta a variação de R_{tc} em função da concentração do analito.

Figura 77 – Variação da resistência à transferência de carga do biossensor de ouro frente às concentrações de 1, 2, 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do veneno homólogo



Por este histograma, a conclusão obtida sobre a sensibilidade a todas as concentrações testadas a partir da interpretação do diagrama de Nyquist é reforçada, no entanto, o aumento de R_{tc} não é proporcional às maiores concentrações do veneno. Um salto impedimétrico é verificado da concentração de 0,1 a 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (66460 Ω), e uma pequena diferença deste parâmetro (80 Ω) é constatada entre as concentrações 1 e 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A concentração de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi a que gerou maior ΔR_{tc} total, e a maior concentração, 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, provocou o menor ganho de resistência.

Cabe salientar que após a realização de vários testes na microcélula eletroquímica, provavelmente devido à intensidade da força ocasionada pelos parafusos responsáveis pela vedação desta célula, trincas observadas em sua estrutura se desenvolveram até ocasionar o completo rompimento do material, impossibilitando a obtenção de mais resultados com este dispositivo, inclusive as triplicatas dos testes ora realizados. Por esta razão, o experimento que gerou a figura 77 foi realizado

apenas uma vez, e o resultado pode estar associado à instabilidade do sistema, decorrente de pequenos vazamentos de eletrólito pelas trincas.

De todo modo, visto que o sensor foi sensível até mesmo à mais baixa das concentrações, antes do completo rompimento da microcélula, um novo teste foi feito com menores concentrações do analito com o objetivo de se conhecer seu limite de detecção.

Assim, as respostas impedimétricas do sensor frente às novas concentrações, quais sejam 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ são expressas no diagrama de Nyquist da figura 78, que devido ao inconveniente da estrutura da célula também não fora realizado em triplicata (mas em duplicata), e no histograma de ΔR_{tc} em função da concentração de veneno na figura 79.

Figura 78 – Diagrama de Nyquist do biossensor de ouro frente a veneno de *Bothrops* nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

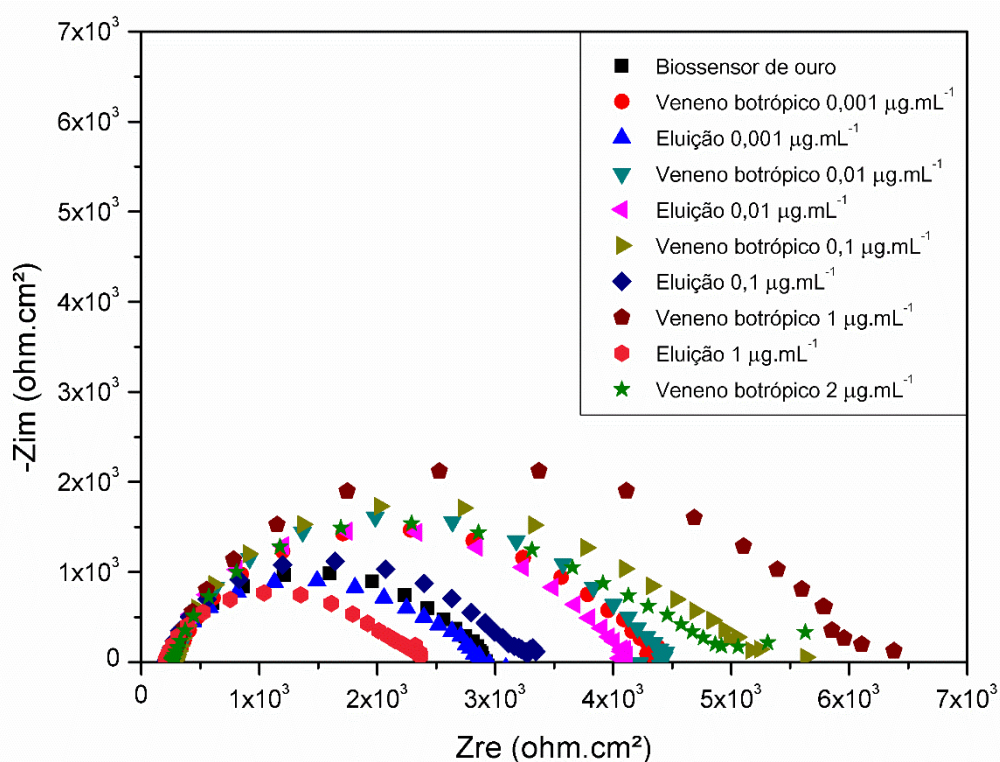
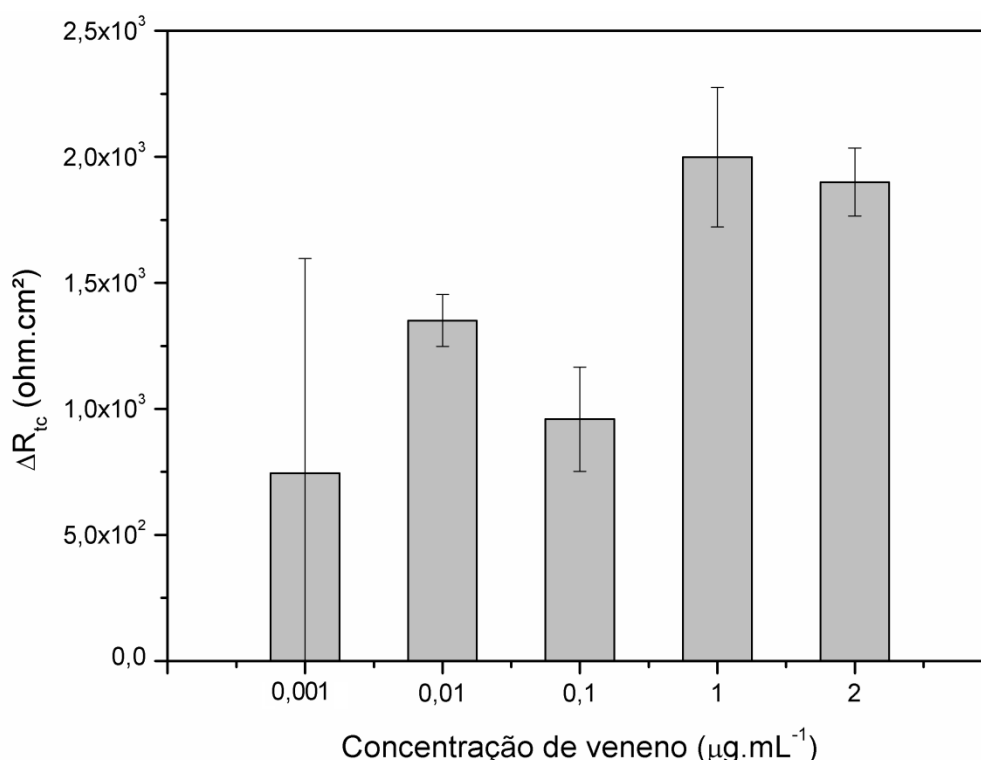


Figura 79 – Variação da resistência à transferência de carga do biossensor de ouro frente às concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do veneno homólogo



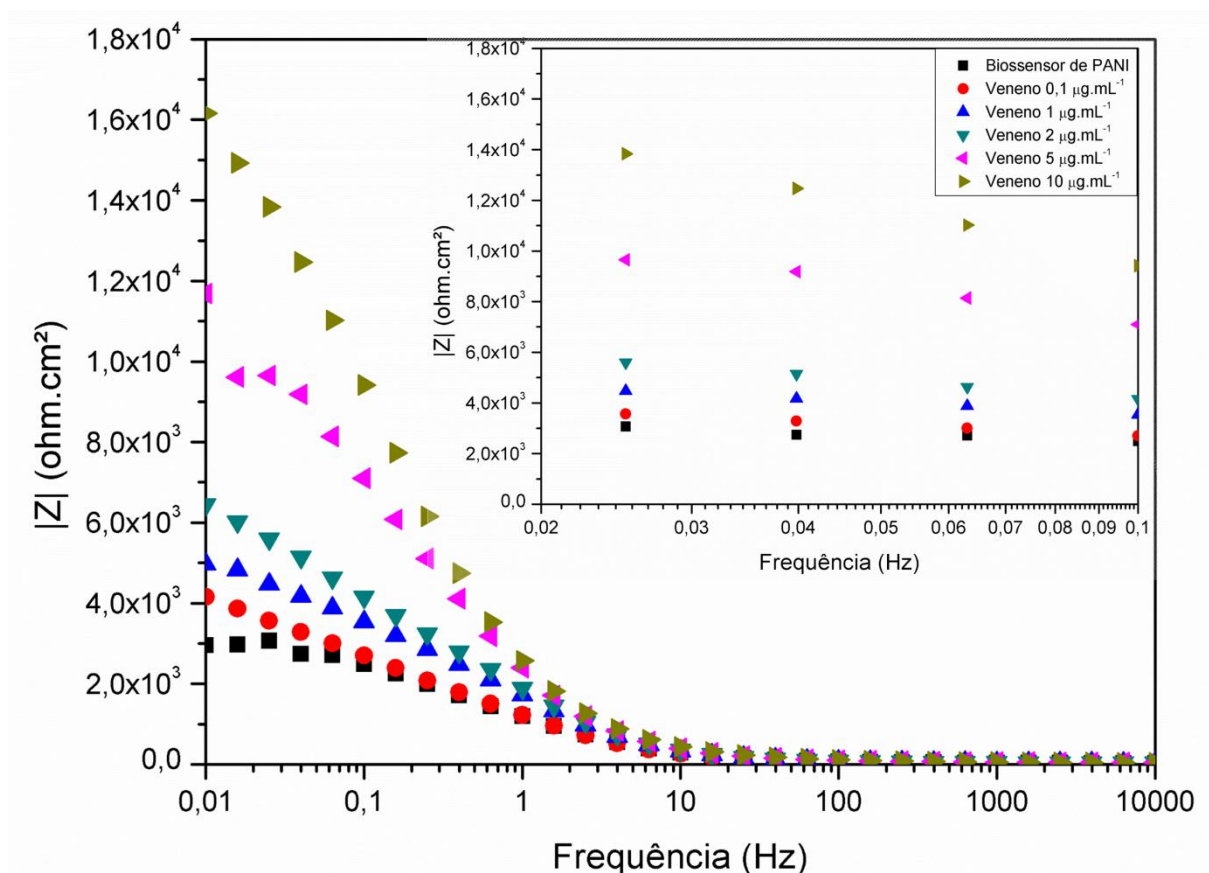
Entre as concentrações analisadas, aquela que aparentemente sofreu maior influência da instabilidade da microcélula foi justamente a menor, 0,001 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, impossibilitando a inferência de que este fosse o limite de detecção do sensor. Todavia, assegura-se que o dispositivo reconheceu a concentração de 0,01 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, dado que houve uma variação de R_{tc} de 1351 Ω e um desvio padrão de apenas $\pm 103,24 \Omega$. Novamente é possível afirmar que o imunossensor produzido foi capaz de detectar o veneno homólogo (em concentrações de no mínimo 0,01 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), mas seu limite de detecção permaneceu inconclusivo com os resultados obtidos e a reprodutibilidade de sua resposta também não pôde ser assegurada, o que pode ser visto pelas concentrações de 1 e 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, cujas respostas impedimétricas foram apresentadas anteriormente e aduziram valores de ΔR_{tc} muito discrepantes.

5.7 Análise do tempo de diagnóstico

Independente do substrato utilizado na construção do biossensor, o dispositivo apresentou como vantagem o tempo de análise demandado na EIE, característica que ainda pode ser otimizada, considerando-se que a resistência à transferência de carga foi o parâmetro utilizado para a inferência sobre a sensibilidade e especificidade do sensor e que este é um elemento obtido a partir das menores frequências nos diagramas de Nyquist ou Bode.

A figura 80 mostra o Diagrama de Bode (magnitude da impedância em função da frequência) para o imunossensor de PANI estudado na seção 5.4 frente a veneno botrópico nas concentrações de 0,1; 1; 2; 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e ilustra a proposição anterior.

Figura 80 – Diagrama de Bode do biossensor de PANI frente a diferentes concentrações de veneno botrópico e ampliação da região de baixas frequências (0,1 – 0,02 Hz)



Por este diagrama se nota que as curvas analíticas estão praticamente sobrepostas na região de altas frequências, e que o distanciamento entre elas, ocasionado pelas diferentes concentrações do analito se dá em maior grau em frequências próximas a 0,01 Hz. A ampliação da região entre 0,1 e 0,02 Hz mostrada na figura sugere que esta faixa já seria suficiente para a medida usando o biossensor ou, ainda, que até a aplicação de uma frequência constante, de 0,04 Hz por exemplo, seria eficiente para se observar variação da resposta impedimétrica do dispositivo em função da concentração de veneno a que foi exposto.

Utilizando toda a janela de frequências estudada nesta pesquisa, o tempo total de diagnóstico para o reconhecimento do veneno ofídico seria resultado da soma entre o período de estabilização do OCP (5 minutos), o tempo de incubação do analito (20 minutos), sua lavagem com tampão Tris (5 minutos) e o tempo total dispensado na EIE, que para o imunossensor de PANI estudado foi, em média, igual a $6,58 \pm 1,26$ min, totalizando 36,58 min de diagnóstico. Caso fosse analisada apenas a faixa de 0,1 a 0,02 Hz, a medida de EIE ocorreria em $3,55 \pm 0,63$ min, totalizando 33,55 min de teste.

Em todos os panoramas estudados, o diagnóstico acerca do acidente ofídico ocorreria de forma rápida, o que evitaria maiores complicações ao paciente acidentado em razão do avanço do quadro clínico gerado pelo veneno no organismo.

6 CONCLUSÕES

Os anticorpos produzidos neste trabalho apresentaram pureza comprovada pela técnica de eletroforese, com banda intensa na região relativa ao peso molecular característico de imunoglobulinas G, 150 kDa.

Quanto aos substratos estudados, a produção de dióxido de titânio pelo método de Sol-Gel foi eficiente, revelando o pico característico da fase anatase com índices de Miller (1 0 1) verificado pela técnica de difração de raios-X.

A polianilina, eletrodepositada sobre o aço Crofer 22 APU, foi produzida em sua fase condutora sal de esmeraldina, apresentando em ensaio de voltametria cíclica todos os picos de oxidação e redução deste polímero. Além disso, a deposição deste polímero foi capaz de aumentar consideravelmente a condutividade do seu substrato.

Foi possível verificar a eficiência da funcionalização em todos os substratos utilizados como transdutores nesta pesquisa, sendo tal fato comprovado pelos ganhos de impedância decorrentes das adições de APTES, glutaraldeído, anticorpos e soroalbumina bovina, e o decréscimo quando na etapa de hidroxilação. A mesma comprovação foi obtida pela técnica de voltametria cíclica, que revelou um aumento da intensidade dos picos do par redox quando os substratos estavam hidroxilados, e um achatamento dos mesmos à medida que as camadas isolantes de silano, aldeído e proteínas eram adicionadas.

Entre os substratos, aquele que apresentou maior área eletroativa foi a Polianilina, revelando também a maior sensibilidade analítica às concentrações do veneno homólogo, embora todos os imunossensores produzidos tenham sido eficientes na detecção dos venenos botrópicos. Quanto à especificidade dos dispositivos produzidos, constatou-se que os imunossensores foram capazes de reconhecer apenas o analito para o qual foram desenvolvidos, não ocorrendo, principalmente para os biossensores de aço Crofer 22 APU e PANI, aumentos significativos da resistência à transferência de carga diante dos venenos heterólogos de *Crotalus* e *Micrurus* nem mesmo nas mais altas concentrações testadas.

Ainda, os sensores apresentaram como vantagens o potencial de reutilização, que foi comprovado pela sensibilidade aos venenos homólogos mesmo após vários

ciclos de detecção e eluição, e o tempo de diagnóstico, estimado em aproximadamente 36,58 minutos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Visando à continuidade desta pesquisa, são sugestões para trabalhos futuros:

- Avaliação da concentração ótima de anticorpos a ser utilizada na funcionalização dos substratos;
- Avaliação do tempo ótimo de incubação do antígeno de modo a se obter a melhor resposta impedimétrica;
- Determinação do limite mínimo de detecção dos imunossensores produzidos;
- Avaliação da capacidade de o sensor reconhecer o analito em presença de fluido biológico (sangue de animal) e em amostras reais de pacientes envenenados;
- Determinação do número de vezes que o sensor pode ser empregado sem prejuízo de sua sensibilidade;
- Desenvolvimento de imunossensores detectores de outros venenos ofídicos, tais como aqueles estudados como heterólogos neste trabalho;
- Purificação de anticorpos específicos contra os componentes específicos dos venenos e uso na funcionalização dos substratos com vistas à obtenção de ligações mais específicas e um reconhecimento imunológico capaz de gerar respostas impedimétricas mais pronunciadas e seletivas;
- Funcionalização do biossensor com orientação dos anticorpos de modo que seus sítios de ligação estejam sempre disponíveis para ligação com antígeno (imobilização das moléculas exclusivamente pela fração F_c) para que seja alcançada maior sensibilidade do dispositivo;
- Desenvolvimento de imunossensor piezoelétrico e comparação de sua eficiência com aquela obtida pelo impedimétrico;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. **A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores**. Química Nova, vol. 25, n.5, p. 835-841, 2002.

ALIROL, E.; SHARMA, S. K.; BAWASKAR, H. S.; KUCH, U.; CHAPPUIS, F. **Snake bite in South Asia: a review**. Plos Neglected Tropical Diseases, v. 4, i. 1, e603, 2010.

ARCOS, M. R.; ROMO, M. G. G.; FLORES, H. E. M. **Electrochemical Study and Characterization of an Amperometric Biosensor Based on the Immobilization of Laccase in a Nanostructure of TiO₂ Synthesized by the Sol-Gel Method**. Materials, 9 (7), 543. 2016.

AUN, D. P. **Flexible TiO₂ coating on superelastic NiTi alloys for bioaplications**. Tese de Doutorado, Departamento de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas, UFMG, 2016.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HERING, S. E. **Acidentes por animais peçonhentos – serpentes peçonhentas**. Medicina, Ribeirão Preto, 36: 480 – 289, 2003.

BARBERO, G.; ALEXE-IONESCU, A. L.; LELIDIS, I. **Significance of small voltage in impedance spectroscopy measurements on electrolytic cells**. In: Journal of Applied physics, v. 98, n. 11, 2005.

BARBOSA, A. R. D. B. **Construção de um biossensor para o doseamento de ureia baseado na inibição enzimática de amidase de *Pseudomonas aeruginosa***

como recurso a um eléctrodo selectivo de iões amónio. Dissertação de Mestrado. Instituto Politécnico de Lisboa, 2008.

BLEICHER, L.; SASAKI, J. M. **Introdução à Difração de Raios-X em Cristais.**

Universidade Federal do Ceará. 2000. Disponível em:

<<http://www.agracadaquimica.com.br/quimica/arealegal/outros/173.pdf>>. Acesso em 12 jan. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica.** Secretaria de Vigilância em Saúde, 6. Ed., Brasília, 2005.

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica – Princípios, Métodos e Aplicações.** Almeida, Coimbra, 1996.

BRUNO, L.; BARRA, G.; MANSUR, H.; ORÉFICE, R. L. **Imobilização de proteínas do veneno do escorpião *Tytilus serrulatus* em blenda condutora de polianilina-poli(metacrilato de hidroxietila).** *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 14, n.3, p. 156-161, 2004.

CANBAZ, M. Ç.; SEZGINTÜRK; M. K. **Fabrication of a highly sensitive disposable imunossensor based on índium tin oxide substrates for biomarker detection.** *Analytical Biochemistry* 446, p. 9-18, 2014.

CAPRONI, P. **Ação da Bothropstoxina-1 do veneno total de *Bothrops jararacussu* irradiado sobre o sistema imune.** Dissertação de Mestrado. São Paulo, 2009.

CLARK JR., L. C.; LYONS, C. **Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery**. Annals of the New York Academy of Sciences, New York, 1962.

CULLITY, B. D.; STOCK, S. R. **Elements of X-ray diffraction**. 3rd Ed, New Jersey, USA: Prentice Hall, Inc. 2001.

DAMIANI, L. R. **Filmes de óxido de índio dopado com estanho depositados por magnetron sputtering**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, 2010.

DANIELS, J. S.; POURMAND, N. **Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges**. Review. Electroanalysis 19, n. 12, p. 1239-1257, 2007.

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, vol. 27, n. 6, p. 970-979. 2004.

DEDAVID, B. A., GOMES, C. I., MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

DHAN, C.; DWIVEDI, N.; MISHRA, S.; SOLANKI, P. R.; MAYANDI, V.; BEUERMAN, R. W.; RAMAKRISHNA, S.; LAKSHMINARAYANAN, R.; MALHOTRA, B. D. **Polyaniline-based biosensors**. Nanobiosensors in Disease Diagnosis, v.4, p.25-46. 2015.

DHONG, L. V.; QUYEN, L. K.; ENG, K. H.; GOPALAKRISHNAKONE, P. **Immunogenicity of venoms from four common snakes in the South of Vietnam**

and development of ELISA kit for venom detection. Journal of Immunological Methods 282, 13 – 31, 2003.

EVTUGYN, G. **Biosensors – Essentials.** Springer Heidelberg, New York, 2014.

FILHO, H. D. F.; LOPES, G. A. C. **Avanços em caracterização de amostras sólidas cristalinas através de Difractometria de Raios-X.** Estação Científica, UNIFAP, Macampá, v.3, n.1, p.31-45, jan-jun. 2013.

FISCHER, L. M.; TENJE, M.; HEISKANEN, A. R.; MASUDA, N.; CASTILLO, J.; BENTIEN, A.; ÉMNEUS, J.; JAKOBSEN, M. H.; BOISEN, A. **Gold cleaning methods for electrochemical detection applications.** Microelectronic Engineering 86, p. 1282 – 1285, 2009.

FUNASA, Fundação Nacional de Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos.** 2ª edição, Brasília, 2001.

FUNED, Fundação Ezequiel Dias. **Cartilha Animais peçonhentos.** Belo Horizonte, 5ª edição, 2014. Disponível em: <<https://www.funed.mg.gov.br/publicacoes-e-manuais/cartilha-sobre-animais-peconhentos/>>. Acesso em 9 nov. 2016.

FURTADO, R.F.; DUTRA, R.A.F.; ALVES, C.R.; PIMENTA, M.G.R.; GUEDES, M.I.F. **Aplicações de biossensores na análise da qualidade de alimentos.** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2008.

GOPINATH, S. C. B.; TANG, T.; CITARTAN, M.; CHEN, Y.; LAKSHMIPRIYA, T. **Current aspects in immunosensors.** Biosensors and Bioelectronics, v. 57, p.292-302, 2014.

GUO, D.; ZHUO, M.; ZHANG, X.; XU, C.; JIANG, J.; GAO, F.; WAN, Q.; LI, Q.; WANG, T. **Indium-tin-oxide thin film transistor biosensors for label-free detection of avian influenza virus H5N1**. *Analytica Chimica Acta*, v. 773, p. 83-88. 2013.

HANSEN, B. **Metodologia para produção de biossensores amperométricos enzimáticos utilizando polímeros condutores: caso Polianilina**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

HENEINE, L. G. D. **An immunological study of Brazilian snake venom antigens towards a species-specific diagnostic assay**. Tese de Doutorado, University of Birmingham, 1995.

HENEINE, L.G.D.; CATTY, D. **Species-specific detection of venom antigens from snakes of the *Bothrops* and *Lachesis* genera**. *Toxicon* 31, 591, 1993.

HOLFORD, T. R. J.; DAVIS, F.; HIGSON, S. P. J. **Recent trends in antibody based sensors**. *Biosensors and bioelectronics*, v. 34, p. 12-24, 2012.

Inorganic Crystal Structure Database (ICSD). Arquivos cristalográficos no formato CIF (Crystallographic Information Framework). Disponível em: <<http://www.fiz-karlsruhe.de/icsd.html>>. Acesso em 20 abr. 2016

IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry. **Electrochemical Biosensors: recommended definitions and classification**. Technical report. *Pure Appl. Chem.*, vol. 71, n. 12, p. 2333-2348, 1999.

KOROTKAYA, E. V. **Biosensors: design, classification, and applications in the food industry**. *Foods and Raw Materials*, vol. 2, n. 2, 2014.

KOYUN, A.; AHLATCIOĞLU, E.; İPEK, Y. K. **Biosensors and Their Principles, A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones**. Prof. Sadik Kara (Ed.), ISBN: 978-953-51-0609-8, InTech, 2012.

KRESS-ROGERS, E. **Handbook of biosensors and electronics – noises, medicine, food and the environment**. Boca Raton: CRC Press Inc, 1997.

LANDIM, V. P. A. **Desenvolvimento de imunossensor eletroquímico empregando nanohíbrido Pirrol – nanotubos de haloisita para detecção da troponina T cardíaca humana**. Dissertação de Mestrado. Recife, 2014.

LASIA, A. **Electrochemical Impedance Spectroscopy and its applications**. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, vol. 32, p.143-248, New York, 1999.

LI, J.; SAILOR, M. J. **Synthesis and characterization of a stable, label-free optical biosensor from TiO₂-coated porous silicon**. Biosensors and Bioelectronics, v. 55, p. 372-378. 2014.

MACDONALD, J. R.; JOHNSON, W. B. **Fundamentals of Impedance Spectroscopy**. In: Impedance Spectroscopy – Theory, Experiment and Applications, ed. 2, 2005.

MAYFORTH, R. D. **Designing Antibodies**. Academic Press Inc., California, 1993.

MENON, J. C.; JOSEPH, J. K.; JOSE, M. P.; DHANANJAYA, B. L.; OOMMEN, O. V. **Clinical Profile and Laboratory Parameters in 1051 Victims of Snakebite from a Single Centre in Kerala, South India**. Journal of the Association of Physicians of India, v. 64, 2016.

MOINA, C.; YBARRA, G. **Fundamentals and Applications of Imunossensors, Advances in Immunoassay Tecnology**. Dr. Norman H. L. Chiu (Ed.), ISBN: 978-953-51-0440-7, InTech, 2012.

MUTHUCHAMY, N.; LEE, K-P.; GOPALAN, A-I. **Enhanced Photoelectrochemical Biosensing Performances for Graphene (2D) –Titanium Dioxide Nanowire (1D) Heterojunction Polymer Conductive Nanosponges**. Biosensors and bioelectronics, v.89 (1), p. 390-399. 2017.

NASCIMENTO, H. P. O. **Biossensor impedanciométrico baseado em compósitos híbridos de nanopartículas de ouro-polianilina para detecção de sorotipo da Dengue em concentração de picomolar**. Dissertação de Mestrado. Recife, 2011.

NEWNHAM, R.E., FANG, J. H.; SANTORO, R.P. Acta Crystallographica, 17, 240. 1964.

NOGUEIRA, R.M.B; SAKATE, M. **Acidentes crotálicos em animais domésticos**. Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária, 31:47-56, 2004.

NUNZIANTE, P.; PISTOIA, G. **Factors affecting the growth of thick polyaniline films by the cyclic voltammetry technique**. Electrochim. Acta, 34, pg. 223–228, 1989.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. **Voltametrias: uma breve revisão sobre os conceitos**. Rev. Virtual Quím., 5 (4), p. 516-537. 2013.

PICÓ, Y. **Análise química de alimentos**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

PIMENTA, M. G. R.; FURTADO, R. F.; HENEINE, L. G. D.; DIAS, R. S.; BORGES, M. F.; ALVES, C. R. **Development of an amperometric immunosensor for detection of staphylococcal enterotoxin type A in cheese.** Journal of Microbiological Methods, v.91, p. 138-143, 2012.

PINTO, E. P., RAMOS, G. Q., FILHO, H. D. F. **O Microscópio de Força Atômica (AFM): importante ferramenta no estudo da morfologia de superfícies na escala nanométrica.** Estação Científica, UNIFAP, Macapá, v. 3, n.2, p. 41-50, jul-dez. 2013.

PRESNOVA, G.; PRESNOV, D.; KRUPENIN, V.; GRIGORENKO, V.; TRIFONOV, A.; ANDREEVA, I.; IGNATENKO, O.; EGOROV, A.; RUBTSOVA, M. **Biosensor based on a silicon nanowire field-effect transistor functionalized by gold nanoparticles for the highly sensitive determination of prostate specific antigen.** Biosensors and Bioelectronics, v. 88, p. 283-289. 2017.

RETH, M. **Matching cellular dimensions with molecular sizes.** Nature immunology, v. 14, n. 8. 2013.

REZAEI, B., HAVAKESHIAN, E., ENSAFI, A. A. **Stainless steel modified with an aminosilane layer and gold nanoparticles as a novel disposable substrate for impedimetric immunosensors.** Biosensors and Bioelectronics 48, 61-66, 2013.

REZAEI, B.; SHAMS-GHAHFAROKHI, L.; HAVAKESHIAN, E.; ENSAFI, A. A. **An electrochemical biosensor based on nanoporous stainless steel modified by gold and palladium nanoparticles for simultaneous determination of levodopa and uric acid.** Talanta, v. 158, p. 42-50. 2016.

SABER, R.; SARKAR, S.; GILL, P.; NAZARI, B.; FARIDANI, F. **High resolution imaging of IgG and IgM molecules by scanning tunneling microscopy in air condition**. Scientia Iranica, v.18 (6), p. 1643-1646. 2011.

SAI, V. V. R.; MAHAJAN, S.; CONTRACTOR, A. Q.; MUKHERJI, S. **Immobilization of antibodies on polyaniline films and its application in a piezoelectric immunosensor**. Anal. Chem., 78, p.8368-8373. 2006.

SALGADO, A. M. **Desenvolvimento e aplicação de sensores e sistemas de monitoração de biomassa, etanol e de substrato por modelo**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

SANTORO, P. A. **Uma análise de espectros de impedância utilizando o modelo de Poisson-Nernst-Planck com difusão anômala**. Dissertação de Mestrado, Maringá, 2014.

SANTOS, G. S. **Desenvolvimento de biossensor impedimétrico para detecção de Schistosoma mansoni baseado em nanocompósito de óxido de ferro e ouro**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

SILVA, J. G. **Estudo dos efeitos do veneno de Crotalus durissus terrificus sobre o metabolismo e estresse oxidativo em fígado de ratos**. Dissertação de Mestrado. Paraná, 2009.

SILVA, A. M.; BERNARDE, P. S.; ABREU, L. C. **Acidentes com animais peçonhentos no Brasil por sexo e idade**. Revista Brasileira de Crescimento e Desenvolvimento Humano, vol. 25, n.1, São Paulo, 2015.

SILVA, L. M. **Introdução a análise de sistemas eletroquímicos no domínio da frequência**. Ministério da Educação. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2013.

SONG, E.; CHOI, J-W. **Conducting polyaniline nanowire and its applications in chemiresistive sensing**. *Nanomaterials*, 3, p. 498-523; doi:10.3390/nano3030498, 2013.

SOUSA, M. A. M.; **Modelos de circuitos equivalentes para explicar espectros de impedância de dispositivos de efeito de campo**. Dissertação de Mestrado. São Carlos, 2013.

Stanford Research System. **Operation and Service Manual QCM 200 Quartz Crystal Microbalance Digital Controller and QCM 25 5MHz Crystal Oscillator**. California: Stanford Research System, Inc. 2004.

SUAIFAN, G. A. R. Y.; ALHOGAIL, S.; ZOUROB, M. **Rapid and low-cost biosensor for the detection of Staphylococcus aureus**. *Biosensors and Bioelectronics*, v.90, p. 230-237. 2017.

SYAHIR, A.; USUI, K.; TOMIZAKI, K.; KAJIKAWA, K.; MIHARA, H. **Label and label-free detection techniques for protein microarrays**. *Microarrays*, 4, p. 228-244. 2015.

TAEI, M.; SALAVATI, H.; HASANPOUR, F.; SHAFIEI, A. **Biosensor based on ds-DNA-decorated Fe₂O₃/SnO₂-chitosan modified multiwalled carbon nanotubes for biodetection of doxorubicin**. *IEEE Sensors J.*, vol. 16, no. 1, pp. 24-31, Jan. 2016.

THEAKSTON, R.D.G.; LAING, G. D. **Diagnosis of Snakebite and the Importance of Immunological Tests in Venom Research.** *Toxins*, 6, 1667-1695, 2014.

THEAKSTON, R.D.G.; LLOYD-JONES, M. J.; REID, H.A. **Micro-ELISA for detecting and assaying snake venom-antibody.** *The Lancet*, v.310, issue 8039, p. 639-641, 1977.

TUN-PE; BA-AYE; AYE-AYE-MYINT; TIN-NU-SWE; WARREL, D.A. **Bites by Russell's vipers (*Daboia russelii siamensis*) in Myanmar: effect of the snake's length and recent feeding on Veneno antigenaemia and severity of enVenenoing.** *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*; 85: 804-8, 1991.

UCHIYAMA, M. K.; ARAKI, K.; COLLI, W.; ALVES, M. J. M. **Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro conjugadas com anticorpos, visando aplicação em diagnóstico de doenças.** In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindoia, São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://sec.s bq.org.br/cdrom/33ra/resumos/T0582-1.pdf>>. Acesso em 12 jan. 2017.

UETA, R. R. **A Espectroscopia de Impedância Eletroquímica aplicada ao estudo da interface platina/lectina.** Tese de Doutorado, Pernambuco, 2002.

VDM Metals. **VDM® Crofer 22 APU.** Material Data Sheet n. 4046, 2010. Disponível em: <http://www.vdm-metals.com/fileadmin/user_upload/Downloads/Data_Sheets/Data_Sheet_VDM_Crofer_22_APU.pdf>. Acesso em 10 dez. 2016.

VITORETI, A. B. F. **Desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico para identificação de toxinas de serpentes.** Dissertação de Mestrado, São Carlos, 2014.

WILLIAMS, D. *et al.* **The global snake bite initiative: an antidote for snake bite.** The Lancet, Vol. 375, p. 89 – 91, 2010.

WOLYNEC, S. **Técnicas Eletroquímicas em Corrosão.** São Paulo, Brasil, 2002.

WHO. World Health Organization. **Guidelines for the management of snake-bites.** India, 2010.

WHO. Snake AntiVeneno Immunoglobulins. Disponível em:
<http://www.who.int/bloodproducts/snake_antiVenenos/en/>. Acesso em 30 nov. 2015.

ZHANG, W.; BAS, A. D.; GHALI, E.; CHOI, Y. **Passive behavior of gold in sulfuric acid medium.** Trans. Nonferrous Met. Soc. China 25, p. 2037-2046. 2015.

ZHAO X.; LIN C. W.; WANG J.; OH D. H. **Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens.** J. Microbiol. Biotechn. 24, 297–312, 2014.