

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PROPESP  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ

MARIA ONEIDE SILVA DE MORAES

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE IMUNOSSENSOR  
ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE CÂNCER DE TIREOIDE DIFERENCIADO

MANAUS

2019

MARIA ONEIDE SILVA DE MORAES

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE IMUNOSSENSOR  
ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE CÂNCER DE TIREOIDE DIFERENCIADO

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção de Título de Doutora em Química, com área de concentração: Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Walter Ricardo Brito

MANAUS

2019

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M827d Moraes, Maria Oneide Silva de  
Desenvolvimento e caracterização de imunossensor  
eletroquímico para detecção de câncer tireoide diferenciado / Maria  
Oneide Silva de Moraes. 2019  
114 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Prof. Dr. Walter Ricardo Brito  
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do  
Amazonas.

1. Imunossensor eletroquímico. 2. Nanocompósito polimérico. 3.  
Tireoglobulina. 4. Anticorpos anti-Tireoglobulina. 5. Sistema  
estreptavidina-biotina. I. Brito, Prof. Dr. Walter Ricardo II.  
Universidade Federal do Amazonas III. Título

MARIA ONEIDE SILVA DE MORAES

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE IMUNOSSENSOR  
ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE CÂNCER DE TIREOIDE DIFERENCIADO

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção de Título de Doutora em Química, com área de concentração: Inorgânica.

Aprovado em 13 de novembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. WALTER RICARDO BRITO  
Presidente/Orientador

Prof. Dr. Walter Ricardo Brito, Presidente  
Departamento de Química, Universidade Federal do Amazonas



Profa. Dra. MARIA LUIZA ROCCO

Profa. Dra. Maria Luiza Miranda Rocco, Membro Externo  
Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro



Prof. Dr. EMERSON DA COSTA RIOS

Prof. Dr. Emerson da Costa Rios, Membro Interno  
Departamento de Química, Universidade Federal do Amazonas



Profa. Dra. DEBORAH LAREDO JEZINI

Profa. Dra. Deborah Laredo Jezini, Membro Externo  
Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Amazonas



Prof. Dr. HENRIQUE DUARTE DA FONSECA FILHO

Prof. Dr. Henrique Duarte da Fonseca Filho, Membro Externo  
Departamento de Física, Universidade Federal do Amazonas

*Dedico esta tese*

*À minha mãe Maria Raimunda Pinheiro e ao meu pai João de Deus Moraes.*

*Ao meu irmão e amigo João de Deus Moraes Segundo por me apoiar em todos os momentos.*

*E a todos que possuem o meu sorriso.*

## AGRADECIMENTOS

Uma frase? – *Thank u, next.*

Foi um grande desafio! Assim como esta tese que teve seu processo de iniciar, transformar, crescer e evoluir, assim foi na jornada da vida. Foi incrível experienciar o doutorado, onde tudo pode acontecer (e aconteceu)!.. e a jornada continua...

Agradeço ao Todo por Sua infinita amorosidade.

Aos planos superiores pelas orientações e força invisível.

Ao Prof. Dr. Roberto Castilho por ser um grande mestre da vida, aceitou me orientar no mestrado, me inseriu no mundo da espectroscopia onde conheci pessoas incríveis como o Prof. Dr. Gerardo Gerson (IQ-UFRJ), e na linha TGM do LNLS-Campinas/SP, fui apresentada ao Prof. Dr. Walter Ricardo Brito que tornou-se meu orientador no doutorado.

Gostaria de agradecer a ele, meu orientador e amigo Prof. Dr. Walter Ricardo Brito pelo convite em desenvolver este e outros trabalhos pioneiros no Estado do Amazonas. Ele é um grande referencial, sempre se empenhou em contribuir com a realização deste trabalho e com crescimento do grupo. Agradeço pelos conselhos, pelas conversas, pelo café, pela orientação e investimento no trabalho, principalmente pela paciência, confiança e apoio. Também, por toda a infraestrutura conquistada e construída. Sou grata por fazer parte desta história.

Ao meu querido irmão e amigo Prof. Dr. Joao de Deus Moraes Segundo por sempre me apoiar e acreditar na minha capacidade de superação, sempre me inspirou com suas atitudes de coragem diante da vida. Sua colaboração e orientação foram fundamentais para o desenvolvimento e conclusão desta tese.

À minha irmã Jecima Moraes pelo apoio, companheirismo e prestatividade.

Às minhas irmãs, Felicidade Fernandes, Rebeca Pinheiro e Lídia Pinheiro e aos meus irmãos, João de Deus Moraes Filho, Wester Fernandes e Vando Ribeiro. E aos meus familiares pela história e inspiração! É nossa essa conquista!

À empresa Laboratórios Reunidos – Manaus/AM por ter cedido as amostras de anticorpos e estreptavidina. Foi uma contribuição importantíssima para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos Akira e ao Prof. Dr. Joao de Deus Moraes Segundo pela contribuição significativa com o fornecimento do material de PVDF.

Ao Prof. Dr. Adolfo Mota (Bionorte/UFAM) por ter cedido as amostras de DNA, BSA e glicina, além de proporcionar a caracterização química por FTIR.

Aos Lucas Castanhola e Jackeline Veras pela aquisição de imagens no MEV no LTMOE/INPA.

Ao Prof. Dr. Henrique Duarte pelas medidas e imagens no AFM do Laboratório OPTIMA/UFAM.

Ao Prof. Dr. Joao de Deus Moraes Segundo por ter realizado tantos feitos nas dependências da Química, como montagem do sistema de eletrofição, do sistema de medida de ângulo de contato, implementação da metodologia de medida de energia livre superficial e pelo suporte na tão sonhada aquisição de espectros de XPS.

Às alunas de PIBIC que realizaram contribuições significativas: Daniela Mota, Anne Sthela, Luana Vasconcelos, Jessica Oliveira e Quelren Benacon. Agradeço a dedicação e a amizade.

Agradeço a todos os alunos e colegas que fazem parte ou fizeram do grupo e-Bio e do Laboratório de Bioeletrônica e Eletroanalítica – LABEL/CA/UFAM. À Ariamna, Luciana, Yonny, Kelvin, David, Guilherme, Ronald, Jessica, Gylcles, Letícia, Claudionor e Brenda.

Em especial e pelos bons momentos vividos: Prof. Dr. Igor Medeiros e aos futuros Mestres, Taísa Sampaio, Moises Amâncio, Camila, Eng. Tainah Vasconcelos e ao amado Prof. Dr. João de Deus Moraes Segundo.

Agradeço ao grupo do LPQI: Robson Dantas, Vanuza, Victoria, Marcus pelos momentos de descontração e lanches. E também, ao grupo de LAEQ: Ingrity, Rochelle, Lilian, Marcos, André, Leonard. E também, à Deborah e a Sara da Microbiologia.

Gostaria de agradecer as minhas amigas e amigos da Sokka Gakai Internacional. E em especial e com muito carinho ao Grupo Asas da Kotekitai. Minha eterna gratidão por toda boa sorte. #NMRK

A minha sobrinha querida e esperada, Lídia Yasmim.

À Sarah Sophia, minha ancora preciosa.

E a todos que diretamente e indiretamente participaram desta jornada homérica: à Heloísa, à Eliane e à Natalie.

E por fim, à Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade em me graduar em Química, por obter o título de Mestre em Química e agora por alcançar o título de Doutora em Química. E à Capes pela bolsa concedida.

*Por trás de mim estão todos os meus ancestrais me dando força.*

*A vida passou através deles até chegar a mim.*

*E em sua honra a viverei plenamente.*

*Bert Hellinger*

*Um passo de coragem define a vitória.*

*Um passo firme desbrava a justiça.*

*Um passo destemido decide a história.*

*Daisaku Ikeda*

*Tudo que vai, volta. Não é filosofia, é física.*

*Hélio Couto*

*O que está em cima é como o que está embaixo,*

*e o que está embaixo é como o que está em cima.*

*O Caibalion*

SILVA-MORAES, M. O. Desenvolvimento e Caracterização de Imunossensor Eletroquímico para Detecção de Câncer de Tireoide Diferenciado. 2019. 114f. Tese (Doutorado de Química) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2019.

## RESUMO

Os imunossensores eletroquímicos aplicados na área biomédica são dispositivos construídos baseados em métodos de alta sensibilidade e precisão, requisitos fundamentais para o monitoramento de biomarcadores em pacientes em tratamento de câncer diferenciado de tireoide. Os nanocompósitos poliméricos são alternativas promissoras para a produção de biossensores devido as propriedades únicas. Neste trabalho, desenvolveu-se um imunossensor eletroquímico e caracterizou o uso de nanocompósitos poliméricos como plataforma para imobilização de anticorpos anti-tireoglobulina biotinizados (anti-Tg) para detecção de tireoglobulina (Tg). Primeiramente, usou-se três matrizes poliméricas para produção dos nanocompósitos, como acetato de celulose, EuDragit-100<sup>®</sup> e fluoreto de poli(vinilideno) (PVDF) contendo nanopartículas de TiO<sub>2</sub>. O nanocompósito a base de PVDF apresentou melhor perfil eletroquímico, então foram preparados mais três nanocompósitos utilizando PVDF contendo nanotubos de TiO<sub>2</sub>, óxido de grafeno e nanopartículas de ouro, respectivamente. Foi realizado um estudo eletroquímico preliminar relacionado à imobilização de estruturas de DNA e albumina sérica (BSA - *bovine serum albumin*) sobre eletrodos semicondutores de TiO<sub>2</sub>/ITO/vidro a fim de avaliar a imobilização destas estruturas biológicas sobre TiO<sub>2</sub>, empregando técnicas eletroquímicas e espectroscópicas de fotoemissão (XPS). Para a plataforma de imobilização dos anti-Tg biotinizado, foi incorporado na matriz polimérica micropartículas de óxido de ferro revestidas com estreptavidina (MPs) para a formação do sistema estreptavidina-biotina. Os filmes nanocompósitos foram obtidos por *spin coating*, *electrospinning* e *casting*, empregando quatro eletrodos: eletrodo de ITO, eletrodo de ouro, eletrodo de carbono vítreo e eletrodo de ouro *screen-print* (C220 AT, Dropsens<sup>®</sup>). Os nanocompósitos poliméricos foram caracterizados por técnicas eletroquímicas, FTIR, MEV, mapeamento elementar, XPS, energia livre superficial e ângulo de contato. Os parâmetros de concentração das soluções poliméricas, massa de nanopartículas incorporada e a imobilização dos anticorpos anti-Tg sobre os eletrodos modificados foram caracterizados por voltametria cíclica. Foram realizados ensaios de incubação e de interferência, assim como, também, foram otimizados volume de deposição de anti-Tg, de Tg, do tempo de incubação utilizando voltametria de onda quadrada. Foram construídas curvas de analíticas dos filmes de PVDF-NP TiO<sub>2</sub>-MP, PVDF-NT TiO<sub>2</sub>-MP, PVDF-OxG-MP e PVDF-NP Au-MP relacionando a supressão do sinal de  $i_{oxi}$  da sonda redox em função da concentração de Tg. Valores de R<sup>2</sup>, limite de detecção, limite de quantificação e fator de recuperação foram obtidos e comparados com valores de referência da Roche<sup>®</sup>. O sistema estreptavidina-biotina atribuiu aos imunossensores eletroquímicos obtidos uma ótima sensibilidade, especificidade, estabilidade e reprodutibilidade. Os imunossensores propostos foram capazes de determinar a Tg no nível ultrasensível, alcançando valores comparáveis ao LD de 0,04 ng/mL obtida pela Roche<sup>®</sup>. Os imunossensores apresentaram um grande potencial para monitorar os níveis de Tg em pacientes submetidos a tireoidectomia total e ablação de iodo radioativo para rastreamento de metástase de CDT.

**Palavras chaves:** Imunossensores eletroquímicos. Nanocompósitos poliméricos. Tireoglobulina. Anticorpos anti-Tireoglobulina. Sistema estreptavidina-biotina.

## ABSTRACT

Electrochemical immunosensors applied in the biomedical field are devices built based on high sensitivity and precision methods, fundamental requirements for monitoring biomarkers in patients undergoing treatment for differentiated thyroid cancer. Polymeric nanocomposites are promising alternatives for biosensor production due to their unique properties. In this work, an electrochemical immunosensor was developed and characterized the use of polymeric nanocomposites as a platform for the immobilization of biotinylated anti-thyroglobulin (anti-Tg) antibodies for the detection of thyroglobulin (Tg). First, three polymeric matrices were used to produce nanocomposites, such as cellulose acetate, EuDragit-100<sup>®</sup> and poly(vinylidene) fluoride (PVDF) containing TiO<sub>2</sub> nanoparticles. The PVDF-based nanocomposite presented better electrochemical profile, so three more nanocomposites were prepared using PVDF containing TiO<sub>2</sub> nanotubes, graphene oxide and gold nanoparticles, respectively. A preliminary electrochemical study was performed related to the immobilization of DNA and serum albumin (BSA) structures on TiO<sub>2</sub>/ITO/glass semiconductor electrodes in order to evaluate the immobilization of these biological structures on TiO<sub>2</sub>, using electrochemical and spectroscopic techniques photoemission (XPS). For the biotinylated anti-Tg immobilization platform, streptavidin-coated iron oxide microparticles (MPs) were incorporated into the polymer matrix for the formation of the streptavidin-biotin system. Nanocomposite films were obtained by spin coating, electrospinning, and casting, employing four electrodes: ITO electrode, gold electrode, glassy carbon electrode, and screen-print gold electrode (C220 AT, Dropsens<sup>®</sup>). The polymeric nanocomposites were characterized by electrochemical techniques, FTIR, SEM, elemental mapping, XPS, surface free energy, and contact angle. The concentration parameters of the polymeric solutions incorporated nanoparticle mass and the immobilization of anti-Tg antibodies on the modified electrodes were characterized by cyclic voltammetry. Incubation and interference assays were performed, as well as optimized anti-Tg, Tg deposition time, and incubation time using square wave voltammetry. Analytical curves were constructed from PVDF-NP TiO<sub>2</sub>-MP, PVDF-NT TiO<sub>2</sub>-MP, PVDF-OxG-MP, and PVDF-NP Au-MP films relating the suppression of the redox probe ioxi signal as a function of Tg concentration. R<sup>2</sup> values, detection limit, quantitation limit, and recovery factor were obtained and compared with Roche<sup>®</sup> reference values. The streptavidin-biotin system attributed to the obtained electrochemical immunosensors optimum sensitivity, specificity, stability, and reproducibility. The streptavidin-biotin system attributed to the obtained electrochemical immunosensors optimum sensitivity, specificity, stability, and reproducibility. The proposed immunosensors were able to determine Tg at the ultrasensitive level, reaching values comparable to the LD of 0.04 ng/mL obtained by Roche<sup>®</sup>. Immunosensors have great potential to monitor Tg levels in patients undergoing total thyroidectomy and radioactive iodine ablation to screen for CDT metastasis.

**Keywords:** Electrochemical immunosensor. Polymer nanocomposite. Thyroglobulin, Anti-thyroglobulin antibodies. Streptavidin-biotin system.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2-1. Componentes gerais de um imunossensor eletroquímico. Fonte: Adaptado de CHO, I. H. et al., 2018. ....	32
Figura 2-2. Representação esquemática da estrutura de um anticorpo. Fragmento Fab: zona de ligação ao antígeno, domínio variável de cadeia leve (VL), domínio variável de cadeia pesada (VH), domínio constante de cadeia leve (CL), primeiro domínio constante de cadeia de pesada (CH1). Fragmento Fc: segundo e terceiro domínios constante da cadeia pesada (CH2 e CH3). Fonte (GOPINATH et al., 2014). ....	34
Figura 2-3. Ilustração esquemática dos tipos de procedimentos de imobilização: a) adsorção, (b) ligação covalente, (c) encapsulação e (d) ligação covalente cruzada. Fonte: (MARTINS, M., 2006). ....	36
Figura 2-4. Representação das conformações da cadeia polimérica de PVDF para as fases $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ . Fonte: MARTINS, P., 2014. ....	40
Figura 2-5. Ilustração sobre voltametria cíclica: (a) potencial vs tempo, (b) voltamograma cíclico de processo redox de um sistema reversível, (c) quase reversível e (d) irreversível. Fonte: (WANG, 2006). ....	42
Figura 2-6. Potencial aplicado em função do tempo na VOQ, $a$ é a amplitude, $\Delta E_s$ é a altura do degrau e $t$ é o período de pulso. Adaptação de CHEN, 2013. ....	44
Figura 2-7. Voltamogramas esquemáticos de VOQ. 1) processo redox de um sistema reversível e 2) de um sistema irreversível. Fonte: (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003). ....	45
Figura 2-8. Representação esquemática da aplicação de potencial em VPD, onde $S_1$ e $S_2$ são os pontos onde ocorrem a medição de corrente. Fonte: (PACHECO et al., 2013). ....	46
Figura 4-1. Fluxograma das atividades desenvolvidas neste trabalho. *NCP = Nanocompósitos Poliméricos. ....	48
Figura 4-2. Ilustração esquemática das principais etapas para obtenção dos imunossensores propostos com e sem estreptavidina. Fonte: Autor, 2019. ....	55
Figura 5-1. Voltamogramas cíclicos dos filmes de $TiO_2/ITO$ (linha preta), (a) de proteínas BSA imobilizadas (linha vermelha) sobre $TiO_2/ITO$ e (b) de filmes de DNA-PCR/ $TiO_2/ITO$ (linha vermelha) e de pDNA/ $TiO_2/ITO$ (linha azul). ....	59
Figura 5-2. (a) Espectros de XPS do nível 1s do oxigênio dos filmes de DNA. (b) Esquema de imobilização do DNA sobre filme de $TiO_2/ITO$ e (c) espectros de NEXAFS na borda-L do titânio. Fonte: SILVA-MORAES, 2018. ....	61

- Figura 5-3. Voltamogramas cíclicos dos filmes de Accl/Au, Accl-NT (750 °C)/Au e Accl-OxG-NT (750 °C)/Au em 5,0 mmol/L de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  e 0,05 mol/L de PBS (pH = 7,4) com velocidade de varredura de 0,1 V/s. .... 63
- Figura 5-4. (a) Voltamogramas cíclicos dos filmes Accl-OxG com nanotubos de titanato a 750 °C e 600 °C. (b) Espectros de absorção IV dos nanotubos de titanato a 750 °C e 600 °C. (c) Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura de potencial em 5,0 mmol/L de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  e 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4). *Inset* corrente *versus* quadrado da taxa de velocidade do filme Accl-OxG-NT (750°C)..... 65
- Figura 5-5. Voltamogramas cíclicos dos filmes EuD e EuD-TiO<sub>2</sub> em 5,0 mmol/L de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  e 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) com velocidade de varredura de 0,05 V/s. *Inset*, voltamogramas cíclicos de filmes de EuDragit obtidos em diferentes valores de rotação por minuto (rpm)..... 67
- Figura 5-6. Voltamogramas cíclicos de membranas de PVDF e PVDF-TiO<sub>2</sub> obtidos em (a) 10s, (b) 20s, e (c) 30s de deposição por *electrospinning* em 5,0 mmol/L de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  e 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) com velocidade de varredura de 0,01 V/s..... 69
- Figura 5-7. Voltamogramas cíclicos dos filmes de PVDF em concentrações de (a) 1%, (b) 3% e (c) 5% (m/m) obtidos em 2500, 3000, 3500 e 4000 rpm em 5,0 mmol/L de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  e 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) com velocidade de varredura de 0,05 V/s. Filmes de (d) PVDF/ITO em diferentes concentrações de PVDF obtidos em 3000 rpm. No *inset*, gráfico com retas das correntes anódica e catódica em 3000 rpm..... 70
- Figura 5-8. Voltamogramas cíclicos do processo de modificação e de imobilização de anti-Tg. Filmes de (a) PVDF-NP TiO<sub>2</sub>, de (b) PVDF-NT TiO<sub>2</sub>, de (c) PVDF-OxG e de (d) PVDF-NP Au em 5,0 mmol/L de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  e 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) com velocidade de varredura de 0,05 V/s. No lado direito, imagens de MEV correspondente aos NCP. .... 72
- Figura 5-9. Estudo de variação de velocidade de varredura do PVDF-NP TiO<sub>2</sub>/ITO/vidro (a) e do PVDF-NP Au/ITO/vidro (b) obtidos em 5,0 mmol/L de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  e 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) com velocidade de varredura de 0,05 V/s. *Inset*, curva de regressão linear  $i_{\text{oxi}} \times v^{1/2}$ . Ao lado direito, imagens de MEV dos nanocompósitos correspondentes. .... 76
- Figura 5-10. Imagens topográficas de AFM obtidas em 15x15 μm e em 5x5 μm 2D e em 3D para (a) PVDF, (b) PVDF-NP-TiO<sub>2</sub>, (c) PVDF-NT-TiO<sub>2</sub>, (d) PVDF-NP-Au. .... 78
- Figura 5-11. Teste de imobilização de anti-Tg empregando o eletrodo modificado ITO/PVDF-NP Au/anti-Tg/Tg em 5,0 mmol/L de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  e 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) com velocidade de varredura de 0,05 V/s. .... 81

Figura 5-12. Teste de imobilização de anti-Tg empregando o eletrodo modificado ITO/PVDF-NP Au/MP/anti-Tg/Tg em 5,0 mmol/L de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ e 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) com velocidade de varredura de 0,05 V/s. ....	82
Figura 5-13. Voltamogramas cíclicos dos filmes de PVDF em diferentes concentrações (m/m%). <i>Inset</i> : diagrama de Nyquist dos filmes de PVDF 0,2%, 0,5%, 1,0% em 5,0 mmol/L de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ e 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) com velocidade de varredura de 0,05 V/s. ....	83
Figura 5-14. Teste de imobilização de anti-Tg empregando o eletrodo modificado Au/PVDF-NP Au-MP/anti-Tg/Tg em 5,0 mmol/L de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ e 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) com velocidade de varredura de 0,05 V/s. ....	84
Figura 5-15. Espectros de FTIR dos filmes de PVDF, PVDF-NP $\text{TiO}_2$ , PVDF-NT $\text{TiO}_2$ , PVDF-OxG e PVDF-NP Au. ....	85
Figura 5-16. Imagem de MEV das micropartículas de óxido de ferro revestidas com estreptavidina (MPs). ....	86
Figura 5-17. Mapeamento elementar por dispersão de raio-X para micropartícula de óxido de ferro revestido com estreptavidina (MPs). ....	87
Figura 5-18. Imagens de MEV dos filmes (a) PVDF-NP $\text{TiO}_2$ -MP, (b) PVDF-NT $\text{TiO}_2$ -MP, (c) PVDF-OxG-MP e (d) PVDF-NP Au-MP. ....	88
Figura 5-19. Espectros de XPS do C1s para os filmes de PVDF, PVDF-NP $\text{TiO}_2$ -MP e PVDF-NP Au-MP. ....	90
Figura 5-20. Espectros de XPS do F1s para os filmes de PVDF, PVDF-NP $\text{TiO}_2$ e PVDF-NP Au-MP. ....	91
Figura 5-21. Gráfico dos valores de ângulos de contato dos filmes de PVDF, NCP, NCP-MP e NCP-MP-Ab/Tg sobre eletrodo de ouro. ....	92
Figura 5-22. Gráfico das componentes polar e dispersiva da tensão superficial sólido dos eletrodos de PVDF, PVDF-NP- $\text{TiO}_2$ , PVDF-NT- $\text{TiO}_2$ e PVDF-NP-Au com e sem MPs. ....	94
Figura 5-23. Otimização do (a) volume de deposição de anti-Tg, do (b) volume de deposição de Tg e do (c) tempo de incubação de Tg em 5,0 mmol/L de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ e 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) com velocidade de varredura de 0,05 V/s. ....	95
Figura 5-24. Estudo de interferência de compostos em relação à resposta do imunossensor, compostos testados: glicina (100 ng/mL + 1 ppb de Tg), glicose (100 ng/mL + 1 ppb de Tg) e BSA (100 ng/mL + 1 ppb de Tg) em 10 mmol/L de PBS em 5,0 mmol/L de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ e 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) com velocidade de varredura de 0,05 V/s. ....	96

Figura 5-25. Respostas eletroquímicas obtidas por VPD e VOQ na detecção de Tg usando eletrodo de ouro modificados com os filmes de (a) PVDF-NP TiO<sub>2</sub>-MP/anti-Tg, (b) PVDF-NT TiO<sub>2</sub>-MP/anti-Tg, (c) PVDF-OxG-MP/anti-Tg e (d) PVDF-NP Au-MP/anti-Tg em 5,0 mmol/L de [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> e 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) com velocidade de varredura de 0,05 V/s. No lado direito, imagens de MEV correspondente aos filmes NCP-MP. *Inset*, curvas de calibração com barras de desvio-padrão e R<sup>2</sup>..... 100

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2-1. Classificação simplificada dos tumores da tireoide. ....	22
Tabela 2-2. Critérios de reversibilidade em processos eletroquímicos. ....	43
Tabela 5-1. Valores de correntes, de potenciais anódico e catódico e de valores percentuais de corrente anódico referentes aos nanocompósitos poliméricos depositados sobre ITO. ....	73
Tabela 5-2. Valores de rugosidade média ( $R_a$ ) e correntes anódicas ( $i_a$ ) para PVDF-NP-TiO <sub>2</sub> , PVDF-NT-TiO <sub>2</sub> e PVDF-NP-Au. ....	80
Tabela 5-3. Valores de ângulo de contato dos filmes de NCP, NCP-MP e NCP-MP-Ab/Tg sobre eletrodo de ouro. ....	93
Tabela 5-4. Respostas eletroquímicas dos imunossensores eletroquímicos obtidas para parâmetros de limite de detecção, limite quantificação e fatores recuperação para 1 ppb (ng/mL) de Tg por voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada referentes aos filmes NCP-MP. ....	97

## LISTA DE ABREVIACÃO E SIGLAS

Acel	Acetato de celulose
anti-Tg	anti-Tireoglobulina
BSA	Albumina de soro bovino ( <i>bovine serum albumin</i> )
DMF	Dimetilformamida
ITO	Óxido de Índio dopado Estanho ( <i>Indium Tin Oxide</i> )
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
MPs	Micropartículas revestidas com estreptavidina
NCP	Nanocompósitos poliméricos
NP-Au	Nanopartícula de ouro
NP-TiO <sub>2</sub>	Nanopartícula de TiO <sub>2</sub>
NT-TiO <sub>2</sub>	Nanotubos de TiO <sub>2</sub>
OxG	Óxido do grafeno
PBS	Tampão fosfato salino – <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction
pDNA	DNA plasmídeo
PVDF	Fluoreto de poli(vinilideno) – <i>Polyvinylidene fluoride</i>
Tg	Tireoglobulina
TSH	Hormônio Tireoestimulante – <i>Thyroid-stimulating hormone</i>
VC	Voltametria cíclica
VOQ	Voltametria de onda quadrada
VPD	Voltametria de pulso diferencial

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	22
<b>2.1. Câncer diferenciado de tireoide</b> .....	22
2.1.1. Considerações gerais .....	22
2.1.2. Diagnóstico .....	24
2.1.3. Tratamento .....	25
<b>2.2. Tireoglobulina</b> .....	29
<b>2.3. Imunossensores eletroquímicos</b> .....	32
<b>2.4. Técnicas de imobilização</b> .....	36
<b>2.5. Nanocompósito polimérico</b> .....	38
2.5.1. Fluoreto de Poli(vinilideno) .....	39
<b>2.6. Técnicas eletroquímicas</b> .....	41
2.6.1. Voltametria cíclica .....	41
2.6.2. Voltametria de onda quadrada .....	43
2.6.3. Voltametria de pulso diferencial .....	45
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	47
<b>3.1. Geral</b> .....	47
<b>3.2. Específicos</b> .....	47
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	48
<b>4.1. Imobilização de biomoléculas sobre filmes de TiO<sub>2</sub></b> .....	48
<b>4.2. Síntese de filmes nanocompósitos poliméricos</b> .....	50
4.2.1. Limpeza dos eletrodos de trabalho .....	50
4.2.2. Filmes de nanocompósito de acetato de celulose .....	51
4.2.3. Filmes de nanocompósito de EuDragit 100 .....	52
4.2.4. Filmes e membranas nanocompósito de PVDF .....	53
<b>4.3. Imobilização dos anticorpos anti-Tg biotilado sobre filmes NCP com e sem estreptavidina (MPs)</b> .....	54
<b>4.4. Estudo de reconhecimento molecular da Tireoglobulina</b> .....	55
<b>4.5. Caracterizações dos filmes poliméricos</b> .....	56
4.5.1. Voltametria cíclica .....	56
4.5.2. Espectroscopia de fotoabsorção no infravermelho .....	56

4.5.3.	Espectroscopia de fotoelétrons de raios-X .....	56
4.5.4.	Microscopia eletrônica de varredura .....	57
4.5.5.	Microscopia de força atômica.....	57
4.5.6.	Medidas de ângulo de contato .....	57
4.5.7.	Medidas de Energia Livre Superficial .....	58
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
5.1.	Estudo de imobilização de biomoléculas em filmes TiO <sub>2</sub> .....	59
5.2.	Estudos da obtenção de nanocompósitos poliméricos com NP TiO <sub>2</sub> .....	62
5.3.	Caracterização dos nanocompósitos de PVDF e imobilização de anti-Tg.....	71
5.4.	Caracterização e validação dos imunossensores para Tireoglobulina.....	80
<b>6.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>103</b>
<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>106</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>107</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A ocorrência de nódulos na glândula da tireoide pode ser muito comum e relacionadas a presença de doenças como bócio colóide, bócio adenomatoso, tireoidite crônica linfocitária, carcinoma papilífero e carcinoma folicular. Um nódulo de tireoide é uma massa de tecido tireoidiano que cresceu ou um cisto com material fluídico. A ocorrência de nódulos é muito comum e sua probabilidade de ocorrência aumenta com a idade. Embora os sintomas não sejam perceptíveis quando pequeno, em tamanho maior pode causar dor, rouquidão e dificuldade em ingerir alimentos. A maior preocupação é que alguns nódulos podem ser cancerígenos, entretanto, cerca de 90% dos nódulos da tireoide são benignos (não cancerosos) (MAIA et al., 2007; ROSÁRIO, P. W. et al., 2013).

O diagnóstico conclusivo de câncer de tireoide só pode ser realizado por uma biópsia, que é o procedimento no qual uma amostra do tecido é removida para análise por um técnico experiente. Na biópsia aspirativa por agulha fina usa-se uma agulha fina para recolher amostras de fluido do nódulo, este teste é considerado muito preciso na identificação de nódulos malignos. A ultrassonografia pode ser usada para guiar a agulha fina durante o procedimento de punção da tireoide (CAMARGO; TOMIMORI, 2007; CERATTI et al., 2012).

A cintilografia da tireoide é um exame de diagnóstico por imagem, trata-se de um método não-invasivo usado para avaliar a presença de nódulos de tireoide e investigar causas de hipertireoidismo, hipotireoidismo ou inflamações da tireoide. Em pacientes portadores de câncer diferenciado de tireoide (CDT), o exame de cintilografia de corpo inteiro, conhecido como pesquisa por corpo inteiro (PCI) é frequentemente usado para o rastreamento de metástases e recidivas funcionantes, geralmente após de efetuada a tireoidectomia total e, às vezes, antes e/ou depois de dose terapêutica com iodo radioativo (CARDOSO, 2013). Neste caso, a dosagem de Tg plasmática passar a ser um biomarcador importante da presença de metástase ou recidivas de CDT. O valor da dosagem de Tg plasmática para detectar metáteses

e recidivas no acompanhamento de pacientes submetidos à tireoidectomia parcial por CDT é controverso. Em geral, considera-se o nível de 10 ng/mL como ponto de corte (*cutoff*) para ocorrência de metástase (BASKIN, 2004; KIM et al., 2009; ZANELLA et al., 2010), mas não há um consenso sobre o nível apropriado (BOI et al., 2006; CUNHA et al., 2007; SNOZEK et al., 2007).

Os equipamentos laboratoriais geralmente utilizam métodos quimioluminescente ou eletroquimioluminescente para a determinação de Tg e anti-Tg nos quais apresentam limites de detecção < 1,0 ng/mL para uma detecção ultrasensível. A detecção de Tg abaixo de 1,0 ng/mL é fundamental para determinar metástases na fase inicial ou recidivas funcionantes (FLORES-REBOLLAR et al., 2018). A determinação de anti-Tg é feita juntamente com a dosagem de Tg sérica devido à interferência que o mesmo causa na dosagem de Tg em pacientes após a ablação da tireoide em casos de CDT.

O interesse no desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos para aplicação na área biomédica tem aumentado muito nos últimos anos. A imobilização dos anticorpos sobre a superfície do eletrodo através da interação molecular específica do sistema estreptavidina-biotina tem se mostrado uma abordagem eficaz e confiável. A estreptavidina é uma proteína tetramérica, com subunidades equivalentes que podem liga-se a uma molécula de biotina. O sistema estreptavidina-biotina pode ser utilizado para orientar o anticorpo durante o processo de imobilização, em que o anticorpo pode interagir livremente com o antígeno (HU; DOU; ZHAO, 2014).

Os imunossensores eletroquímicos podem apresentar limites de detecção abaixo de 1 ng/mL e tornam-se uma alternativa na detecção de Tg, como uma ferramenta analítica, capaz de determinar os processos eletroquímicos envolvidos na interação anti-Tg e Tg, oferecendo rapidez na aquisição dos resultados somada a uma alta especificidade na detecção da mesma.

Assim, evitando que o paciente espere um longo tempo para receber o tratamento médico adequado à sua condição.

Os imunossensores eletroquímicos são dispositivos compostos por um eletrodo de referência, destacam-se, devido a sua alta sensibilidade, especificidade e resposta rápida na detecção quantitativa de anticorpos ou antígenos específicos, relacionados a várias doenças, assim, podendo ser empregados como dispositivos portáteis (*point-of-care testing*) que realizam análises rápidas em qualquer lugar, tornando-se uma ferramenta útil no diagnóstico de certas doença em lugares de difícil acesso devido às suas vantagens em relação às técnicas e equipamentos de alto custo e análises que demandam um tempo dispendioso (BUENO; DE ARAUJO; PAIXÃO, 2017; CHO et al., 2018; WEN et al., 2017).

Os materiais nanocompósitos poliméricos têm sido largamente aplicados como suportes na imobilização de DNA, enzimas, anticorpos e proteínas no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos (LIM; AHMED, 2016; MEHROTRA, 2016). Por esse motivo, a proposta deste projeto é o desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos empregando materiais nanocompósitos poliméricos à base de fluoreto de polivinilideno (PVDF) e nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ , nanotubos de  $\text{TiO}_2$  óxido de grafeno e nanopartículas de ouro para imobilização de anti-Tg. As nanoestruturas de  $\text{TiO}_2$  e de ouro podem aumentar a área superficial e, ao mesmo tempo, conferir propriedades elétricas ao nanocompósito polimérico. A determinação de Tg no sangue do paciente pode agilizar a tomada de decisão do médico, auxiliando-o na prescrição do melhor tratamento para o paciente em tratamento de CDT.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Câncer diferenciado de tireoide

#### 2.1.1. Considerações gerais

O câncer da tireoide é o mais recorrente da região da cabeça e pescoço atingindo três vezes mais mulheres do que homens. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer, 9.610 mil novos casos de câncer de tireoide são estimados em todo o Brasil, 16,3 % para o sexo masculino e 83,6 % para o sexo feminino referente ao biênio 2018-2019. É o quinto tumor mais frequente em mulheres nas regiões Sudeste e Nordeste (sem considerar o câncer de pele não-melanoma) (INCA, 2017).

A cidade de São Paulo apresenta a maior incidência de câncer de tireoide no Brasil, com taxa para o sexo feminino de 10,9 e, para o sexo masculino de 0,7 (referente a 100.000 habitantes) (MICHELS, 2013). No estado do Amazonas e na cidade de Manaus, foram estimados a 0,70 e 0,58 para o sexo masculino e de 4,17 e 3,41 para o sexo feminino, respectivamente (valores em relação a 100 mil habitantes). As informações e estatísticas citadas encontram-se no Relatório Anual do Instituto do Câncer (INCA, 2017).

Os tumores da tireoide são geralmente classificados de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde em epiteliais, não-epiteliais, miscelâneas, metástases de outros tumores e lesões pseudo-tumorais, podendo ser benignos e malignos (Tabela 2-1) (KAKUDO et al., 2018).

Tabela 2-1. Classificação simplificada dos tumores da tireoide.

<b>Benignos</b>	<b>Malignos</b>
Bócio endêmico	Carcinoma folicular
Bócio esporádico	Carcinoma papilífero
Adenoma folicular	Carcinoma medular
Outros	Carcinoma indiferenciado
	Outros

Fonte: (KAKUDO et al., 2018)

O câncer de tireoide apresenta-se geralmente como um nódulo na região cervical, porém, menos de 5% dos nódulos de tireoide são cânceres e a maior dificuldade do médico é afastar uma neoplasia em um nódulo, uma vez que as lesões benignas são a grande maioria das lesões nodulares da tireoide (95%). O câncer de tireoide é considerado raro em relação aos outros casos de câncer, representando de 1 % a 5 % do total de câncer tanto em mulheres quanto em homens (INCA, 2017; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018).

Nas últimas décadas, a incidência do câncer de tireoide vem aumentando em todo o mundo, sendo considerado o tumor mais comum dentre os tumores endócrinos. Recentemente, um aumento no diagnóstico de pequenos tumores assintomáticos (menores que 1 cm) tem sido observado (MORRIS et al., 2013). Em decorrência do uso disseminado da ultrassografia foi observado um aumento na ocorrência e na detecção das CDT que permitiu identificar e puncionar nódulos a partir de 2 mm (OLALEYE et al., 2011). Alguns estudos relataram uma correlação entre o aumento da incidência de câncer de tireoide e aumento no consumo de iodo na dieta alimentar e, também o consumo de peixe e frutos do mar elevam o risco de ocorrência para o tipo folicular desse câncer (MICHELS, 2013).

A presença da mutação BRAF (o gene da RAF quinase do tipo B) representam as alterações genéticas mais comuns do câncer de tireoide e tem sido identificada em um número cada vez maior de carcinomas papilíferos. Alguns estudos apontam uma correlação entre a mutação BRAF e o estadiamento avançado, metástases linfonodos, metáteses linfonodais à distância e recorrência do CDT (BERTELLI et al., 2013; GAO et al., 2018).

Com base em características microscópicas, os tipos morfológicos mais comuns de câncer de tireoide são os carcinomas papilares (cerca de 50 % a 80 %), seguido dos carcinomas foliculares (de 10 % a 40 %) e dos carcinomas medulares (de 5 % a 15 %). Os carcinomas diferenciados são os tipos mais frequentes. Existem ainda os carcinomas pouco diferenciados (cerca de 10% dos casos) e os indiferenciados (carcinomas anaplásicos, também cerca de 10 %)

(INCA, 2017). Essa diferenciação na qual é classificado o carcinoma se refere à comparação da célula alterada em relação à célula normal, ou seja, as mutações que ocorrem ao se proliferarem tornam a célula menos parecida com a célula original, portanto mais indiferenciada e, mais agressiva. O grau de diferenciação da célula maligna depende de quanto ela é semelhante ou diferente da célula do tecido normal. Um carcinoma bem diferenciado é um tumor que ainda apresenta algumas características de célula normal (grau histológico 1), mas com comportamento de tumor maligno, à medida que as células do tumor vão ficando mais distintas das normais, o grau pode se tornar 2 (moderadamente diferenciado) ou 3 (pouco diferenciado ou indiferenciado). A agressividade do carcinoma aumenta conforme o grau histológico. Essa divisão morfológica encontra-se respaldada em estudos moleculares, que mostra ou envolve diferentes grupos de genes para cada um dos quatro grupos de carcinoma (CARVALHO, 2018; VOLPI; FRIGUGLIETTI; AURÉLIO, 2010).

Os nódulos da tireoide são detectados clinicamente entre 4% a 7% da população geral, e quando a ultrassografia é empregada, a ocorrência aumenta para 30% a 50% (CAMARGO; TOMIMORI, 2007). Dentre todos os nódulos tireoidianos, aproximadamente 95% são benignos. Em relação à frequência de tumores malignos, 90% são carcinomas papilíferos, 10 a 15% são carcinomas foliculares, 5 a 10% são carcinomas medulares e menos que 5% são carcinomas indiferenciados (anaplásicos) (INCA, 2017; MORRIS et al., 2013; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018).

### 2.1.2. Diagnóstico

Atualmente, a disponibilidade e o acesso fácil a exames de ultrassonografia cervical resultaram em uma maior detecção de nódulos tireoidianos, correspondendo prevalência de 30-50%. O aumento na identificação de nódulos tireoidianos resultou na necessidade de estabelecer melhores ferramentas diagnósticas. A maioria dos nódulos tireoidianos é benigna, somente de 1 a 5% decorrem dos carcinomas de tireoide (MAIA et al., 2007).

Há algumas décadas, o diagnóstico do carcinoma de tireoide sendo feito a partir da punção aspirativa com agulha fina (PAAF) de nódulos acima de 1,0 cm ou de nódulos menores com características ultrassonográficas suspeitas (BRASIL, 2014; MURUSSI et al., 2001; SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA METABOLOGIA, 2006). Entretanto, o diagnóstico a partir dos resultados da ultrassonografia e da PAAF dependem da experiência do operador (CERATTI et al., 2012). Alguns estudos tem proposto a análise molecular, pré ou pós-operatória, com base no diagnóstico citológico da mutação do gene BRAF (V600E) presente em até 40 % em casos de carcinoma papilífero em que sua presença está associada a tumores mais agressivos e multifocais (BERTELLI et al., 2013).

### 2.1.3. Tratamento

As opções terapêuticas para cada tipo e estágio do câncer de tireoide dependerá do tipo e estágio da doença além do estado de saúde geral do paciente. Em geral, o tratamento do câncer de tireoide possui como diretriz a realização de procedimento cirúrgico que consiste em realizar a tireoidectomia total ou parcial dependendo do tipo e da gravidade da doença (BRASIL, 2014; CARDOSO, 2013; SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA METABOLOGIA, 2006).

Para os carcinomas papilífero e folicular, os tumores grandes (maiores que 4 cm) com comprometimento linfonodal ou metástases à distância, é recomendada tireoidectomia total com ressecção ampla e retirada dos linfonodos adjacentes acometidos pelo tumor (CARDOSO, 2013). Já os tumores menores que 4 cm, sem metástases à distância ou linfonodos comprometidos, podem ser tratados inicialmente com tireoidectomia total ou parcial, também chamada de lobectomia, na qual apenas um lado (lobo) da glândula é removido (PARK, S. et al., 2018; ROCHA et al., 2018). Alguns médicos recomendam a dissecação dos gânglios linfáticos adjacentes à tireoide no mesmo procedimento cirúrgico, mesmo que os linfonodos não estejam aumentados. Embora esse procedimento não tenha mostrado que aumenta a

sobrevida, pode diminuir o risco de uma recidiva da doença (SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA METABOLOGIA, 2006). A retirada da tireoide junto com os linfonodos permite a análise da amostra para determinar com precisão o estadiamento da doença. Para lesões pequenas, menores que 1 cm, sem evidência de metástases ou invasão local, é realizada somente o acompanhamento médico com exames de imagem periódicos em vigilância ativa com dosagem de Tg (BANDEIRA et al., 2017; CARVALHO, 2018).

No pós-operatório, o tratamento depende do estágio da doença. Os pacientes que realizaram tireoidectomia são submetidos à supressão hormonal que consiste na reposição hormonal tireoidiano com uma dose um pouco superior à necessária, com a finalidade de diminuir a produção do hormônio tireoestimulante (TSH) na hipófise. O TSH é um hormônio associado ao estímulo do crescimento do CDT, portanto a hormonioterapia tem como objetivo deixar os níveis de TSH em um valor inferior ao nível normal (ROCHA et al., 2018; URKEN et al., 2015).

Caso a iodoterapia seja recomendada, o início da hormonioterapia poderá ser adiado até o final do tratamento (INCA, 2002). Para tumores avançados ou que se disseminaram para os gânglios linfáticos ou outros órgãos é frequentemente administrada a radioiodoterapia. O objetivo é destruir o tecido de tireoide remanescente e tratar qualquer tipo de câncer que permanece no corpo. As áreas de disseminação distantes que não respondem a iodoterapia podem ser tratadas com radioterapia externa, terapia alvo ou quimioterapia de forma paliativa (BANDEIRA et al., 2017; COBURN; TEATES; WANEBO, 1994).

A iodoterapia é um tratamento utilizado para a ablação de qualquer tecido de tireoide remanescente da cirurgia ou para tratar o câncer de tireoide que se disseminou para os gânglios linfáticos ou outros órgãos. É mais eficaz em pacientes com níveis altos de hormônio TSH no sangue com pouco ou nenhum efeito colateral para o corpo. Este hormônio estimula a absorção do iodo radioativo <sup>131</sup>I (I-131) no tecido da tireoide e, também, nas células cancerosas. Se a

tireoide foi removida, uma maneira de elevar os níveis de TSH é não administrar hormônios ou administrar de forma injetável do análogo de TSH. O tratamento com iodo radioativo é recomendado após a tireoidectomia para cânceres em estágio inicial (BANDEIRA et al., 2017; COBURN; TEATES; WANEBO, 1994; INCA, 2002).

A iodoterapia é amplamente indicada para pacientes com câncer de tireoide do tipo papilífero ou folicular (MACIEL, 1998; MAIA et al., 2007). Mas, não é utilizada para tratar carcinomas anaplásicos e medulares da tireoide, uma vez que estes tipos de câncer não captam iodo (VALENTE; CAPELA-COSTA, 2017). O CDT (papilares ou foliculares) são altamente tratáveis e com maiores taxas de cura. Agora, os carcinomas medulares ou anaplásicos são poucos comuns, porém mais agressivos, pois apresentam metástase precoce (KUSHCHAYEVA et al., 2014; VALENTE; CAPELA-COSTA, 2017).

Geralmente, os CDT têm um prognóstico muito bom com estimativa de 80 – 90% de sobrevida a longo prazo. Apesar do excelente prognóstico, até 35% dos pacientes ainda sofrem com a recorrência da doença ao longo de 40 anos de acompanhamento (HOLLENBEAK et al., 2013).

Antigamente, como a vigilância para detectar o CDT persistente ou recorrente não incluía ensaios sensíveis de Tg sérica ou ultrassonografia do pescoço por técnicos experientes. Haviam muitos pacientes que pareciam curados pela tireoidectomia total com ou sem dissecação de linfonodos e terapia de ablação com iodo radioativo 131 (I-131) no tecido remanescente, porém anos depois era observado a doença recorrente aumentando muito a probabilidade de morte por CDT (HAN et al., 2018; SAPIENZA, 2018; URKEN et al., 2015).

Atualmente, é feita a dosagem sérica de Tg e do anticorpo anti-Tg após a tireoidectomia total e imediatamente antes da ablação com I-131, com o TSH > 30 mUI/l. O comparativo dos valores de Tg dosada pode mostrar uma correlação direta com a presença de metástases, além

de ser considerada um fator prognóstico importante e preditora da evolução em médio prazo (MACIEL, 2002). Porém, uma série de variáveis podem ainda interferir na determinação precisa de Tg durante o monitoramento do câncer de tireoide (MACIEL, 2002).

- i) A sensibilidade do teste de Tg deve ser de pelo menos 1 ng/mL (1 ppb = 1 parte por bilhão). Existe uma série de métodos disponíveis comercialmente com sensibilidade inadequada que limita a detecção de pequenas massas de tecido tireoidiano, especialmente quando o TSH está suprimido;
- ii) A ausência de um padrão internacional causa uma grande variabilidade nos resultados entre os diferentes métodos disponíveis comercialmente;
- iii) Possibilidade de efeito "gancho", especialmente, em ensaios imunométricos, causando a obtenção de valores inapropriadamente baixos de Tg em pacientes com concentrações séricas muito elevadas de Tg;
- iv) Presença de anti-Tg no soro do paciente pode gerar um falso-positivo, onde os resultados nos ensaios imunométricos indicam falsamente valores baixos de Tg.

Avaliando a taxa e o impacto da recorrência do câncer de tireoide, a mortalidade se torna mais desafiadora, pelo fato de que a recorrência e a mortalidade são riscos concorrentes, apesar da detecção da doença recorrente ter melhorado nos últimos anos. Coburn e colaboradores sugeriram que 50 a 60 % dos pacientes que desenvolveram câncer de tireoide recorrentes após tratamento, eventualmente acabam morrendo da doença em relação aqueles sem recorrência (COBURN; TEATES; WANEBO, 1994). Além disso, as implicações para doenças recorrentes podem ser muito diferentes na população idosa do que nos pacientes mais jovens (HOLLENBEAK et al., 2013). Pacientes idosos tem maior risco devido a outras condições de saúde às quais podem contribuir para a recorrência de CDT, diminuindo a sobrevivência ao câncer de tireoide recorrente (BANDEIRA et al., 2017; ROSÁRIO, P. W. et al., 2013).

## 2.2. Tireoglobulina

A Tg é uma glicoproteína de estrutura extremamente complexa, com cerca de 5000 aminoácidos e peso molecular de 660 kDa, podendo ser formada por duas unidades idênticas ou, ainda, podendo se apresentar em forma heterogênea, devido a um processamento alternativo de seu RNA (DI JESO; ARVAN, 2016; MALTHIÉRY, Yves et al., 1989).

A proteína Tg é sintetizada somente pelas células da tireoide, responsável por produzir e armazenar hormônios tireoidianos, a triiodotironina (T3) e a tetraiodotironina (T4), onde a presença de iodo é indispensável (DI JESO; ARVAN, 2016). A proteína Tg tem de 110 a 120 resíduos de tirosina, sendo que cada um possui um sítio potencial de iodinação, podendo assim agir na função de armazenamento de iodeto no organismo apesar do iodo ser um elemento raro em moléculas orgânicas, este encontra-se presente em cerca de 0,2% a 1% na proteína Tg (MALTHIÉRY, Y.; LISSITZKY, 1987).

A medida dos níveis de Tg sérica não é recomendada para definição da natureza benigna ou maligna do nódulo tireoidiano, ou seja, o nível de Tg no sangue não pode ser utilizado para diagnosticar o câncer de tireoide, mas pode ser útil após o tratamento cirúrgico (URKEN et al., 2015). A PAAF é o melhor método disponível para distinguir lesões benignas e malignas (CERATTI et al., 2012). O procedimento cirúrgico ainda é a melhor maneira de tratar o CDT do tipo papilífero e folicular, seguida do tratamento com iodo radioativo 131 para destruir quaisquer células remanescentes da tireoide (LEBOULLEUX, 2008). Após este tratamento, ocorre uma diminuição dos níveis de Tg sérica, como a tireoide é a única fonte conhecida de Tg, níveis altos de Tg após o tratamento são indicadores de CDT persistente ou pode ser um sinal de recidiva, ou seja, de CDT recorrente. O CDT mantém a capacidade de secretar a Tg, devido à origem folicular e à manutenção da diferenciação celular, neste caso, a Tg age como

excelente marcador biológico de recidiva ou recorrência de CDT (PACINI; SCHLUMBERGER; DRALLE, 2006).

A Tg é uma glicoproteína produzida pelas células tireoidianas normais e pelas células malignas do CDT, sua concentração sérica corresponde diretamente ao volume tireoidiano, e conseqüentemente às células foliculares remanescentes normais ou cancerígenas após a tireoidectomia parcial. Estudos demonstram uma correlação entre os níveis de Tg, captação de iodo-131 e a massa de tecido tireoidiano remanescente. Assim, 1,0 g de tecido tireoidiano induz uma captação de iodo-131 em torno de 1 - 2 % elevando o nível de Tg sérica em 1 ng/mL (com TSH normal) ou 0,5 ng/mL (com TSH abaixo de 0,1 mU/L) (DIEHL, 2006).

Diante disso, a Tg assume um papel importante como marcador tumoral, pois a detecção pode dar indicativos de recorrência ou persistência do CDT em pacientes que realizaram a tireoidectomia e ablação com iodo radioativo 131. Nesta situação, o exame de Tg é um dos procedimentos de rotina para a monitoração de recorrência de CDT (BRASIL, 2014).

Cerca de 20 a 30% dos pacientes com CDT apresentam anticorpos anti-Tg, que impedem a interpretação direta da concentração de Tg sérica indicando valores falsamente baixos (LUPOLI et al., 2015; SPENCER, Carole A., 2011). A presença dos anticorpos anti-Tg impede a interpretação direta da concentração de Tg sérica, portanto, é recomendado a dosagem concomitante de Tg e de anti-Tg na mesma amostra a ser analisada (BANDEIRA et al., 2017; LEBoulLEUX, 2008).

O anti-Tg é um anticorpo produzido no corpo humano, geralmente em portadores de doenças auto-imunes da tireoide, como a doença de Hashimoto e a de Graves, mas também podendo aparecer em pessoas saudáveis (FEIBELMANN, 2007; GONÇALVES, 2007; JONES; ROITT, 1961; SABOORI et al., 1999). A detecção deste anticorpo é associada a presença de Tg suficiente para causar uma resposta imunológica. Por este fato, o anti-Tg é

utilizado na análise quantitativa dos níveis de Tg, sendo também utilizada como marcador tumoral de portadores de CDT (DIEHL, 2006; ROSÁRIO, P. W. et al., 2013).

Embora a presença do anti-Tg esteja associada aos níveis de Tg, sua presença interfere nas medidas de Tg, podendo gerar resposta falso-negativa. Essa interferência ocorre mesmo em pequenas concentrações do anticorpo, por conseguinte as medidas deste anticorpo devem sempre visar um caráter quantitativo em vez de qualitativo (ROSÁRIO, P. W. et al., 2006; ROSÁRIO, P. W. S. et al., 2004).

O valor dos níveis de Tg medido pode variar dependendo do tipo de ensaio utilizado. Por isso, o resultado laboratorial inclui uma declaração sobre o método utilizado de doseamento de Tg, uma vez que os valores de Tg obtidos de outros ensaios não podem ser comparados diretamente, pois podem ocasionar interpretações médicas errôneas (CLARK; FRANKLYN, 2012; SPENCER, C. A.; LOPRESTI, 2008). Todos os resultados da Tg devem ser interpretados em conjunto com o perfil clínico total do paciente como os sintomas, histórico clínico, dados provenientes de testes adicionais do exame de corpo inteiro, bem como outras informações apropriadas (CLARK; FRANKLYN, 2012).

Além da Tg atuar com biomarcador no seguimento pós-operatório de pacientes com CDT, a Tg pode estar associada a várias doenças da tireoide. Foram encontradas concentrações elevadas de Tg em diferentes doenças da tireoide, como a doença de Hashimoto e de Graves, o adenoma da tireoide e o carcinoma da tireoide. A determinação da Tg pode ainda ajudar na distinção entre a tireoidite sub-aguda e a tireotoxicose factícia. Nos casos de hipotireoidismo congénito, a determinação da Tg pode ser utilizada para fazer a diferenciação entre a ausência total da glândula da tireoide e a hipoplasia da tireoide ou outros estados patológicos (KRONENBERG; MELMED; POLONSKY, 2011; PACINI; PINCHERA, 1999; TORRÉNS; BURCH, 2001).

### 2.3. Imunossensores eletroquímicos

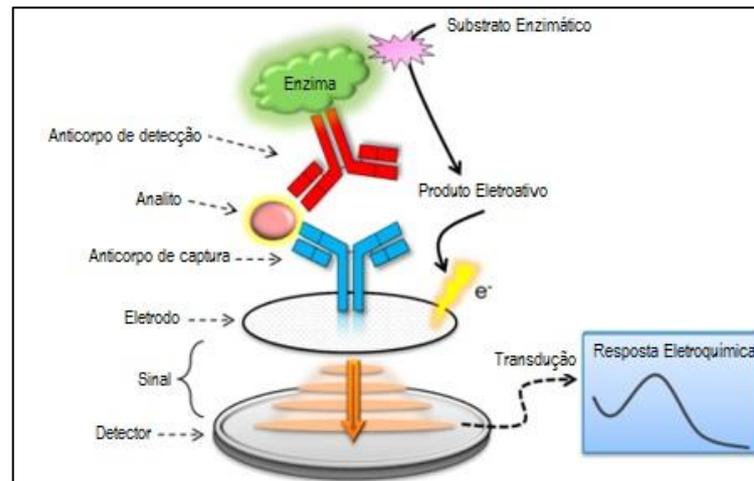


Figura 2-1. Componentes gerais de um imunossensor eletroquímico. Fonte: Adaptado de CHO, I. H. et al., 2018.

Os imunossensores eletroquímicos fazem parte de uma grande classe de biossensores e sendo apresentados como um dispositivo cujo funcionamento encontra-se baseado na interação imunológica antígeno-anticorpo. De forma geral, a montagem de um imunossensor envolve a imobilização de anticorpo captador sobre um eletrodo que irá interagir com um antígeno específico formando uma camada transdutora. Após esta etapa, um segundo anticorpo ligado a uma enzima (anticorpo de detecção) será responsável por gerar um produto eletroativo que estará associado a presença do antígeno específico. O sinal gerado será traduzido em uma resposta eletroquímica associado ao reconhecimento molecular de um antígeno específico como ilustrado na Figura 2-1. Os imunossensores eletroquímicos que relacionam a medida de corrente com a concentração de antígenos são chamados de imunossensores amperométricos (CHO, I. H. et al., 2018).

Os imunossensores eletroquímicos podem ser usados como dispositivos portáteis que realizam análises rápidas, em qualquer lugar (*point-of-care testing*) onde o indivíduo esteja, podendo ser uma ferramenta importante no diagnóstico médico, principalmente em áreas de difícil acesso, onde os recursos e o atendimento à saúde são escassos (GOPINATH et al., 2014).

A seletividade do reconhecimento do analito pelo componente biológico ativo (antígeno ou anticorpo), aliada à sensibilidade do transdutor eletroquímico possibilita a determinação de níveis de concentrações na ordem de  $10^{-12}$  mol/L. Nesse caso, a tecnologia imunológica no qual é baseada na habilidade do anticorpo, forma um complexo com o correspondente antígeno é essencial, pois não somente a sensibilidade deve ser considerada, mas também a especificidade (LIM; AHMED, 2016).

Os anticorpos aplicados no desenvolvimento de biossensores revolucionaram as áreas médicas e terapêuticas. Atualmente, muitas indústrias de alimentos e fármacos, diagnóstico clínico e monitoramento ambiental utilizam sistemas de anticorpos imobilizados como tecnologias analíticas (JUNG; JEONG; CHUNG, 2008).

Os anticorpos são classificados em 5 tipos imunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgE e IgD. As imunoglobulinas G (IgG) são as espécies mais comuns no soro e as mais usadas em aplicações em imunossensores (HOCK, 1997). Como biomoléculas, pertencem à família das glicoproteínas, cuja sua estrutura apresenta duas cadeias pesadas (H) e duas leves (L) ligadas entre si, mediante ligações dissulfídicas (ponte de sulfeto) formando a estrutura tipo Y. A cadeia leve é formada por dois domínios, um deles variável (VL) e o outro constante (CL) e a cadeia pesada (no anticorpo IgG) é composta por uma cadeia de domínio variável (VH) e três de domínios constantes (CH1, CH2 e CH3) (GOPINATH et al., 2014).

A Figura 2-2 mostra um esquema do anticorpo com regiões e zona de reconhecimento de antígenos.

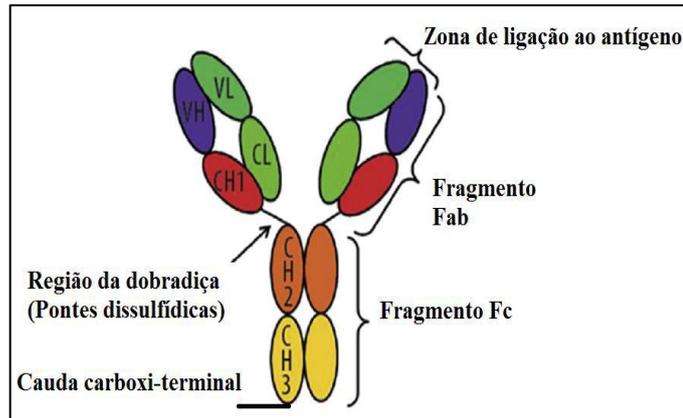


Figura 2-2. Representação esquemática da estrutura de um anticorpo. Fragmento Fab: zona de ligação ao antígeno, domínio variável de cadeia leve (VL), domínio variável de cadeia pesada (VH), domínio constante de cadeia leve (CL), primeiro domínio constante de cadeia de pesada (CH1). Fragmento Fc: segundo e terceiro domínios constante da cadeia pesada (CH2 e CH3). Fonte (GOPINATH et al., 2014).

Os estudos de Makaraviciute e colaboradores mostraram uma dependência entre a quantidade de moléculas de anticorpos imobilizadas e conformação espacial com a sensibilidade do imunossensor (MAKARAVICIUTE; RAMANAVICIENE, 2013). A imobilização de anticorpos pode ser do tipo orientada (etiquetada), assegurando a minimização do impedimento estérico e, conseqüentemente, facilitando a interação antígeno-anticorpo, aumentando a sensibilidade da análise, mas dependendo do processo de imobilização utilizada, pode haver dificuldade de interação com o antígeno (LIM; AHMED, 2016). Os imunossensores se subdividem em duas principais categorias (BORGSMANN et al., 2012):

- i) Imunossensores etiquetados ou marcados: são baseados no uso de anticorpos ligadas a moléculas marcadora (etiqueta) como elemento de reconhecimento. Geralmente, são utilizados em imunossaios do tipo *sandwich* direto e indireto marcando os anticorpos com enzimas, corantes ou marcadores redox.
- ii) Imunossensores livres de etiqueta (*label-free*): são baseados em ensaios, estratégias ou configuração no qual não se utiliza moléculas marcadoras. Usam-se anticorpos imobilizados onde a interação com antígenos é medida diretamente pelas modificações das suas propriedades.

A maioria dos imunossensores do tipo *sandwich* utiliza enzimas, complexo organometálicos, fluoróforos ou pigmentos como marcadores. Nos ensaios são utilizados dois anticorpos diferentes que se ligam a um antígeno específico. O anticorpo que está imobilizado

na superfície do eletrodo liga-se ao antígeno, em seguida, o segundo anticorpo marcado (com uma enzima) liga-se ao antígeno. Depois da formação do complexo antígeno-anticorpo, o produto da reação enzimática é medido eletroquimicamente onde o sinal é diretamente proporcional a concentração do antígeno analisado. Este tipo de ensaio apresenta vantagens como alta especificidade e alta sensibilidade (LIM; AHMED, 2016; WEN et al., 2017).

Nos imunossensores *label-free*, a resposta do imunossensor é obtida diretamente após a formação do complexo antígeno-anticorpo. Neste tipo de ensaio, o bio-reconhecimento do antígeno na superfície do eletrodo pode ser monitorado eletroquimicamente, observando a passivação do eletrodo modificado. Neste ensaio, o sinal medido é inversamente proporcional à concentração do antígeno analisado. Apresenta vantagens quanto a rapidez e simplicidade das etapas de detecção (MIYAZAKI; SHIMIZU; FERREIRA, 2017; POHANKA, 2018; RODRIGUES, 2017).

O imunoensaio quimioluminescente é uma técnica que emprega a quimiluminescência, processo onde a reação química ocorre com liberação de luz quando um elétron transita de um estado excitado para o estado fundamental. Geralmente, esta emissão de radiação é encontrada na região do visível ( $\lambda = 400-800$  nm) e produzida por compostos bioluminescentes. Os imunoensaios baseados em quimioluminescência são métodos analíticos poderosos baseados na alta bio-afinidade da reação antígeno e anticorpo. A alta seletividade em determinar antígenos está associada à especificidade da ligação estereoquímica entre o antígeno e anticorpo que fornece grandes valores de constantes de ligação (CINQUANTA; FONTANA; BIZZARO, 2017; JU; LAI; YAN, 2017a).

Já os ensaios eletroquimioluminescente envolvem a aplicação de  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  (bpy = 2,2'-bipiridina) ou seus derivados como emissor (ou etiqueta) e tripropilamina (TPA) como agente correativo. O sistema  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{TPA}$  exibe a mais alta eficiência na aplicação em imunoensaios e análises de DNA ao empregar espécies ativas como marcadores em moléculas

biológicas. Atualmente, encontram-se dispositivos comerciais que usam imunoenaios baseado em eletroquimioluminêscia e quimioluminêscia para detectar muitos analitos clinicamente relevantes com alta sensibilidade e seletividade. Além disso, a eletroquimiluminescência também tem sido usada para monitorar reações enzimáticas. As técnicas de detecção baseadas em eletroquimioluminêscia apresentam como principais vantagens a alta sensibilidade, alta especificidade (marcador específico), ampla faixa linear (JU; LAI; YAN, 2017b; MANGUSO et al., 2014).

#### 2.4. Técnicas de imobilização

A técnica de imobilização de biomoléculas (enzimas, anticorpos, DNA, etc) é uma etapa crítica na montagem de um biossensor.

Os tipos mais comuns são classificados em: (a) adsorção, (c) ligação covalente, (c) encapsulação e (d) ligação covalente cruzada (*crosslinking*) (SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012), como podem ser observados na Figura 2-3.

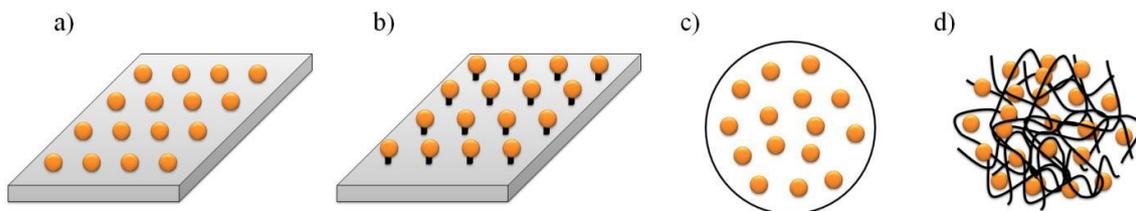


Figura 2-3. Ilustração esquemática dos tipos de procedimentos de imobilização: a) adsorção, (b) ligação covalente, (c) encapsulação e (d) ligação covalente cruzada. Fonte: (MARTINS, M., 2006).

Cada técnica apresenta vantagens e desvantagens, suas características influenciam na resposta do sinal analítico do imunossensor, conseqüentemente, nos parâmetros analíticos como limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e precisão. Além disso, as condições de imobilização podem ser aprimoradas otimizando os parâmetros de temperatura, pH, tampão escolhido e tempo de reação (SHEN; RUSLING; DIXIT, 2017).

a) Adsorção

Técnica simples e rápida no qual as interações entre a biomolécula e o substrato estão baseadas em ligações de hidrogênio e de *Van der Waals* durante um intervalo de tempo pré-estabelecido. A superfície de interesse (substrato) é colocada em contato com uma solução contendo a biomolécula e, depois de lavada com água deionizada ou solução tampão, assim, as moléculas não-adsorvidas ou ligadas fracamente são removidas (WELCH et al., 2017).

b) Ligação covalente

A técnica que emprega a ligação covalente de biomoléculas é a mais comumente aplicada em processos de imobilização na construção de biossensores. Para uma enzima, os grupos funcionais não essenciais à atividade catalítica da enzima se ligam covalentemente a grupos reativos presentes na superfície do substrato (transdutor), por meio de compostos químicos conhecidos como sistema EDC/NHS (OLIVEIRA et al., 2019).

c) Encapsulação

A técnica de encapsulação utiliza géis ou polímeros, como sílica gel, para formar uma matriz tridimensional na qual as biomoléculas são aprisionadas em poros (LIVAGE; CORADIN, 2017). Nessa matriz, grandes quantidades de biomoléculas podem ser aprisionadas, sendo interessante para moléculas de alta massa molar já que o tamanho dos poros e geometria podem ser controlados, além disso, comparada às demais técnicas de imobilização, apresenta uma maior estabilidade química e térmica. Outro ponto importante é que a atividade da enzima não é afetada, pois não ocorrem reações entre a matriz e as enzimas (MOHAMAD et al., 2015).

d) Ligação covalente cruzada

A imobilização por ligação covalente cruzada é baseada na formação de um reticulado das biomoléculas de modo a formar uma rede rígida, portanto, livre de suporte. A rede pode

formar ligações enzima-enzima em uma estrutura tridimensional. A desvantagem do método é a baixa retenção da atividade enzimática e a baixa reprodutibilidade. A fim de aumentar a atividade enzimática e a estabilidade, enzimas cristalizadas e por precipitação estão sendo utilizadas de forma alternativa (SCHROEDER et al., 2019).

## **2.5. Nanocompósito polimérico**

A partir dos avanços de materiais tradicionais e o surgimento de novos materiais, o desenvolvimento de materiais compósitos foi ganhando importância indústria. Os nanocompósitos poliméricos (NCP) são formados pela combinação ou mistura de um polímero e um material de dimensão nanométrica disperso para produzir compósitos de alta performance. A fase dispersa pode ser sílica, argila, zeólito, etc, em que uma das suas dimensões esteja na ordem de grandeza em nanômetros e em quantidades em massa entre o limite de 1 - 10% em peso (SILVA, 2012).

A incorporação de cargas inorgânicas a uma matriz polimérica pode produzir novos materiais com melhores propriedades físicas, que podem ser aplicadas em área tecnológicas em que o polímero puro não seria útil. De maneira geral, estas cargas inorgânicas de dimensões nanométricas ou até milimétricas são capazes de melhorar uma série de propriedades físicas do polímero como: tenacidade, dureza, estabilidade térmica e, podendo até reduzir o custo do produto final (HUSKIĆ; ZIGON, 2007).

A tecnologia de incorporar cargas inorgânicas nanométricas como silicatos lamelares, nanopartículas metálicas, nanotubos de carbono, entre outros à matriz dos polímeros tem recebido uma considerável atenção científica e tecnológica uma vez que estes nanocompósitos poliméricos podem apresentar propriedades diferentes dos materiais de partida como: módulo elástico, resistência a solvente, resistência à radiação ultravioleta, propriedade de barreira a

gases e líquidos, estabilidade dimensional e de resistência a temperatura (BHOLE et al., 2007; XU et al., 2006).

O elevado aumento das propriedades físicas nos nanocompósitos está diretamente relacionado à elevada área superficial por unidade de volume, que possuem estas nanopartículas e em consequência disto, o elevado número de pontos disponíveis para interações que podem ocorrer entre elas e a matriz polimérica. Estas interações interfaciais variam dependendo do tipo de polímero, do tipo de nanopartícula e do método de síntese utilizado (GOETTLER; LEE; THAKKAR, 2007).

A biocompatibilidade, resistência mecânica elevada e alta condutividade elétrica são características favoráveis de muitos nanocompósitos aplicados como transdutores na construção de biossensores. A eficiência do uso de nanocompósitos na transferência direta de elétrons se apresenta na sinergia dos componentes usados na modificação dos eletrodos e diversos nanocompósitos com nanopartículas de ouro, nanotubos de carbono, grafeno, entre outros, além de apresentar propriedades únicas oferece as vantagens que incluem baixo custo, melhoramento das propriedades elétricas, processos reversíveis de dopagem, controle das propriedades químicas/eletroquímicas, eletrodos com cinéticas rápida, biocompatibilidade, estabilidade externa (LIANG; GUO, 2007; SHRIVASTAVA; JADON; JAIN, 2016).

#### 2.5.1. Fluoreto de Poli(vinilideno)

Fluoreto de Poli(vinilideno) (PVDF) é um fluoropolímero termoplástico disponível comercialmente como um material resistente a ácido e halogênios, sendo amplamente utilizado em indústria de papel, processamento químico e processamento de lixo nuclear (MARTINS, P.; LOPES; LANCEROS-MENDEZ, 2014).

O PVDF faz parte de uma classe de polímeros chamado de polímeros eletroativos, também usados como material inteligente juntamente com o Nylon-11, ácido polilático (PLLA)

e poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) (BRYAN et al., 2004; HUANG et al., 2008; NEWMAN et al., 1980). Tais materiais quando sujeito a um campo elétrico sofrem uma alteração no seu tamanho e/ou na sua forma manifestando propriedades piezoelétricas, piroelétricas e ferroelétricas sendo amplamente aplicados em sensores, atuadores e capacitores na área de engenharia e biomédica (CHU et al., 2006).

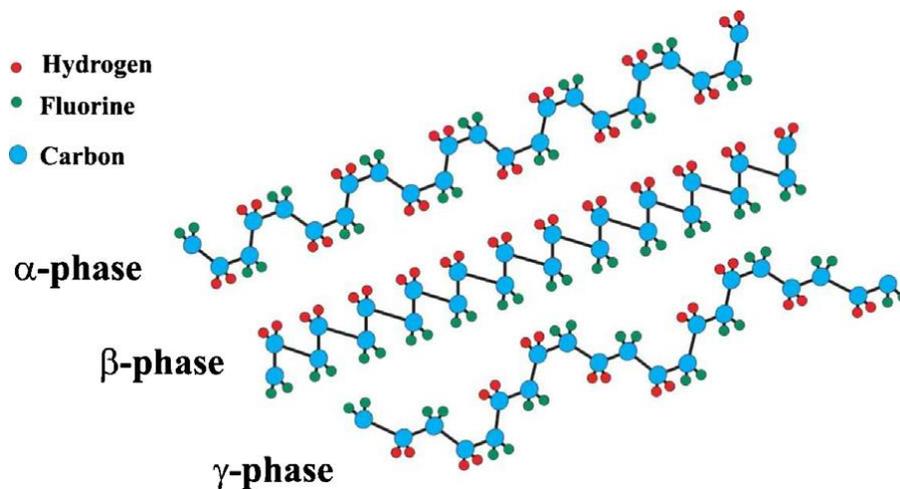


Figura 2-4. Representação das conformações da cadeia polimérica de PVDF para as fases  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Fonte: MARTINS, P., 2014.

O PVDF apresenta uma estrutura complexa com até cinco fases cristalinas distintas em que as fases polares são as fases  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , com os maiores valores de momento dipolar enquanto as fases não-polares são as fases  $\alpha$  e  $\epsilon$ . Na Figura 2-4, são mostradas as fases  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  do PVDF que são as conformações cristalinas mais estudadas e utilizadas. A fase  $\beta$  é a que apresenta maior momento dipolar por célula unitária ( $8 \times 10^{-30}$  C.m) quando comparada com as fases  $\gamma$  e  $\delta$  (KABIR et al., 2017). Uma vez que as fases  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  são mais ativas eletricamente, diferentes estratégias têm sido desenvolvidas para obter as fases eletroativas do PVDF focando principalmente no desenvolvimento de procedimentos específicos de processamento e na inclusão de cargas específicas (MARTINS, P.; LOPES; LANCEROS-MENDEZ, 2014).

## 2.6. Técnicas eletroquímicas

Os avanços tecnológicos têm contribuído com o desenvolvimento das técnicas eletroquímicas, quanto à viabilização da instrumentação eletroquímica, desenvolvimento de *software* de interface com recursos de tratamento de dados e estatística e hifenação com outras técnicas como espectroscopia de infravermelho sendo amplamente empregadas em diversas áreas como corrosão, capacitores, detecção de metais e compostos orgânicos, sensores, entre outros (LOWINSOHN; BERTOTTI, 2006).

### 2.6.1. Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (VC) é a técnica mais comumente usada para adquirir informações qualitativas e quantitativas sobre os processos eletroquímicos por meio de curvas corrente-potencial. A eficiência desta técnica consiste em fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos (BARD; FAULKNER, 2001; BRETT; BRETT, 1993).

A Figura 2-5 (a) mostra o princípio de funcionamento da VC que consiste em aplicar de um potencial inicial ( $E_i$ ) crescente até um potencial final ( $E_f$ ) onde a varredura ocorre no sentido direto, a partir deste, o potencial aplicado é decrescente onde a varredura ocorre no sentido inverso até o potencial inicial (potencial de inversão). O processo repete várias vezes formando uma onda triangular, o número de repetições é chamado de número de ciclos. Desta forma, gerando reações de oxidação e redução na presença de espécies eletroativas na solução ou presentes na superfície do eletrodo (MILAZZO et al., 2001). A Figura 2-5 (b) mostra um voltamograma cíclico (curva potencial vs corrente) correspondente à resposta eletroquímica esperada para um par redox reversível para um ciclo de varredura. Pode-se identificar os seguintes parâmetros eletroquímicos necessários à caracterização do processo eletroquímico

ocorrido: potenciais de pico catódico e anódico ( $E_{pc}$  e  $E_{pa}$ ), correntes de pico catódico e anódico ( $i_{pc}$  e  $i_{pa}$ ) (ALEIXO, 2003; PACHECO et al., 2013).

A Figura 2-5 (c) mostra os processos quase-reversíveis que ocorrem quando a velocidade relativa de transferência de elétrons com respeito ao transporte de massa é insuficiente para manter o equilíbrio das espécies na superfície do eletrodo. Processos quase-reversíveis também possuem um par de picos. Na Figura 2-5 (d), os processos irreversíveis demonstram que a velocidade de transferência de carga é muito lenta quando comparada com a velocidade de varredura, deste modo, as concentrações das espécies oxidadas e reduzidas não serão mais função apenas do potencial (BARD; FAULKNER, 2001; CAI et al., 2010).

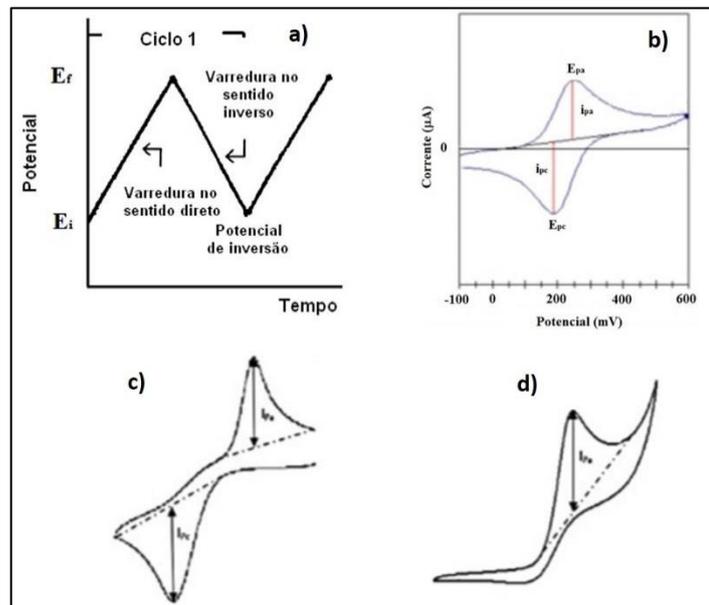


Figura 2-5. Ilustração sobre voltametria cíclica: (a) potencial vs tempo, (b) voltamograma cíclico de processo redox de um sistema reversível, (c) quase reversível e (d) irreversível. Fonte: (WANG, 2006).

O tipo de voltamograma gerado depende do tipo de mecanismo redox que a amostra analisada sofre sobre a superfície do eletrodo. Portanto, a partir dos principais parâmetros extraídos de um voltamograma cíclico pode-se obter informações relacionadas à reversibilidade do sistema em estudo, além da elucidação de mecanismos de reações eletroquímicas, detecção da existência de reações acopladas a processos eletroquímicos, identificação de espécies

presentes em solução e análise semi-quantitativa das velocidades de reação (WANG, 2006). Na Tabela 2-2 são apresentados brevemente os diferentes tipos de processos redox que podem ser identificados e caracterizados em um estudo de voltametria cíclica.

Tabela 2-2. Critérios de reversibilidade em processos eletroquímicos.

Reversível	Quase-reversível	Irreversível
<b>Definição</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• A velocidade da reação de transferência de carga é elevada e a etapa de transferência de massa controla o processo.</li> <li>• Têm equilíbrio dinâmico na interface do eletrodo.</li> <li>• Segue a equação de Nernst.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A corrente é controlada pela transferência de massa e de carga.</li> <li>• A equação de Nernst é aproximadamente satisfeita.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A corrente é controlada somente pela transferência de carga, a qual é lenta.</li> <li>• Não segue a equação de Nernst.</li> </ul>
<b>Parâmetros</b>		
$I_{pa}/I_{pc} = 1$ $I_p \propto v^{1/2}$ $E_p$ é independente de $v$ . $\Delta E_p = 59/n$ (mV)	$I_{pa}/I_{pc} = 1$ ; se $\alpha = 1$ $I_p \propto v$ $E_p$ é dependente de $v$ e se desloca negativamente com aumento de $v$ . $\Delta E_p > 59/n$ (mV)	Ausência de pico reverso $I_p \propto v^{1/2}$ $E_p$ depende de $v$ . $ E_p - E_{p/2}  = (48/n\alpha)^*$

\* $\alpha$  coeficiente de transferência de carga e o  $E_{p/2}$  o valor do potencial que é determinado à metade do valor da corrente de pico ( $I_p$ ). Fonte: (WANG, 2006).

### 2.6.2. Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada (VOQ) é uma das técnicas voltamétricas de pulso que apresenta maior rapidez na análise e maior sensibilidade quando comparada às demais. Os valores de limite de detecção podem ser comparados aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas (MIRCESKI et al., 2013). Além disso, a análise dos parâmetros característicos desta técnica também possibilita a avaliação cinética e mecanística do processo eletródico em estudo (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

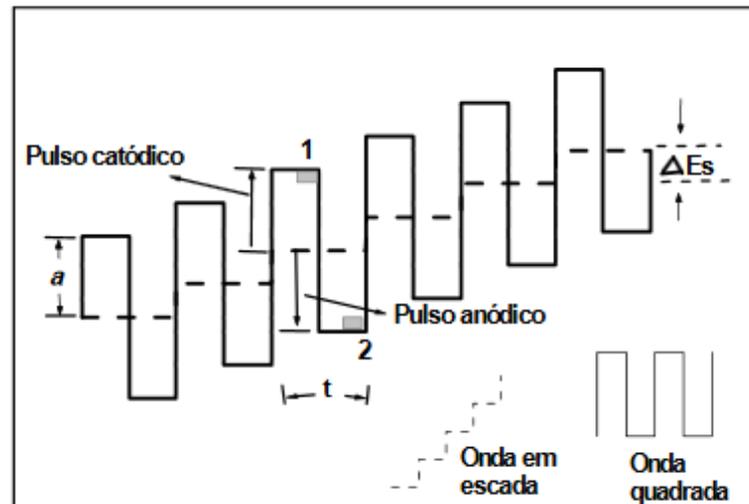


Figura 2-6. Potencial aplicado em função do tempo na VOQ,  $a$  é a amplitude,  $\Delta E_s$  é a altura do degrau e  $t$  é o período de pulso. Adaptação de CHEN, 2013.

A Figura 2-6 mostra uma onda quadrada (linha cheia) aplicada sobre um potencial crescente (linha pontilhada), formando uma escada de potencial onde o pulso direto (pulso catódico) da onda quadrada coincide com o início do degrau da escada. O pulso reverso (pulso anódico) da onda quadrada por sua vez coincide com a metade da etapa da rampa em degrau. As correntes elétricas são medidas ao final dos pulsos direto (1) e reverso (2) da Figura 2-6. A diferença entre os valores de corrente  $i_1 - i_2$  será igual a intensidade da corrente resultante que forma um voltamograma resultante de pico simétrico. Esta técnica apresenta excelente sensibilidade e alta rejeição a correntes capacitivas (CHEN; SHAH, 2013).

A Figura 2-7 apresenta os voltamogramas teóricos associados a: (1) um sistema reversível e (2) um sistema irreversível, com a separação observada das correntes direta, inversa e resultante, sendo que ambos possuem perfis voltamétricos semelhantes aos que eram obtidos na polarografia de onda quadrada (CHEN; SHAH, 2013; SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

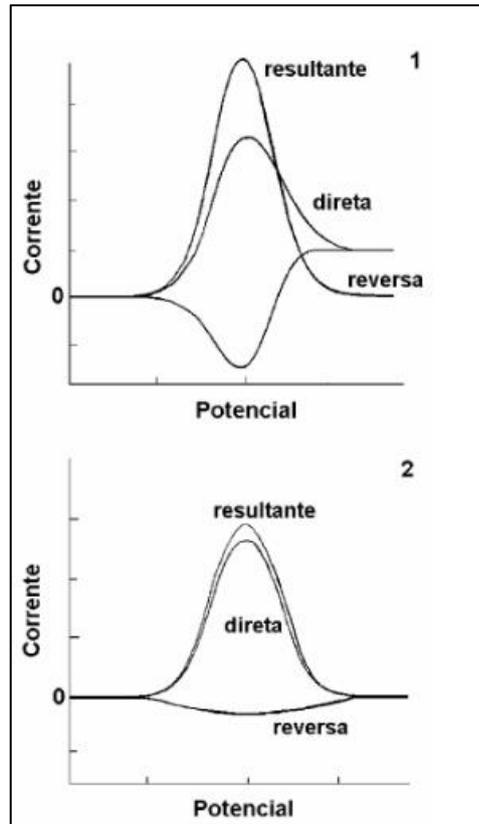


Figura 2-7. Voltamogramas esquemáticos de VOQ. 1) processo redox de um sistema reversível e 2) de um sistema irreversível. Fonte: (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

### 2.6.3. Voltametria de pulso diferencial

A voltametria de pulso diferencial (VPD) ainda é a técnica mais usada para fins analíticos, devido às vantagens apresentadas em relação à alta sensibilidade associada a uma melhor resolução frente às técnicas de pulso. A maior sensibilidade atribuída à técnica de VPD é devido à diminuição da contribuição da corrente capacitiva.

Na amostragem de corrente, a corrente capacitiva recebe zero, uma vez que a corrente capacitiva decai rapidamente em relação à corrente faradaica, assim o sinal analítico é máximo, conseqüentemente, a razão sinal-ruído é máxima. O resultado é uma melhoria significativa na sensibilidade do método voltamétrico (BROWN; ANSON, 1977; SCOTT, K, 2016).

A Figura 2-8 mostra que a corrente é medida duas vezes, uma antes da aplicação do pulso ( $S_1$ ) e outra ao final do pulso (após 50 ms, em  $S_2$ ) quando a corrente capacitiva decai. A diferença da corrente entre a primeira corrente ( $S_1$ ) e a segunda corrente ( $S_2$ ),  $\Delta i = i_{S_1} - i_{S_2}$  é expressa em um voltamograma de pulso diferencial. O voltamograma resultante consiste de picos de corrente de forma gaussiana cuja a intensidade é diretamente proporcional à concentração do analito de interesse (PACHECO et al., 2013; ROMANI et al., 2000; SCOTT, K, 2016).

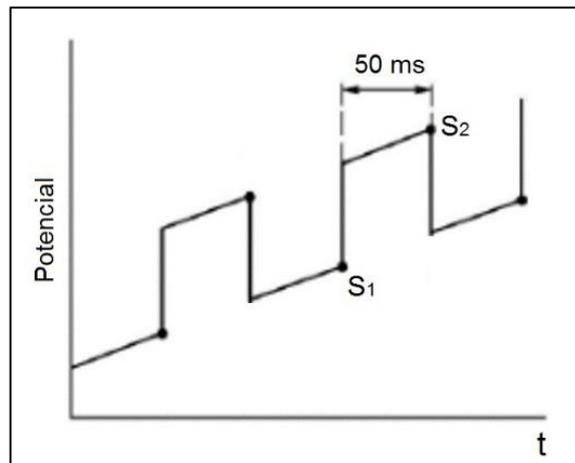


Figura 2-8. Representação esquemática da aplicação de potencial em VPD, onde  $S_1$  e  $S_2$  são os pontos onde ocorrem a medição de corrente. Fonte: (PACHECO et al., 2013).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver e caracterizar um imunossensor eletroquímico baseado em nanocompósito polimérico funcionalizado para imobilização de anti-Tg biotinizado para determinação quantitativa de Tg *in vitro*.

#### 3.2. Específicos

- a) Desenvolver nanocompósitos poliméricos para funcionalização dos eletrodos de ITO, de ouro, de carbono vítreo e de ouro *screen-print* (C220 AT, Dropsens®);
- b) Caracterizar os substratos poliméricos empregando técnicas eletroquímicas (VC e EIE), microscópicas (MEV e mapeamento elementar), superficial (ângulo de contato) e espectroscópicas (FTIR, XPS);
- c) Realizar estudos de otimização do processo de funcionalização dos eletrodos modificados para a imobilização do anticorpo anti-Tg;
- d) Estudar os processos de reconhecimento molecular relacionados com a detecção do antígeno Tg através de técnicas espectroscópicas e eletroquímicas (*in vitro*);
- e) Obter as curvas analíticas e determinar os parâmetros de funcionamento do imunossensor como limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), fator de recuperação dos substratos poliméricos utilizados na detecção de Tg;
- f) Realizar testes de interferência nos imunossensores obtidos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

As atividades, procedimentos e caracterizações realizadas neste trabalho para o desenvolvimento dos imunossensores eletroquímicos para detectar Tg *in vitro* encontram-se na Figura 4-1. A seguir, todas as etapas são descritas.

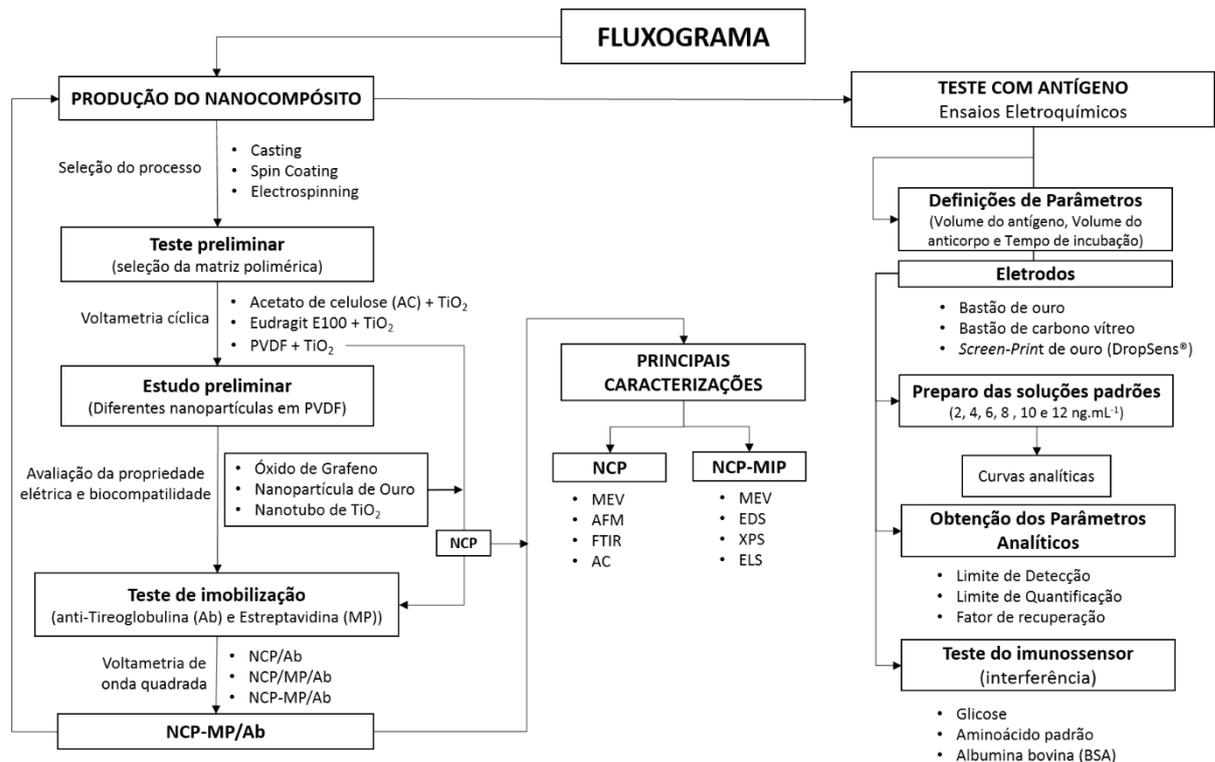


Figura 4-1. Fluxograma das atividades desenvolvidas neste trabalho. \*NCP = Nanocompósitos Poliméricos.

### 4.1. Imobilização de biomoléculas sobre filmes de TiO<sub>2</sub>

A obtenção dos filmes de TiO<sub>2</sub> nanoestruturado foi realizada através do método sol-gel pela adição de 7,6 mL de etanol PA (99,5%, Sigma-Aldrich) e 2,3 mL de isopropóxido de titânio (IV) (97%, Sigma-Aldrich) em um recipiente Becker de 50 mL. Posteriormente, foi adicionado lentamente 15,0 mL de ácido clorídrico (37%, Sigma-Aldrich) à mistura em agitação com barras magnéticas. A mistura foi agitada por 6 h (HABIBI; NASR-ESFAHANI, 2007).

Os filmes de TiO<sub>2</sub> nanoestruturado foram produzidos pela deposição de uma alíquota do sol-gel de TiO<sub>2</sub> sobre os eletrodos ITO/vidro usando o método de *spin coating* em 3000 rpm por 30 s, em seguida, os filmes de TiO<sub>2</sub>/ITO/vidro foram sinterizados em uma mufla a 350 °C por 45 min a uma taxa de 5 °C/min. Medidas de AFM indicaram que a espessura dos filmes são de aproximadamente 15 nm (SILVA-MORAES et al., 2018).

A imobilização das biomoléculas sobre os filmes de TiO<sub>2</sub> foi realizada por incubação onde filmes de TiO<sub>2</sub>/ITO foram submersos em recipientes contendo soluções de ácido desoxirribonucléico (DNA) e albumina bovina (BSA, Sigma-Aldrich) por 18 horas a 5 °C. As soluções usadas foram de 35 µg/mL de DNA plasmídeo (pDNA), de 75 µg/mL de DNA-PCR<sup>1</sup> e de BSA (10%) em 0,1 M de solução tampão de fosfato salino (conhecido como PBS, do inglês Phosphate Buffered Saline), pH = 7.

Resumidamente, a extração do pDNA (pCR™ 2.1-TOPO®, Invitrogen™, Thermo) foi realizada pelo método de lise alcalina (GREEN; SAMBROOK, 2012). A amplificação de 200 pares de bases referente ao DNA-PCR foi obtida copiando um fragmento conhecido de pDNA através do método PCR<sup>1</sup> usando o Kit Taq DNA Polymerase Platinum (Invitrogen™, Thermo Scientific) e primers M13, seguindo as recomendações do fabricante.

Os filmes de pDNA/TiO<sub>2</sub>/ITO/vidro, PCR/TiO<sub>2</sub>/ITO/vidro e BSA/TiO<sub>2</sub>/ITO/vidro foram caracterizados por voltametria cíclica usando uma célula eletroquímica com configuração convencional de três eletrodos empregando um potenciostato (Autolab PGSTAT 302N, Metrohn) equipado com o software GPES 4.9. Foi usado um eletrodo de referência de Ag/AgCl (3 M de KCl) e um contra-eletrodo de fio de platina enrolado.

---

<sup>1</sup> PCR: é uma técnica utilizada para amplificar uma região específica do DNA. Realizada in vitro, a reação em cadeia da polimerase é mais conhecida pela sigla PCR do inglês *polymerase chain reaction* (GARIBYAN; AVASHIA, 2013).

Nos ensaios com as amostras de DNA, os eletrodos de trabalho pDNA/TiO<sub>2</sub>/ITO/vidro, PCR/TiO<sub>2</sub>/ITO/vidro e TiO<sub>2</sub>/ITO/vidro foram imersos em uma solução de 2,0 µmol/L de azul de metileno por 5 minutos, antes das análises por voltametria cíclica. Os ensaios de VC foram realizados em 5 ciclos com janela de potencial de -0,4 até 0,4 V e velocidade de varredura de potencial igual a 0,05 V/s.

Nos ensaios de VC com as amostras de BSA 10%, os eletrodos de trabalhos de BSA/TiO<sub>2</sub>/ITO/vidro e TiO<sub>2</sub>/ITO/vidro foram analisados usando uma solução de 5,0 mmol/L de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] como sonda eletroativa em solução tampão de 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) em uma janela de potencial de -0,3 até 0,7 V, com 5 ciclos e velocidade de varredura de 0,1 V/s.

## 4.2. Síntese de filmes nanocompósitos poliméricos

### 4.2.1. Limpeza dos eletrodos de trabalho

Todos os eletrodos utilizados neste trabalho foram submetidos a um processo de limpeza adequado antes da deposição dos filmes nanocompósitos poliméricos:

- (i) Os eletrodos de bastão de ouro e carbono vítreo foram limpos com lixas p4000, tecido de polimento sem o uso de alumina conforme recomendação do fornecedor e lavados com álcool isopropílico e água destilada. Em seguida, foram submetidos a uma limpeza eletroquímica empregando a técnica de voltametria cíclica usando uma solução de ácido sulfúrico 0,5 M em uma faixa de potencial 0 a 1,5 V com 10 ciclos em uma taxa de velocidade 0,1 V/s (FISCHER et al., 2009).
- (ii) Os eletrodos de ITO (*Indium Tin Oxide*) revestido sobre vidro (75 x 50 x 1,1 mm, resistividade 8-12 Ω/sq, da Lumtech, Taiwan) foram limpos usando papel fino com éter de petróleo (99%, CRQ) para remoção de gorduras. Após, foi utilizado água destilada com detergente neutro (1,0% v/v) fervente por 10 min. A remoção do

detergente foi feita lavando com água destilada 3x. Em seguida, os eletrodos de ITO foram levados ao banho ultrassônico com acetona PA por 10 min. para remoção compostos orgânicos residuais. Depois, mais 10 min em banho ultrassônico com álcool isopropílico PA para remoção do solvente orgânico.

- (iii) Os eletrodos de ouro *screen-print* (C220 AT, Dropsens<sup>®</sup>) foram limpos cuidadosamente utilizando uma lixa de polimento (P4000) com suspensão de alumina (1,0  $\mu\text{m}$ ), em seguida, lavados com álcool isopropílico e água destilada. Em seguida, foram submetidos a uma limpeza eletroquímica empregando a técnica de voltametria cíclica usando uma solução de ácido sulfúrico 0,5 mol/L em uma faixa de potencial 0 a 1,5 V com 10 ciclos em uma taxa de velocidade 0,1 V/s.

#### 4.2.2. Filmes de nanocompósito de acetato de celulose

Os filmes de acetato de celulose (Acel) foram obtidos a partir de solução de acetato de celulose 1% (m/m) em uma mistura de solvente de acetona (99%, da CRQ) e ciclo-hexanona (99%, da Synth) (50/50, m/m) sob agitação por 3h até obter uma mistura homogênea.

As amostras de nanotubos de titanato de sódio foram preparados via reação hidrotermal descrito por Kasuga et al.,1998, a partir de uma suspensão de nanopartículas de dióxido de titânio (P25, Sigma Aldrich) em 50 mL de uma solução aquosa de 10,0 mol/L de NaOH. O recipiente de teflon (125 mL, fabricação *home-made*) com a suspensão foi inserido dentro de autoclave de aço inox, fechado e aquecido a 120 °C por 60 horas. O sólido obtido foi separado por centrifugação e lavado com água destilada, depois com solução de 0,1 mol/L de ácido clorídrico até o pH do sobrenadante ser igual ou menor que 7.

Para se obter o nanocompósito polimérico de acetato de celulose-nanotubos de  $\text{TiO}_2$  (Acel-NT) foi misturado 4 mL de acetato de celulose e 4 mg de nanotubos de titanato de sódio por 1h. Para se obter o filme de acetato de celulose-óxido de grafeno-nanotubos de  $\text{TiO}_2$  (Acel-

OxG-NT), foi misturado 4 mL de acetato de celulose, 4 mg de nanotubos de titanato de sódio e 1,0 mg óxido de grafeno (2 mg/mL em H<sub>2</sub>O, Sigma-Aldrich) agitados por 1h. Os filmes foram obtidos após a deposição por *casting* sobre eletrodos de ouro *screen-print* da Dropsens® (C220 AT) e secos à temperatura ambiente. Os filmes foram analisados por voltametria cíclica usando um cabo (PGSTAT 204) para conexão dos eletrodos Dropsens® no potenciostato (AUTOLAB® PGSTAT 204, Metrohm) com software NOVA 2.1. Foi utilizada 50 µL de solução de 5,0 mmol/L de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] em uma solução tampão de 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) em uma janela de potencial entre -0,3 V e 0,7 V em 5 ciclos com velocidade de varredura de 50 mV/s.

#### 4.2.3. Filmes de nanocompósito de EuDragit 100

Foi obtida uma solução de EuDragit E100 1% (m/m) utilizando solvente acetona (99%, CRQ Química), onde a mistura foi agitada por 1h em temperatura ambiente. Para obter o filme nanocompósito, foi adicionado 10% de NP TiO<sub>2</sub> (21 nm, Sigma-Aldrich) à solução de EuDragit 1% agitada por 1h (EuDragit-NP TiO<sub>2</sub>). Os filmes de EuDragit e EuDragit-NP TiO<sub>2</sub> foram obtidos pelo método *spin coating* onde 20 µL de solução foram depositados sobre a superfície de ITO limpo em diferentes rpm (rotação por minutos): 2500, 3000, 3500 e 4000 por 30s em um Spin Coater (VTC – 50A, MTI Corporation).

Os filmes foram analisados por voltametria cíclica empregando um potenciostato (Autolab PGSTAT 204, Metrohm) com um software NOVA 2.1. Os ensaios eletroquímicos foram realizados usando uma solução eletroativa de 5,0 mmol/L de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] em uma solução tampão de 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4). Foi utilizado um eletrodo de referência Ag/AgCl (3,0 mol/L de KCl), um contra-eletrodo de fio de platina e, os eletrodos de trabalho utilizados foram os eletrodos com os filmes de EuDragit e EuDragit-NP-TiO<sub>2</sub>. Foram analisados em uma janela de potencial entre -0,2 V e 0,5 V em 5 ciclos com velocidade de varredura de potencial de 50 mV/s.

#### 4.2.4. Filmes e membranas nanocompósito de PVDF

Para obtenção de membranas poliméricas foi utilizada a técnica de *electrospinning* (FELTZ et al., 2017). Foram usadas duas soluções; (i) uma, de PVDF 20% (m/m) em DMF (99%, Synth) e, (ii) outra, de PVDF 20% (m/m) em DMF (99%, Synth) com NP TiO<sub>2</sub> 5% (m/m) (21nm, Sigma-Aldrich) (PVDF 20%-NP TiO<sub>2</sub>). As soluções foram agitadas por 8 horas em temperatura ambiente. As soluções foram introduzidas em uma seringa (polietileno-SR) com agulha metálica ( $\varnothing = 0,8$  mm) e posicionada em uma bomba de infusão de alta sensibilidade (ST670, Santronic). O eletrodo positivo da fonte de alimentação de alta tensão foi conectado na agulha metálica e o eletrodo negativo no coletor metálico estático. Os parâmetros de *electrospinning* utilizados foram: Distância de trabalho  $dw = 18$  cm, tensão aplicada  $E = 15$  kV, vazão  $Q = 8$  mL/h, temperatura  $T = 23$  °C, umidade  $< 50\%$ . As membranas fibrosas de PVDF com e sem NP-TiO<sub>2</sub> foram coletadas sobre eletrodo de ITO por 10s, 20s, e 30s e analisados em VC utilizando uma solução de 5,0 mmol/L de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] em uma solução tampão de 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) em uma janela de potencial entre -0,2 V e 0,6 V em 5 ciclos com velocidade de varredura de potencial de 50 mV/s.

Para obtenção dos filmes de PVDF foi utilizada a técnica de *spin coating* (TYONA, 2013). Soluções poliméricas de PVDF 1% (m/m), 3% (m/m) e 5% (m/m) em solvente DMF (99%, Synth) foram preparadas e agitadas por 4h a 60 °C. Em seguida, os filmes foram obtidos em diferentes valores de rpm: 2500, 3000, 3500, 4000 por 15s e, em seguida, foram aquecidos a 60 °C por 1h. Os filmes foram caracterizados por VC utilizando uma solução de 5,0 mmol/L de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] em uma solução tampão de 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) empregando uma janela de potencial entre -0,3 V e 0,6 V em 5 ciclos com velocidade de varredura de potencial de 50 mV/s.

Foram obtidos filmes nanocompósitos de PVDF a partir da adição de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> (21nm, Sigma-Aldrich), nanotubos de TiO<sub>2</sub> (100nm x 10 $\mu$ m, Sigma-Aldrich), óxido de

grafeno (2 mg/mL em H<sub>2</sub>O, Sigma-Aldrich) e nanopartículas de ouro na proporção de 10 % (m/m) em relação ao PVDF 1% (m/m). As nanopartículas de ouro foram sintetizadas pelo método de Turkevich apresentando coloração vermelha conforme a literatura (SILVA, 2016). Os filmes nanocompósitos de PVDF sobre eletrodos de ITO foram obtidos com os seguintes parâmetros: volume de deposição de 30 µL e 3000 rpm por 30s. Foram nomeados como PVDF-NP TiO<sub>2</sub>, PVDF-NT TiO<sub>2</sub>, PVDF-OxG e PVDF-NP Au, respectivamente. Os filmes foram caracterizados por VC utilizando uma solução de 5,0 mmol/L de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] em uma solução tampão de 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) em uma janela de potencial entre -0,2 V e 0,6 V em 5 ciclos com velocidade de varredura de potencial de 50 mV/s.

Para obtenção dos filmes nanocompósitos com micropartículas de óxido de ferro revestidas com estreptavidina (MPs), foi adicionado 10 % (m/v) de MPs (0,72 mg/mL, Elecsys Tg II, Cobas<sup>®</sup> cedida pela empresa Laboratórios Reunidos – Manaus/AM) em cada 1,0 mL de solução de PVDF-NP TiO<sub>2</sub>, PVDF-NT TiO<sub>2</sub>, PVDF-OxG e PVDF-NP Au. Para obtenção dos filmes foi necessário diluir as soluções até 0,2% de PVDF mantendo as proporções dos componentes. Os filmes dos nanocompósitos com e sem MPs foram depositados 0,5 µL de solução sobre eletrodos de ouro (área geométrica de 0,02 cm<sup>2</sup>), 2 µL sobre eletrodos de carbono vítreo (área geométrica de 0,071 cm<sup>2</sup>) e 2 µL sobre eletrodos de ouro *screen-print* (área geométrica de 0,071 cm<sup>2</sup>, C220 AT, Dropsens<sup>®</sup>) pelo método de *casting* à temperatura ambiente e umidade < 50% (termohigrômetro, HM – 1, Highmed).

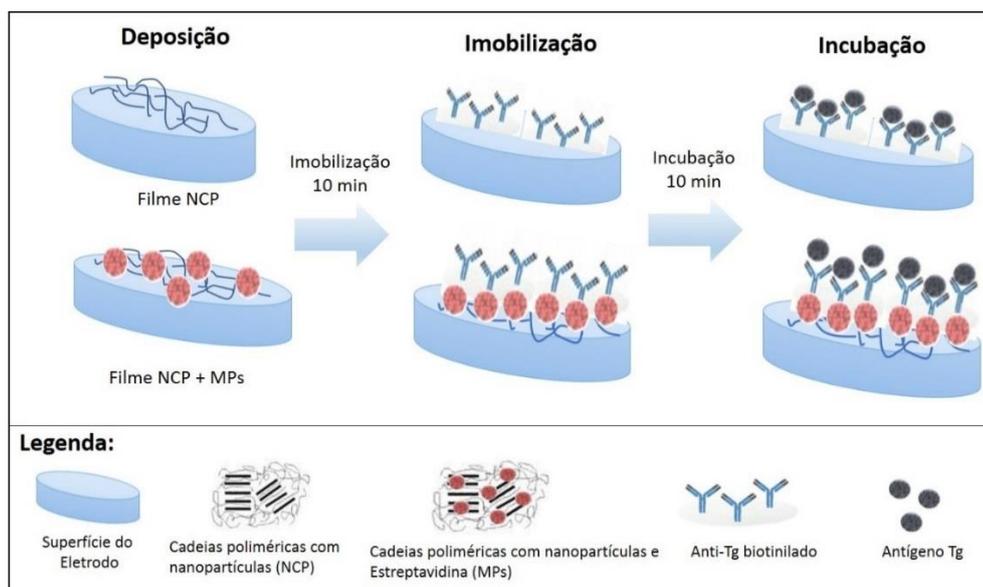
#### **4.3. Imobilização dos anticorpos anti-Tg biotinilado sobre filmes NCP com e sem estreptavidina (MPs)**

A imobilização dos anticorpos monoclonais anti-Tg biotinilado (1,0 mg/L, Elecsys Tg II, Cobas<sup>®</sup> cedido pela empresa Laboratórios Reunidos – Manaus/AM) foi feita por *drop casting* de acordo com o eletrodo utilizado: (i) sobre eletrodos de ITO modificados com filmes NPC sem estreptavidina (MPs), a imobilização dos anticorpos foi feita com deposição de uma

alíquota de 40  $\mu\text{L}$  de anti-Tg biotilado (1,0 mg/L) por 24h a 5  $^{\circ}\text{C}$ ; (ii) sobre eletrodos de ouro modificados com filmes NPC com e sem estreptavidina (MPs), foi depositado 2  $\mu\text{L}$  a 18  $^{\circ}\text{C}$  por 10 min e, (iii) sobre eletrodos de carbono vítreo e de ouro (Dropsens<sup>®</sup>) modificados com filmes NCP com estreptavidina (MPs), a deposição foi feita com volume de 3  $\mu\text{L}$  a 18  $^{\circ}\text{C}$  por 10 min (JAIN; CHENG, 2017).

#### 4.4. Estudo de reconhecimento molecular da Tireoglobulina

Para a formação do complexo anticorpo-antígeno, utilizou-se o método de incubação (PARK, M., 2019). Foi feita uma solução-mãe de 10,0 mg/L de Tg humana a partir de 1,0 mg de Tg humana (*pellet*, Sigma-Aldrich) dissolvido em 100 mL de 10,0 mM de PBS, pH = 7,4 (Sigma-Aldrich). Após a diluição em 2, 4, 6, 8 e 10  $\mu\text{L}$  de Tg, as soluções foram depositadas sobre os filmes nanocompósitos com anti-Tg imobilizados nos eletrodos modificados por 10 minutos. Em seguida, foram lavadas com solução de PBS 10,0 mmol/L (pH = 7) e levadas para análise eletroquímica por VOQ e VPD em solução de 5,0 mmol/L de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  em 0,1 mol/L de solução tampão de PBS. Na Figura 4-2 é ilustrada as principais etapas realizadas para construção dos imunossensores estudados neste trabalho.



**Figura 4-2.** Ilustração esquemática das principais etapas para obtenção dos imunossensores propostos com e sem estreptavidina. Fonte: Autor, 2019.

## 4.5. Caracterizações dos filmes poliméricos

### 4.5.1. Voltametria cíclica

As medidas eletroquímicas foram realizadas com o auxílio de um potenciostato AUTOLAB® PGSTAT 204 (Metrohm Autolab) interfaciado com o programa computacional NOVA 2.1. Os ensaios eletroquímicos foram realizados usando uma solução eletroativa de 5,0 mmol/L de  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  como sonda eletroquímica em uma solução tampão de 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4). Foi utilizada a célula eletroquímica convencional composta por um eletrodo de referência Ag/AgCl (3,0M KCl), um contra-eletrodo de fio de platina e o eletrodo de trabalho. Na voltametria cíclica, a janela de potencial usada foi de acordo com as características do eletrodo de trabalho utilizado, velocidade de varredura 0,1 V/s com 5 ciclos. Na voltametria de onda quadrada foram registrados em -0,1 a 0,7 V, amplitude de 60 mV, frequência de 50 Hz, incremento de 5 mV. Na voltametria de pulso diferencial foram registrados -0,1 a 0,7 V, com amplitude de pulso de 10 mV e potencial de 100 mV/s.

### 4.5.2. Espectroscopia de fotoabsorção no infravermelho

As medidas de espectroscopia de fotoabsorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas com o espectrômetro (Nicolet – IR 200, Thermo). Os filmes nanocompósitos poliméricos foram preparados em forma de membranas e colocados sobre o feixe incidente. Os espectros foram obtidos no modo de transmissão com um total de 32 varreduras e resolução espectral de  $4\text{ cm}^{-1}$ .

### 4.5.3. Espectroscopia de fotoelétrons de raios-X

As medidas de espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS) foram realizadas no espectrômetro K-Alpha (Thermo Scientific) equipado com um analisador hemisférico ( $180^\circ$ ) de energia de elétrons utilizando excitação da linha de Al  $K\alpha$  monocromática ( $h\nu = 1486,6\text{ eV}$ ). Os espectros de XPS foram calibrados a partir da energia de ligação de 285,0 eV do átomo de

C (alifáticos). Os dados foram coletados usando feixe de raios-X de spot size = 650  $\mu\text{m}$  com ângulo de emissão dos fotoelétrons de  $0^\circ$  em relação à normal da superfície dos filmes. Os filmes foram montados em fita condutora de cobre dupla-face e os espectros foram coletados em três pontos diferentes.

#### 4.5.4. Microscopia eletrônica de varredura

A caracterização morfológica foi realizada através da aquisição de micrografias dos filmes nanocompósitos poliméricos depositados sobre ITO empregando um microscópio eletrônico de varredura da Carl Zeiss, modelo LEO435VP. Os filmes nanocompósitos poliméricos foram fixados em suporte *stubs* por meio de uma fita condutora dupla-face de carbono, e levados para serem recobertos com uma fina camada de ouro em um evaporador Balzers SCD 050. As análises foram realizadas no Laboratório Temático de Microscopia Ótica e Eletrônica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, LTMOE/INPA.

#### 4.5.5. Microscopia de força atômica

A topografia da superfície dos filmes nanocompósitos poliméricos foi analisada por um AFM (Innova, Bruker) em uma área de  $(15 \times 15) \mu\text{m}^2$  e  $(5 \times 5) \mu\text{m}^2$  operada em modo contato usando *cantilevers* de nitreto de silício. Foram realizados com  $512 \times 512$  pixels a uma taxa de varredura de 1,0 Hz. Todas as medidas foram realizadas em temperatura ambiente ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e  $40 \pm 1\%$  de umidade relativa.

#### 4.5.6. Medidas de ângulo de contato

As medidas de ângulo de contato foram realizadas adicionando-se uma gota de 10  $\mu\text{L}$  de água deionizada sobre os filmes nanocompósitos poliméricos. O comportamento da gota foi filmado com um microscópio digital (LITE). As medições foram realizadas com temperatura de  $24 \pm 1,4^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $53 \pm 3\%$ . O plugin Drop Analysis – LB-ADSA foi

implementado no processador de imagem ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

Com esta ferramenta foi possível medir manualmente o ângulo entre a superfície adjacente da gota de água e a superfície dos filmes de NCP e NCP-MP. As medidas foram obtidas em triplicata e o tempo de permanência da gota foi de 2 minutos.

#### 4.5.7. Medidas de Energia Livre Superficial

Os componentes da tensão superficial foram medidos usando a equação de Young-Dupre:

$$(1 + \cos \theta)\gamma_L = 2(\sqrt{\gamma_S^{LW}\gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_S^+\gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^-\gamma_L^+}) \quad \text{Eq. 1}$$

onde, para um sólido S, os três parâmetros de tensão superficial do sólido  $\gamma_S^{LW}$ ,  $\gamma_S^+$ , e  $\gamma_S^-$  podem ser determinados medindo o ângulo de contato de três líquidos polares para os quais os parâmetros  $\gamma_L^{LW}$ ,  $\gamma_L^+$ , e  $\gamma_L^-$  são conhecidos (WU; SHANKS, 2004).

$LW$  = interações de *Lifshitz – van der Waals*

$L$  = líquido

$S$  = sólido

Neste trabalho, foram utilizados como solventes água deionizada, glicerol e etileno glicol em temperatura ambiente.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o desenvolvimento do imunossensor proposto neste trabalho foi feito um estudo de modificação do eletrodo empregando técnicas eletroquímicas para selecionar o melhor substrato para imobilização de anticorpos para detecção de Tg, além de apresentar (i) fácil produção, (ii) baixo custo e (iii) melhor desempenho eletroquímico.

### 5.1. Estudo de imobilização de biomoléculas em filmes $\text{TiO}_2$

O  $\text{TiO}_2$  é um material muito versátil e biocompatível que apresenta na sua estrutura hidroxilas superficiais e vacâncias de oxigênio que podem favorecer a imobilização de biomoléculas. Assim, filmes de  $\text{TiO}_2$  obtidos pelo processo sol-gel foram aplicados na modificação de eletrodo de ITO, visto que, apresentam um grande potencial como substrato de imobilização de biomoléculas em biossensores (CANCINO, et. al., 2014).

A Figura 5-1 mostra os voltamogramas cíclicos dos eletrodos de ITO modificados com filmes finos de  $\text{TiO}_2$  nanoestruturado obtidos através do processo sol-gel e dos eletrodos  $\text{TiO}_2$ /ITO com biomoléculas (DNA e BSA) imobilizadas sobre sua superfície.

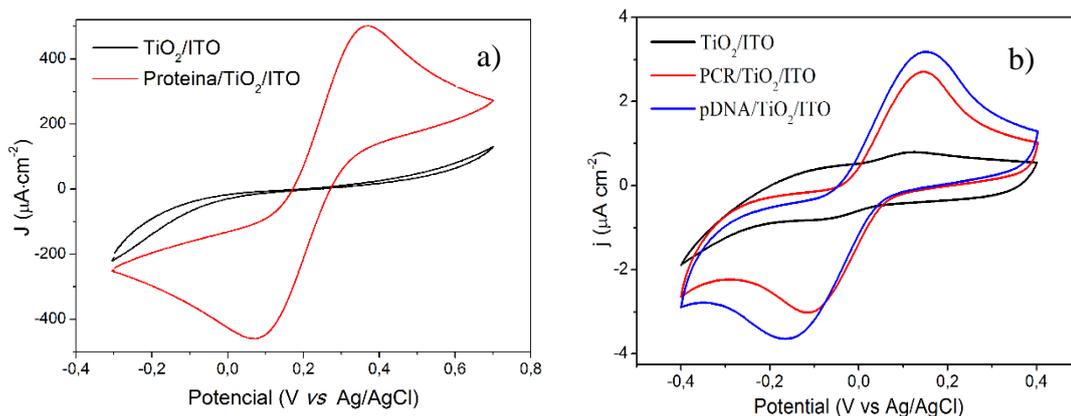


Figura 5-1. Voltamogramas cíclicos dos filmes de  $\text{TiO}_2$ /ITO (linha preta), (a) de proteínas BSA imobilizadas (linha vermelha) sobre  $\text{TiO}_2$ /ITO e (b) de filmes de DNA-PCR/ $\text{TiO}_2$ /ITO (linha vermelha) e de pDNA/ $\text{TiO}_2$ /ITO (linha azul).

A Figura 5-1 (a) mostrou a modificação da superfície do TiO<sub>2</sub>/ITO através da imobilização de proteínas de albumina de soro bovino (BSA) em solução [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> a 5,0 mmol/L e solução de 0,1 mol/L de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) (pH 7,4). Nota-se que após a imobilização da proteína BSA, o voltamograma do eletrodo modificado com proteína BSA apresentou picos redox correspondente à resposta eletroquímica significativa dos grupos proteicos presente na superfície.

A Figura 5-2 (b) mostra o comparativo entre os voltamogramas cíclicos dos filmes de pDNA/TiO<sub>2</sub>/ITO, PCR/TiO<sub>2</sub>/ITO e TiO<sub>2</sub>/ITO em solução de azul de metileno 2,0 μmol/L usado como agente intercalante e sonda eletroativa (pH = 5,6). Observou-se que, após a imobilização das estruturas de ds-DNA-PCR e ds-DNA-plasmídeo sobre os filmes de TiO<sub>2</sub>/ITO, os picos de corrente redox do azul de metileno (usado como espécie eletroativa) aumentaram significativamente em comparação ao eletrodo de TiO<sub>2</sub>/ITO. Também foi observado um deslocamento entre os potenciais catódicos do DNA-PCR e do DNA-plasmídeo, indicando que os eletrodos modificados com moléculas de DNA respondem ao processo de redução de formas diferentes. Alguns fatores podem contribuir para observação destes resultados como, por exemplo, a geometria das estruturas de DNA empregado e a sequência de pares de bases nitrogenadas que compõe as moléculas de DNA.

É conhecido na literatura que a molécula de DNA-plasmídeo da bactéria *E. Coli* possui 3972 pares de base nitrogenada e uma geometria circular. Estas características podem contribuir com o aumento da área de contato sobre o filme de TiO<sub>2</sub>/ITO. Além disso, o DNA-PCR é um fragmento molecular pequeno quando comparado com DNA-plasmídeo, o que diminui sua área de contato sobre a superfície do filme de TiO<sub>2</sub>/ITO. A diferença na resposta eletroquímica catódica se deve provavelmente à maneira como o azul de metileno interage com a citosina e guanina na sequência de bases nitrogenadas intercalando o empilhamento π dentro da estrutura do DNA (LI, C. et al., 2017; ZHU et al., 2008).

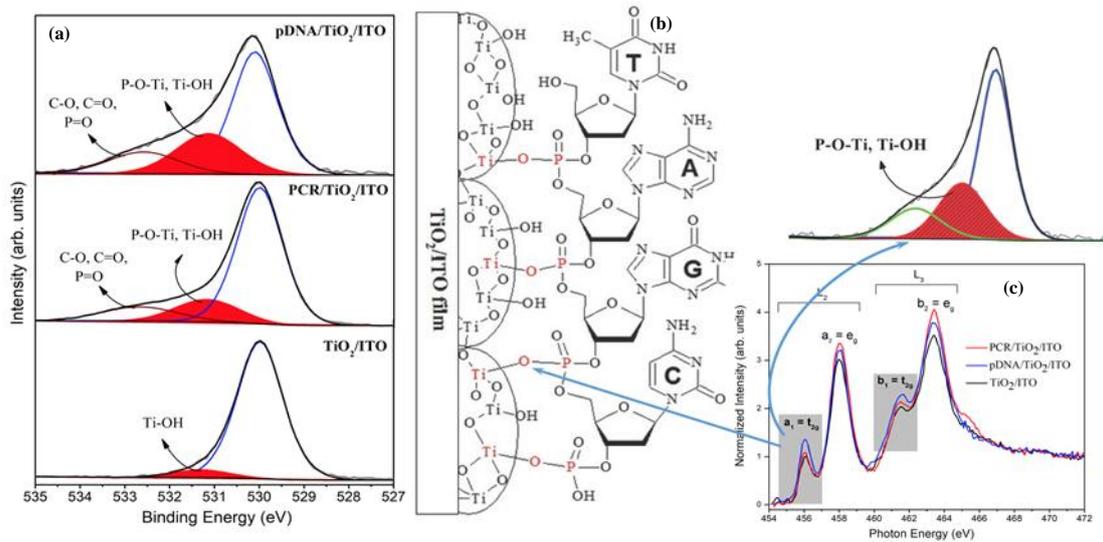


Figura 5-2. (a) Espectros de XPS do nível 1s do oxigênio dos filmes de DNA. (b) Esquema de imobilização do DNA sobre filme de  $\text{TiO}_2/\text{ITO}$  e (c) espectros de NEXAFS na borda-L do titânio. Fonte: SILVA-MORAES, 2018.

A Figura 5-2 (a) mostra a análise de XPS para os filmes de pDNA/ $\text{TiO}_2/\text{ITO}$ , PCR/ $\text{TiO}_2/\text{ITO}$  e  $\text{TiO}_2/\text{ITO}$  no nível 1s do oxigênio onde a região destacada em vermelho indica a presença de ligações químicas covalente do grupo químico P-O-Ti formada após o processo de imobilização das estruturas de DNA sobre a superfície do filme de  $\text{TiO}_2$ . A formação do grupo químico P-O-Ti surge após a interação eletrostática entre o grupo trifosfato que apresenta densidade de carga negativa e a densidade de carga positiva presente na superfície do  $\text{TiO}_2$  devido às vacâncias de oxigênio conforme a ilustração esquemática na Figura 5-2 (b). A Figura 5-2 (c) mostra os espectros de NEXAFS na borda-L do titânio para os filmes de DNA no qual pode-se observar que os orbitais  $t_{2g}$  vazios do titânio contribuem para a formação das ligações covalente (SILVA-MORAES et al., 2018).

Os eletrodos de ITO modificados com filmes de  $\text{TiO}_2$  sol-gel como substrato mostraram-se bastante promissores na construção do imunossensor proposto, porquanto apresentaram fácil preparação e boa resposta eletroquímica, porém, após a utilização do

eletrodos de ITO não foi possível reutilizá-los, conseqüentemente, inviabilizando sua aplicação como substrato de baixo custo para imobilização de anticorpos anti-Tg.

De forma alternativa, foi empregado o uso de filmes nanocompósitos poliméricos (NCP) como suporte para a imobilização dos anticorpos anti-Tg, uma vez que a limpeza dos eletrodos utilizados permite a remoção dos materiais poliméricos e sua reutilização, além das vantagens que estes materiais apresentam por meio das suas propriedades únicas.

Os ensaios eletroquímicos a seguir foram realizados usando a solução tampão fosfato salino mais conhecido como PBS. A solução de 0,1 mol/L de PBS foi utilizada como eletrólito suporte nos ensaios eletroquímicos para simular a concentração salina e o pH presente no sangue humano. Todos os ensaios eletroquímicos foram realizados em temperatura ambiente.

A solução iônica dos íons ferrocianeto e ferricianeto  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  foi usada como sonda eletroquímica para acompanhar a modificação da superfície do eletrodo, pois apresenta um perfil eletroquímico reversível, sendo amplamente utilizada em estudos eletroquímicos. Sua equação química redox é:



## 5.2. Estudos da obtenção de nanocompósitos poliméricos com NP TiO<sub>2</sub>

Inicialmente, foi realizada uma seleção da matriz polimérica que será empregada como suporte nanocompósito polimérico com os polímeros de acetato de celulose, EuDragit E100<sup>®</sup> e PVDF. Para a obtenção dos NCPs foram utilizadas as nanopartículas de TiO<sub>2</sub>.

A adição das nanopartículas de TiO<sub>2</sub> à matriz polimérica tem por finalidade conferir ao material NCP obtido uma propriedade elétrica capaz de permitir a transferência de elétrons na interface do material NCP até o eletrodo, e também, conferir a propriedade de

biocompatibilidade que permita a imobilização dos anticorpos anti-Tg, além de apresentar alta sensibilidade e seletividade, baixo limite de detecção e boa reprodutibilidade e estabilidade aos imunossensores propostos.

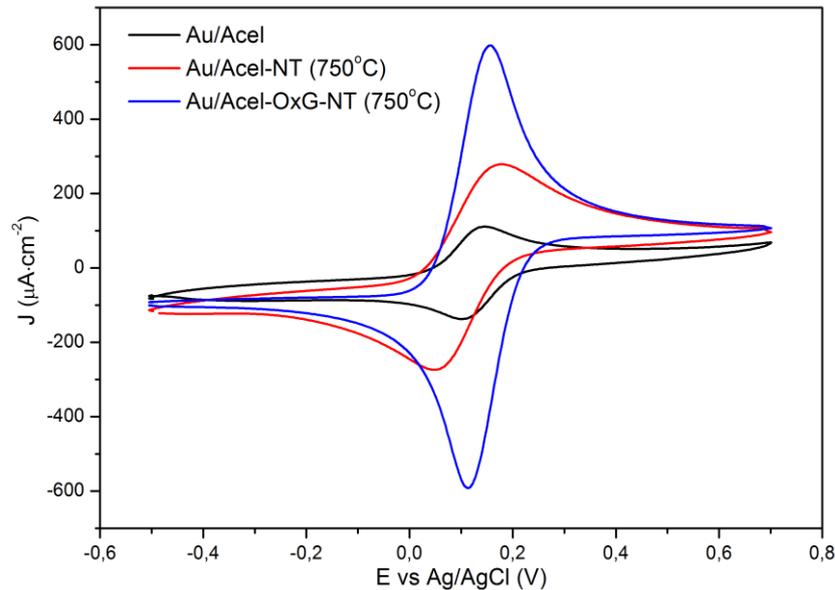
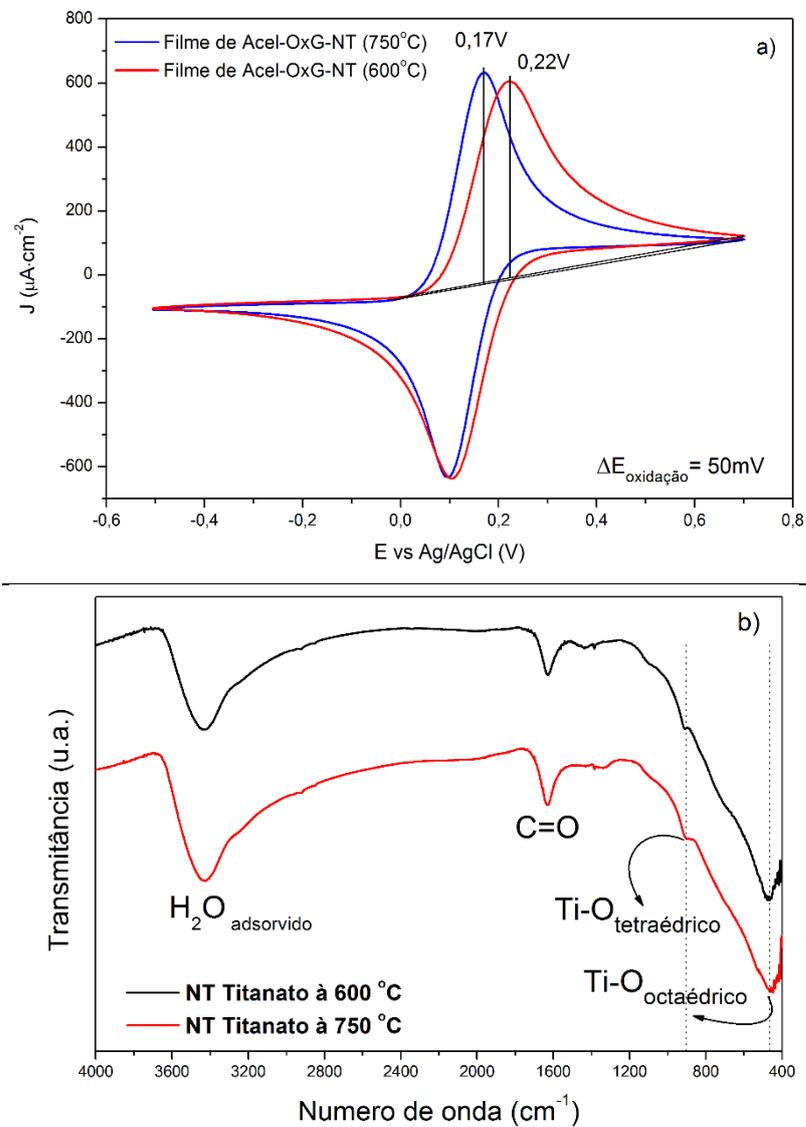


Figura 5-3. Voltamogramas cíclicos dos filmes de Acel/Au, Acel-NT (750 °C)/Au e Acel-OxG-NT (750 °C)/Au em 5,0 mmol/L de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  e 0,05 mol/L de PBS (pH = 7,4) com velocidade de varredura de 0,1 V/s.

A Figura 5-3 mostra os voltamogramas cíclicos de eletrodos de ouro *screen-print* (C220 AT, Dropsens®) modificados com filme de acetato de celulose (– linha preta), com filme nanocompósito formado a partir de acetato de celulose com nanotubos de titanato (750 °C) dispersos (– linha vermelha) e com filme nanocompósito a partir de acetato de celulose, óxido de grafeno e nanotubos de titanato (750 °C) dispersos (– linha azul). Claramente, observa-se um aumento nos valores de corrente de pico redox após a incorporação de materiais condutores.

O voltamograma cíclico do filme de acetato de celulose apresentou o perfil eletroquímico do sistema  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ , porém com certa resistividade quando comparado com os outros voltamogramas dos filmes nanocompósitos. A incorporação dos nanotubos de titanato à matriz polimérica do acetato de celulose melhorou consideravelmente os valores de corrente

redox, apesar disso, o aumento da diferença entre os potenciais de oxidação e redução indicam que o processo reversível do  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  requer mais energia para ocorrer na interface do eletrodo sólido-líquido. Entretanto, a inserção de óxido de grafeno e dos nanotubos de titanato na matriz polimérica de acetato de celulose proporcionou uma melhora significativa na resposta eletroquímica por um efeito sinérgico, tanto nos valores de corrente redox como nos valores de potenciais redox, refletindo na melhor reversibilidade do processo redox do  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ .



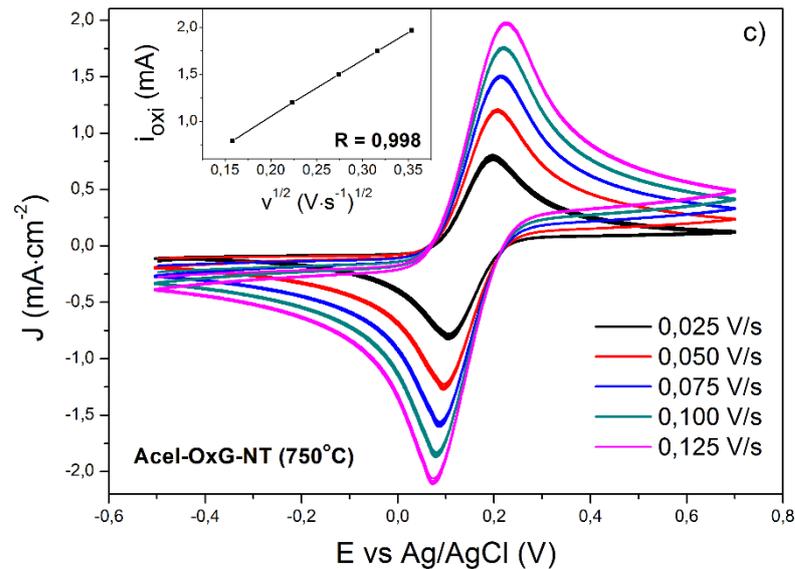


Figura 5-4. (a) Voltamogramas cíclicos dos filmes Accl-OxG com nanotubos de titanato a 750 °C e 600 °C. (b) Espectros de absorção IV dos nanotubos de titanato a 750 °C e 600 °C. (c) Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura de potencial em 5,0 mmol/L de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  e 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4). *Inset* corrente versus quadrado da taxa de velocidade do filme Accl-OxG-NT (750°C).

Na Figura 5-4 (a) demonstra-se o comparativo entre os voltamogramas cíclicos dos filmes nanocompósitos de Accl-OxG com nanotubos de titanato calcinado em 750 °C e 600 °C. Observou-se que os valores de corrente redox são próximos e os valores de potencial redox apresentaram um deslocamento de 50 mV. O filme Accl-OxG-NT (750 °C) apresentou menor diferença  $\Delta E$  ( $E_{\text{red}} - E_{\text{oxi}}$ ) indicando menor valor de *band gap* do que o filme de Accl-OxG-NT (600 °C).

Os espectros de absorção IV obtidos para nanotubos de titanato calcinado a 750 °C e 600 °C encontram-se na Figura 5-4 (b). Foram observadas bandas vibracionais em  $3425 \text{ cm}^{-1}$  e  $1636 \text{ cm}^{-1}$  atribuídas à presença de  $\text{H}_2\text{O}$  adsorvida e ao estiramento de carbonila, respectivamente. As bandas vibracionais em  $953 \text{ cm}^{-1}$  e  $485 \text{ cm}^{-1}$  foram atribuídas aos estiramentos das ligações Ti-O (tetraédrico) e das ligações Ti-O (octaédrico) (LI, S.; ZHAO; ZHENG, 2013; SONG et al., 2018). Não foram observadas mudanças químicas após o processo de calcinação dos titanatos.

Foi feito o estudo da variação da taxa de velocidade de varredura de potencial para o filme Acel-OxG-NT (750 °C) para determinar o processo de transferência de massa que ocorre na interface do eletrodo e, também para determinar a área eletroativa do eletrodo modificado.

Os voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura de potencial são apresentados na Figura 5-4 (c) com *inset* corrente *versus* raiz quadrado da taxa de velocidade. As correntes de pico anódico do Acel-OxG-NT (750 °C) apresentou uma dependência linear com a raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v^{1/2}$ ) indicando que o processo de transferência de massa é governado por difusão da espécie eletroativa. Neste caso, pode-se utilizar a equação de Randles-Sevcik (equação 3) para calcular a área eletroativa do eletrodo Acel-OxG-NT (750°C). Obtendo-se o valor de  $1,718 \pm 0,08 \text{ cm}^2$  enquanto o valor da área geométrica do eletrodo de ouro é igual a  $0,125 \text{ cm}^2$ .

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

Onde:

$I_p$  = corrente de pico (A);

$A$  = área eletroativa do eletrodo ( $\text{cm}^2$ );

$D$  = coeficiente de difusão da espécie eletroativa para a solução de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  é igual a  $6,7 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  (KONOPKA; MCDUFFIE, 1970);

$n$  = o número de elétrons transferidos na reação redox;

$v$  = a velocidade de varredura (V/s) e;

$C$  = a concentração da espécie eletroativa ( $\text{mol}/\text{cm}^3$ ).

Os filmes nanocompósitos de Acel-OxG-NT (600°C/750°C) apresentaram excelentes valores de corrente redox. Desta forma, o nanocompósito mostrou-se bastante promissor para ser empregado como suporte para imobilização dos anticorpos. Após 20 minutos, o filme nanocompósito em contato com a solução eletroquímica começou a deslocamento da superfície de eletrodo de ouro, inviabilizando seu emprego na construção de imunossensor para detecção de Tg.

Em seguida, foi iniciado os testes com o polímero EuDragit<sup>®</sup> E100 para obtenção dos filmes nanocompósitos com nanopartículas de TiO<sub>2</sub>. Na Figura 5-5 são apresentados os voltamogramas cíclicos dos filmes EuDragit (1%) e EuDragit (1%)-NP TiO<sub>2</sub> depositados sobre ITO obtidos em 3000 rpm. O EuDragit é um copolímero catiônico à base de 2-dimetilaminoetilmetacrilato, metilmetacrilato e n-butilmetacrilato.

É considerado um polímero funcional bastante versátil e de fácil processabilidade. Para aplicá-lo como suporte de nanopartículas, foi realizado um estudo de variação de espessura do filme para verificar a presença de atividade eletroquímica do [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup>.

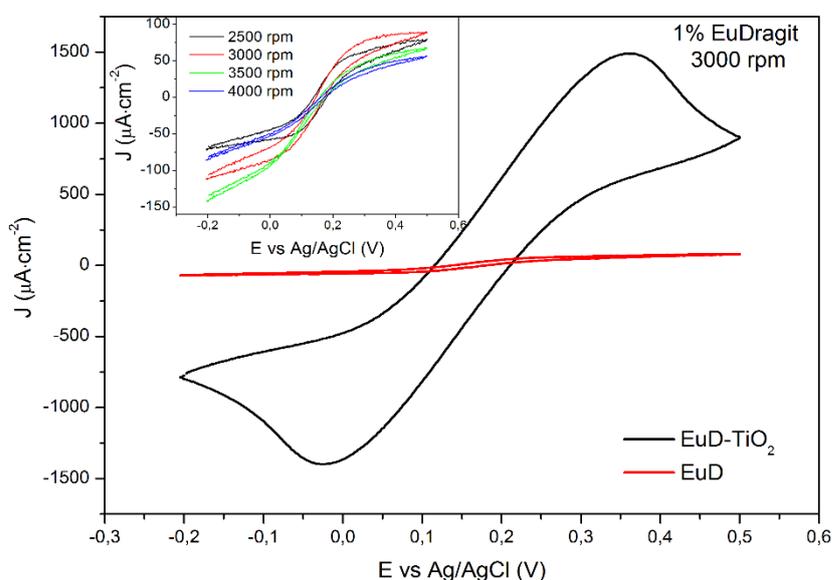


Figura 5-5. Voltamogramas cíclicos dos filmes EuD e EuD-TiO<sub>2</sub> em 5,0 mmol/L de [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> e 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) com velocidade de varredura de 0,05 V/s. *Inset*, voltamogramas cíclicos de filmes de EuDragit obtidos em diferentes valores de rotação por minuto (rpm).

No *inset* da Figura 5-5, encontram-se vários voltamogramas cíclicos de filmes de EuDragit (1%) obtidos em 2500, 3000, 3500 e 4000 rpm. Este estudo foi realizado a fim de observar uma melhora significativa nas respostas eletroquímicas à medida que a espessura dos filmes poliméricos de EuDragit<sup>®</sup> diminui, uma vez que o aumento gradativo da rotação por minuto pode diminuir a espessura dos filmes, e conseqüentemente, melhorar a resposta redox

da sonda eletroquímica. Os filmes poliméricos de EuDragit® não apresentaram uma correlação entre os valores de corrente redox e os diferentes valores de rotação por minuto.

Entretanto, após a incorporação de nanopartículas de TiO<sub>2</sub>, foi observado o sinal eletroquímico do [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup>, indicando potencialidade do nanocompósito obtido como substrato para imobilização de anticorpos. Apesar disso, o perfil eletroquímico apresentou uma grande diferença entre os potenciais redox ( $\Delta E = 385 \text{ mV}$ ) nas condições eletroquímicas determinadas, solução salina com  $\text{pH} \simeq 7$ . A imobilização de proteínas pode aumentar a diferença entre os potenciais ou/e diminuir os valores de corrente por efeito de passivação sua aplicação como substrato o que não favorece a imobilização de proteínas.

A técnica de *electrospinning* é amplamente usada na produção de membranas fibrosas que podem ser aplicadas na construção de sensores. Na Figura 5-6, foi apresentada um estudo eletroquímico de variação de tempo de deposição das membranas eletrofiadas de PVDF sobre eletrodo de ITO: 10 s, 20 s e 30 s. O tempo de 10 s não mostrou diferença entre os voltamogramas das membranas de PVDF e PVDF-TiO<sub>2</sub> indicando que as fibras poliméricas se encontram muito espaçadas entre si.

A comparação entre as membranas de PVDF e PVDF-TiO<sub>2</sub> no tempo de 20 s mostrou que a presença das nanopartículas de TiO<sub>2</sub> aumentou o valor de corrente de pico anódico em 65% do perfil eletroquímico do [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup>. No tempo de deposição de 30 s, os picos anódicos e catódicos são mais definidos para ambas as membranas poliméricas, no qual foi observado um acréscimo no valor de corrente anódico em 37% após inserção das nanopartículas de TiO<sub>2</sub>.

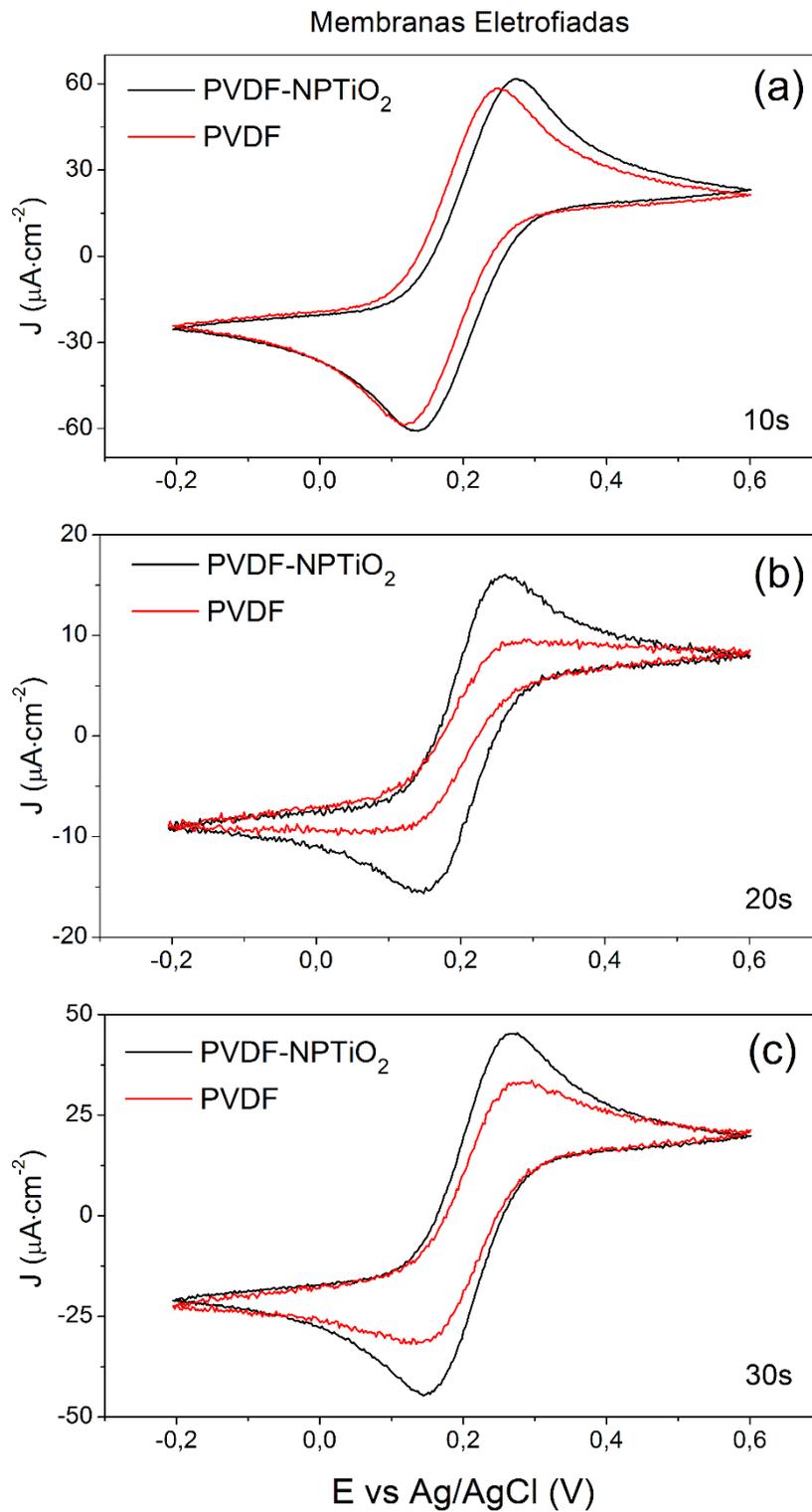


Figura 5-6. Voltamogramas cíclicos de membranas de PVDF e PVDF-TiO<sub>2</sub> obtidos em (a) 10s, (b) 20s, e (c) 30s de deposição por *electrospinning* em 5,0 mmol/L de [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> e 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) com velocidade de varredura de 0,01 V/s.

A obtenção de filmes de PVDF/ITO por *spin coating* mostrou-se ser mais acessível em comparação à obtenção de membranas de PVDF/ITO por técnica *electrospinning*, além de ser mais econômico em relação ao uso de reagentes e polímeros. É importante salientar que as membranas poliméricas têm grande potencial na construção de sensores flexíveis.

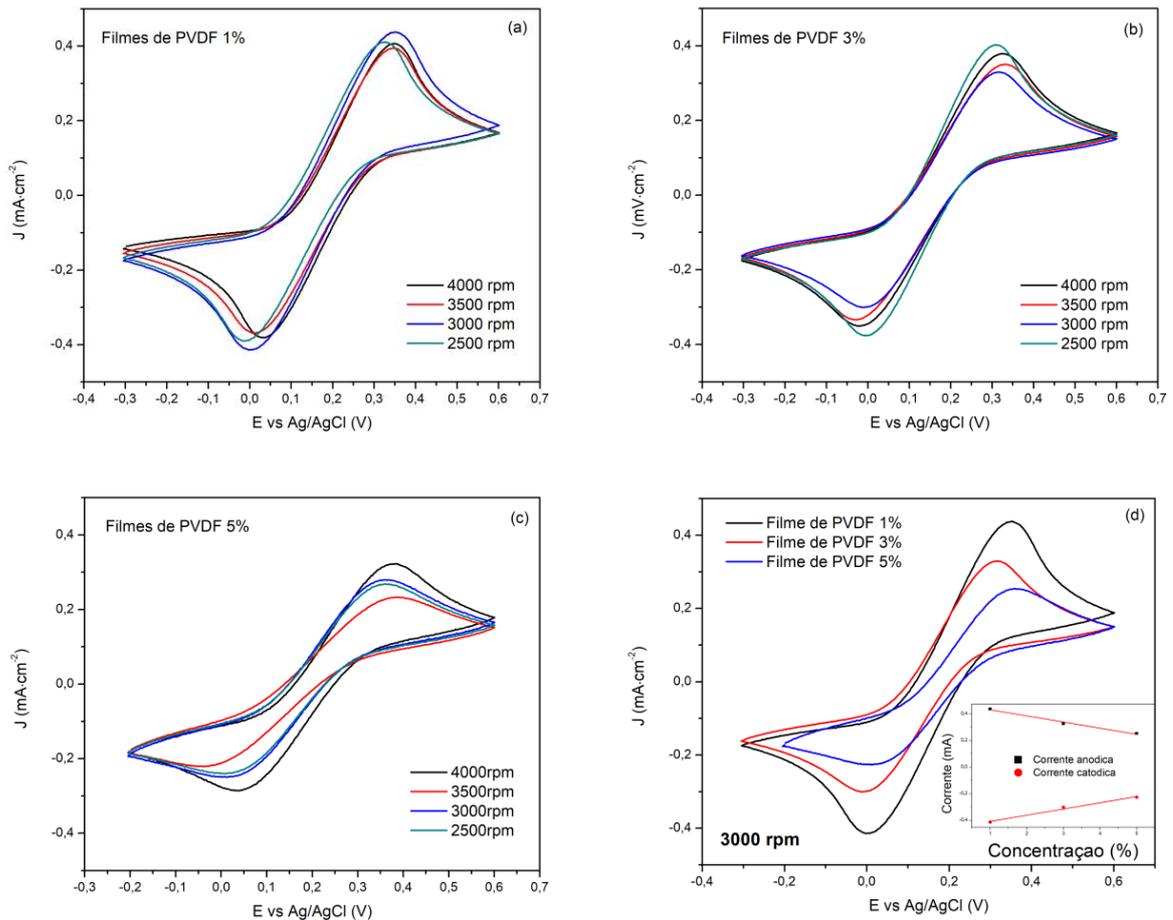


Figura 5-7. Voltamogramas cíclicos dos filmes de PVDF em concentrações de (a) 1%, (b) 3% e (c) 5% (m/m) obtidos em 2500, 3000, 3500 e 4000 rpm em 5,0 mmol/L de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  e 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) com velocidade de varredura de 0,05 V/s. Filmes de (d) PVDF/ITO em diferentes concentrações de PVDF obtidos em 3000 rpm. No *inset*, gráfico com retas das correntes anódica e catódica em 3000 rpm.

Foi realizado um estudo aprofundado e sistemático para otimização da obtenção dos eletrodos modificados com filmes de PVDF. Na Figura 5-7, são apresentados os voltamogramas cíclicos dos filmes de PVDF obtidos pela técnica de *spin coating* em diferentes concentrações (%m/m) de PVDF e, para cada concentração, foram obtidos voltamogramas cíclicos em

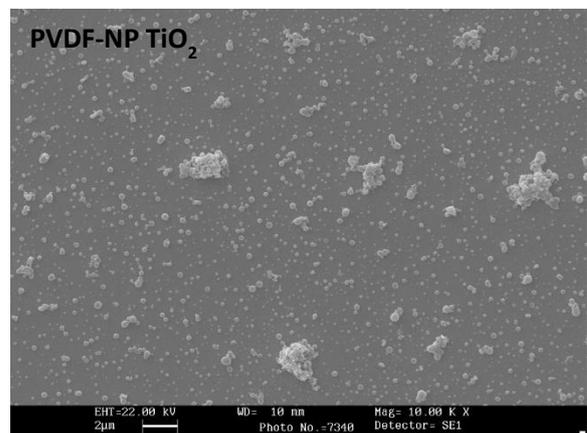
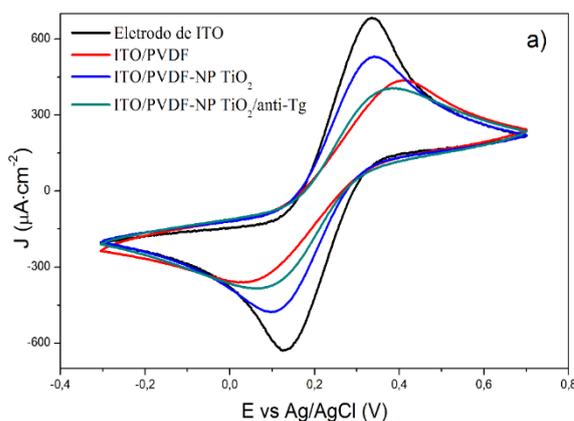
diferentes rotações por minuto (rpm) em 5,0 mmol/L de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  e 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4).

Nas Figuras 5-7 (a-c) não foram observadas tendências lineares entre os valores de corrente redox e a rotação por minuto em que os filmes foram produzidos. Mas, na Figura 5-7 (d), os voltamogramas cíclicos mostraram um comportamento linear entre os valores de corrente redox e as concentrações de PVDF. Visto que, o aumento da concentração de PVDF aumenta a resistividade dos filmes, consequentemente, os valores de corrente redox diminuem, devido ao aumento da resistência na transferência de elétrons. Tais resultados indicam que a sonda eletroquímica apresentou melhor perfil eletroquímico no filme de PVDF 1%.

No *inset* da Figura 5-7 (d), foi apresentado as equações da reta correspondente aos valores de corrente anódico  $i_{\text{oxi}} = -0,046 \cdot C + 0,478$  com  $r^2 = 0,978$  e aos valores de corrente catódico  $i_{\text{red}} = 0,0468 \cdot C - 0,454$  com  $r^2 = 0,975$ . C corresponde ao valor de concentração de PVDF em (m/m%).

### 5.3. Caracterização dos nanocompósitos de PVDF e imobilização de anti-Tg

Os filmes NCP à base de PVDF foram obtidos a partir do polímero PVDF 1% (m/m) com a incorporação de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  (PVDF-NP  $\text{TiO}_2$ ), de nanotubos  $\text{TiO}_2$  (PVDF-NT  $\text{TiO}_2$ ), de óxido de grafeno (PVDF-OxG) e de nanopartículas de ouro (PVDF-NP Au) usando *spin coating* com 3000 rpm/15s.



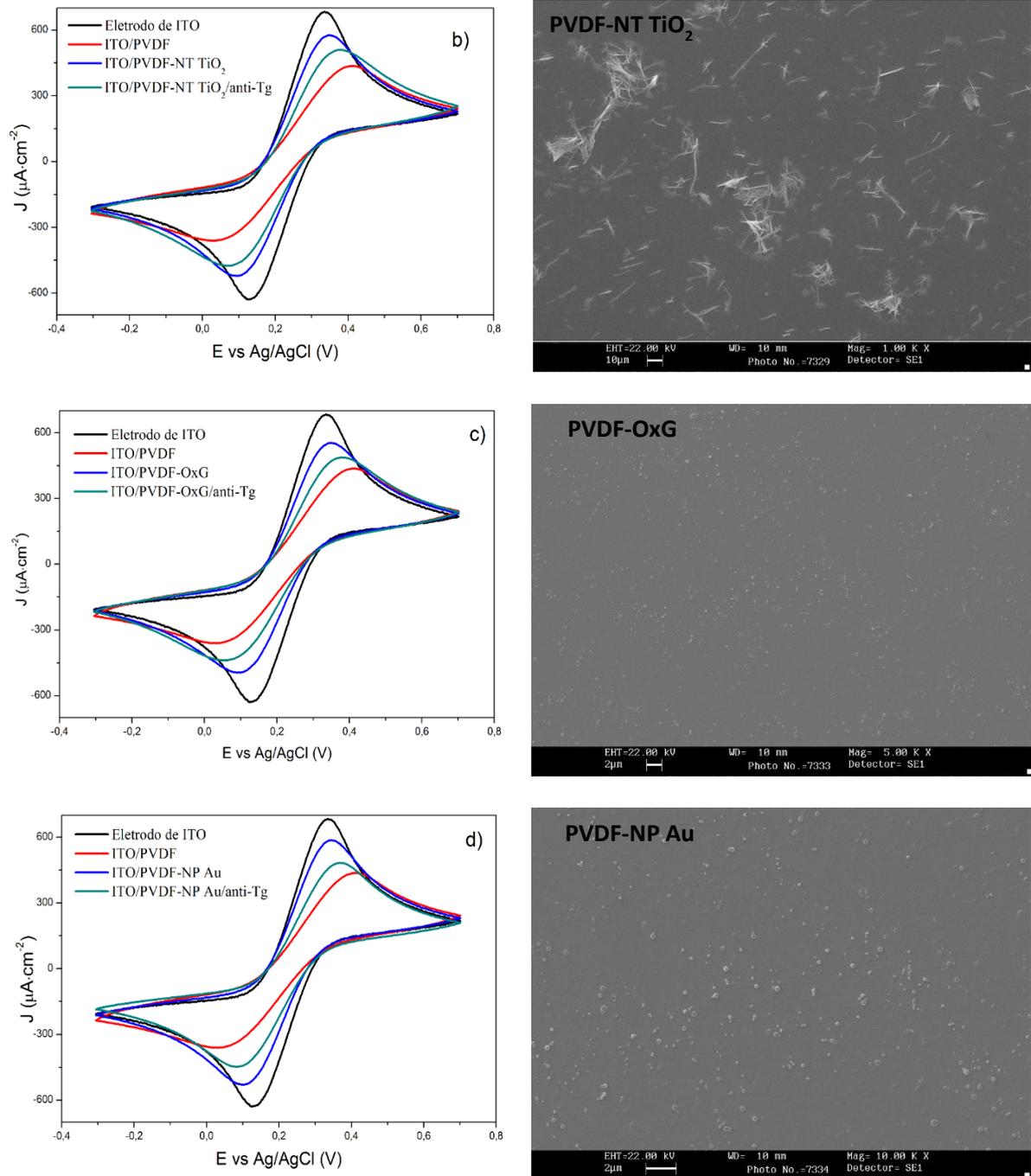


Figura 5-8. Voltamogramas cíclicos do processo de modificação e de imobilização de anti-Tg. Filmes de (a) PVDF-NP  $\text{TiO}_2$ , de (b) PVDF-NT  $\text{TiO}_2$ , de (c) PVDF-OxG e de (d) PVDF-NP Au em 5,0 mmol/L de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  e 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) com velocidade de varredura de 0,05 V/s. No lado direito, imagens de MEV correspondente aos NCP.

Para avaliar as propriedades elétricas e de biocompatibilidade foram obtidos voltamogramas cíclicos que encontram-se na Figura 5-8 (a-d) referentes aos processos de modificação do eletrodo do ITO e a imobilização dos anticorpos anti-Tg de cada filme NCP:

(a) PVDF-NP TiO<sub>2</sub>, (b) PVDF-NT TiO<sub>2</sub>, (c) PVDF-OxG e (d) PVDF-NP Au. No lado direito de cada voltamograma foram inseridas imagens de MEV da superfície dos respectivos filmes NCPs.

De forma geral, para analisar o processo de modificação dos eletrodos de ITO com os filmes nanocompósitos, as diferenças dos valores de corrente anódico foram convertidos em valores percentuais negativos indicando que houve uma diminuição de corrente anódica.

Na Tabela 5-1 encontra-se os valores de correntes e de potenciais redox, assim como, os valores percentuais negativos das correntes anódicas associadas ao processo de modificação do eletrodo e ao processo de imobilização.

Tabela 5-1. Valores de correntes, de potenciais anódico e catódico e de valores porcentuais de corrente anódico referentes aos nanocompósitos poliméricos depositados sobre ITO.

Nanocompósitos	E <sub>ano</sub>	E <sub>cat</sub>	i <sub>ano</sub> (μA)	i <sub>cat</sub> (μA)	i%
ITO	0,33	0,13	685,43	-627,43	--
PVDF	0,41	0,03	436,73	-361,51	-36,3
PVDF-NP TiO <sub>2</sub>	0,34	0,10	530,14	-477,13	-22,7
PVDF-NP TiO <sub>2</sub> /anti-Tg	0,38	0,06	404,03	-385,14	-41,1
PVDF-NT TiO <sub>2</sub>	0,37	0,09	575,83	-521,27	-16,0
PVDF-NT TiO <sub>2</sub> /anti-Tg	0,41	0,07	509,18	-475,16	-25,7
PVDF-OxG	0,35	0,09	553,97	-494,63	-19,2
PVDF-OxG/anti-Tg	0,37	0,06	485,74	-438,68	-29,1
PVDF-NP Au	0,34	0,10	584,78	-528,51	-14,7
PVDF-NP Au/anti-Tg	0,37	0,08	484,26	-448,26	-29,3

Fonte: Autor, 2019.

Após a deposição do filme de PVDF sobre o eletrodo de ITO observou-se uma redução de corrente anódica de -36,3%. Desta forma, o filme de PVDF apresentou uma alta resistividade na transferência de elétrons em sua interface como já esperado para um polímero

isolante. Quanto menor o valor de porcentagem referente à corrente anódica, maior a resistência na transferência de elétrons na superfície do eletrodo modificado.

Comparando os eletrodos de PVDF e os filmes nanocompósitos, os valores apresentaram uma leve redução nos valores percentuais de corrente anódica quando comparado com o eletrodo limpo de ITO. Quando comparado os valores de porcentagens de corrente anódica dos filmes NCPs com o filme de PVDF houve uma melhora significativa dos valores de corrente redox, indicando que a incorporação dos nanomateriais na matriz polimérica conferiu aos nanocompósitos, propriedades elétricas que favorecem a taxa de transferência de elétrons na interface eletrodo-solução.

Os valores percentuais de corrente anódica dos NCP mostram que o filme PVDF-NP TiO<sub>2</sub> apresentou uma maior resistividade com uma variação percentual de -22,7 % e o filme PVDF-NP Au apresentou uma maior condutividade com valor percentual de -14,7 %. A partir das imagens de MEV, observou-se que a superfície do filme PVDF-NP TiO<sub>2</sub> apresenta uma maior presença de particulados de TiO<sub>2</sub>, indicando que somente parte do material de TiO<sub>2</sub> está contribuindo internamente para os processos de transferência de elétrons dentro da matriz polimérica do nanocompósito obtido. Em contrapartida, o filme de PVDF-NP Au mostrou uma superfície menos rugosa, indicando uma melhor incorporação das nanopartículas de ouro dentro da matriz do polímero e, como efeito favorável, há uma relevante melhora na condutividade do filme PVDF-NP Au.

O processo de imobilização dos anticorpos anti-Tg sobre os nanocompósitos foi acompanhado por uma diminuição dos valores de corrente redox, e também, por um aumento na diferença entre os potenciais redox indicando, desta forma, que a presença dos anticorpos aumenta a resistividade à transferência de elétrons na interface dos eletrodos modificados. Neste caso, quanto maior o valor percentual negativo da corrente anódica observada, mais

anticorpos anti-Tg foram imobilizados sobre a superfície dos filmes NCP. O efeito de passivação do eletrodo modificado com NCP ocorre por impedimento estérico dos anticorpos anti-Tg onde os íons da sonda eletroquímica encontram dificuldade para alcançar a superfície do eletrodo.

A imobilização do anti-Tg sobre o filme de PVDF-NP TiO<sub>2</sub> apresentou o valor percentual de corrente anódica de -41,1 %, demonstrando que a presença dos particulados de TiO<sub>2</sub> na superfície do nanocompósito favoreceu consideravelmente a ancoragem dos anticorpos, sendo o material mais biocompatível. A imagem de MEV do filme de PVDF-NP TiO<sub>2</sub> mostra claramente uma distribuição aleatória de particulados de TiO<sub>2</sub> com formato esférico de diâmetros diferentes e aglomerados recobrando a superfície do nanocompósito polimérico que favorecem a ancoragem e imobilização dos anticorpos anti-Tg.

Em contrapartida, a imobilização dos anti-Tg sobre o filme de PVDF-NT TiO<sub>2</sub> apresentou uma redução de -16,0 % de corrente de pico anódico, indicando uma menor eficiência na ancoragem dos anticorpos nas estruturas de TiO<sub>2</sub>, apesar da imagem de MEV mostrar uma grande distribuição de sólidos em formato de tubos de TiO<sub>2</sub>. A composição e a estrutura cristalina presente nos nanomateriais de NP TiO<sub>2</sub> e NT TiO<sub>2</sub> são diferentes e podem ter influenciado na imobilização dos anticorpos anti-Tg. A outra possibilidade é que o efeito fotocatalítico dos NT TiO<sub>2</sub> tenha impedido a interação dos anticorpos anti-Tg sobre a superfície do NCP.

As NPs TiO<sub>2</sub> apresentam as fases cristalinas bem descritas na literatura: anatásio e rutilo e geralmente, este nanomaterial apresenta vacâncias de oxigênio e um alto rendimento de hidroxilas e, tais características, favorecem a imobilização de espécies orgânicas (KIM, et. al., 2009). Os filmes de PVDF-OxG e de PVDF-NP Au apresentaram bons resultados quanto a condutividade do nanocompósito obtido e a imobilização de anticorpos anti-Tg.

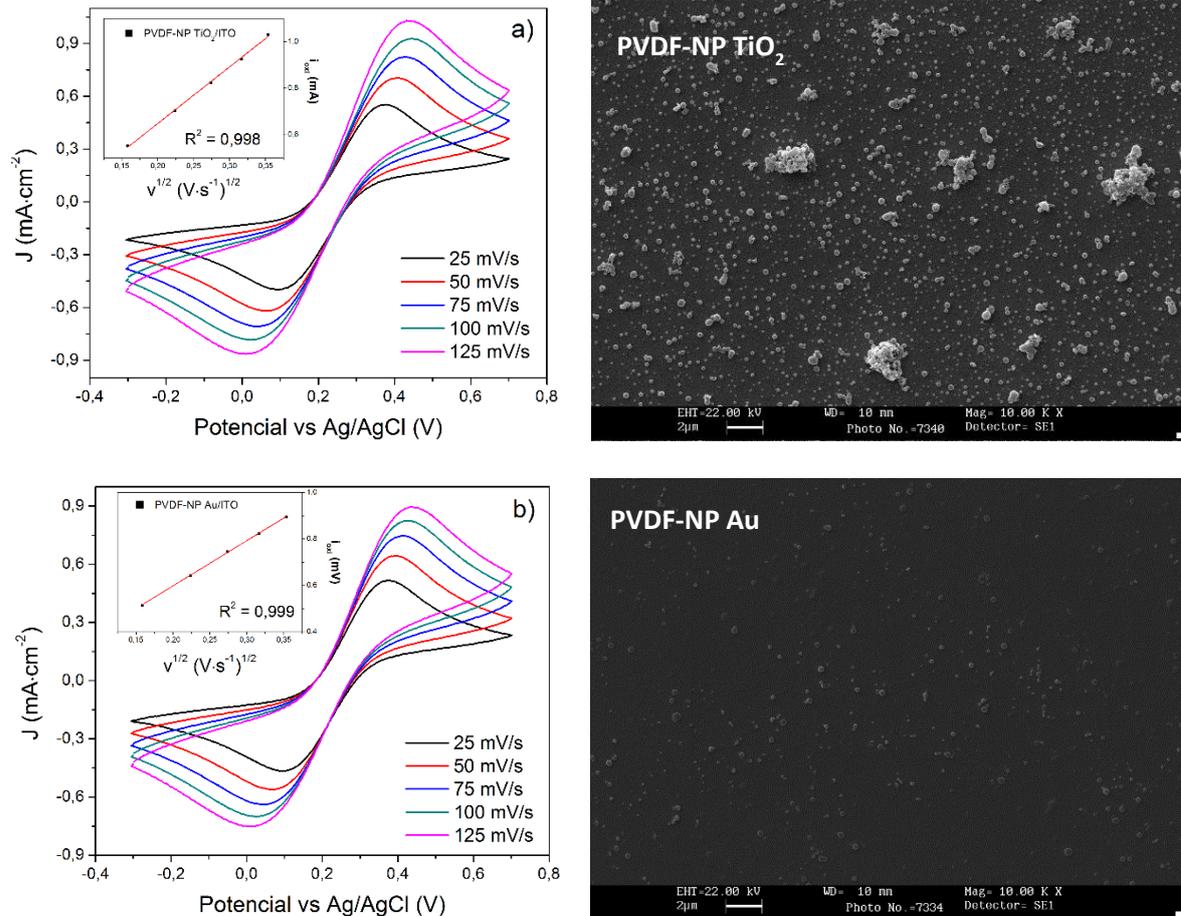


Figura 5-9. Estudo de variação de velocidade de varredura do PVDF-NP TiO<sub>2</sub>/ITO/vidro (a) e do PVDF-NP Au/ITO/vidro (b) obtidos em 5,0 mmol/L de [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> e 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) com velocidade de varredura de 0,05 V/s. *Inset*, curva de regressão linear  $i_{\text{oxi}} \times v^{1/2}$ . Ao lado direito, imagens de MEV dos nanocompósitos correspondentes.

A Figura 5-9 apresenta o estudo de variação de velocidade de varredura de potencial dos filmes de PVDF-NP TiO<sub>2</sub> e de PVDF-NP Au e as imagens de MEV dos respectivos filmes nanocompósitos. A transferência de elétrons na interface dos filmes nanocompósitos citados varia em diferentes velocidades de varredura, onde a diferença entre os potenciais redox aumenta simultaneamente, desta forma, indicando os filmes não apresentaram uma boa reversibilidade eletroquímica. Somente o filme PVDF-NP TiO<sub>2</sub> mostrou que nas velocidades de varredura de 100 e 125 mV/s, os potenciais de corrente de pico não variam em função da velocidade de varredura, indicando que a partir 100 mV/s os processos eletroquímicos são reversíveis.

No *inset* da Figura 5-9 (a-b), foi apresentado os valores de corrente de pico anódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v^{1/2}$ ), onde observa-se uma variação proporcional expressa nas seguintes equações da reta,  $i_{\text{oxi}} = 2,43 \times 10^{-3} \cdot v^{1/2} + 2,0 \times 10^{-4}$  (PVDF-NP TiO<sub>2</sub>) e  $i_{\text{oxi}} = 1,95 \times 10^{-3} \cdot v^{1/2} + 2,0 \times 10^{-4}$  (PVDF-NP Au). Desta forma, foi caracterizado que o processo de transferência de massa que ocorre na superfície dos eletrodos modificados é controlado por difusão das espécies eletroativas. Aplicando a fórmula de *Randles-Sevcik* e o coeficiente angular das curvas obtidas no estudo de variação de velocidade de varredura de potencial foram estimadas as áreas eletroativas presentes nos filmes de PVDF-NP TiO<sub>2</sub> e de PVDF-NP Au, onde os valores obtidos são iguais a  $0,70 \pm 0,011 \text{ cm}^2$  e  $0,55 \pm 0,002 \text{ cm}^2$ , respectivamente. Os valores obtidos são menores do que o valor médio da área geométrica do eletrodo de ITO em contato com a solução eletroquímica ( $0,73 \pm 0,1 \text{ cm}^2$ ), indicando que algumas regiões dos eletrodos modificados não apresentam atividade eletroquímica.

As imagens de MEV obtidas das superfícies dos filmes PVDF-NP TiO<sub>2</sub> e PVDF-NP Au apresentam particulados em formas isoladas e aglomeradas. Como já foi relatado, o filme PVDF-NP TiO<sub>2</sub> apresenta uma superfície com muitos particulados e aglomerados que resulta em um maior volume de imperfeições superficiais e, conseqüentemente, há um aumento na rugosidade superficial do filme. No entanto, o filme de PVDF-NP Au quando comparado com PVDF-NP TiO<sub>2</sub> apresenta uma superfície mais suave, com poucos particulados e sem poros, logo, a presença de imperfeições superficiais é menor, assim como, sua rugosidade superficial. Estas observações estão de acordo com os valores de área eletroativa calculados para o filme PVDF-NP TiO<sub>2</sub>, que apresentou maior valor com  $0,70 \pm 0,04 \text{ cm}^2$  e para o filme de PVDF-NP Au que apresentou o valor de  $0,55 \pm 0,01 \text{ cm}^2$ .

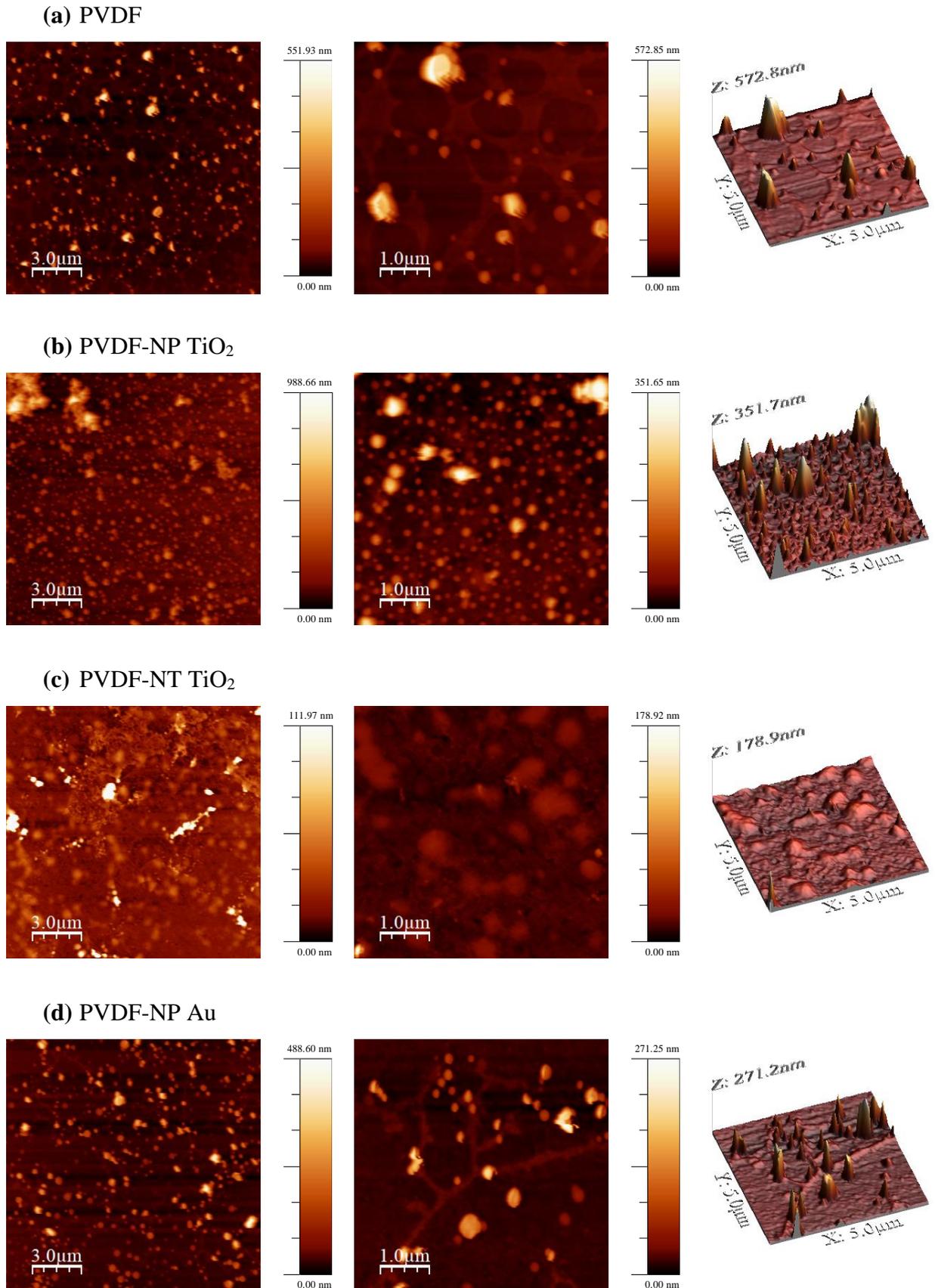


Figura 5-10. Imagens topográficas de AFM obtidas em 15x15  $\mu\text{m}$  e em 5x5  $\mu\text{m}$  2D e em 3D para (a) PVDF, (b) PVDF-NP-TiO<sub>2</sub>, (c) PVDF-NT-TiO<sub>2</sub>, (d) PVDF-NP-Au.

As análises topográficas foram realizadas para os filmes dos nanocompósitos poliméricos a fim de observar os nanomateriais dispersos na superfície que agem como regiões ativas para a imobilização dos anticorpos anti-Tg (Figura 5-10). As imagens topográficas do PVDF foram obtidas para comparar com as modificações superficiais após a incorporação das nanoestruturas de  $\text{TiO}_2$  e de ouro. Na Figura 5-10 (a) com escala de  $3 \mu\text{m}$ , observa-se uma distribuição de pontos claros com altura máxima de  $551,93 \text{ nm}$  entre regiões escuras de formato circular (contraste mais escuro), indicando depressões superficiais que podem ser observadas com mais detalhes na Figura 5-10 (a) com escala de  $1 \mu\text{m}$  e imagem 3D.

A Figura 5-10 (b) com escala de  $3 \mu\text{m}$  para PVDF-NP  $\text{TiO}_2$  apresentou uma distribuição homogênea de pontos claros com a presença de grandes agregados com altura máxima de  $988,66 \text{ nm}$ , indicando a presença de clusters de NP  $\text{TiO}_2$ . A imagem topográfica com escala de  $1 \mu\text{m}$  mostrou com maior definição que os pontos claros tem um formato circular esperado para aglomerados de  $\text{TiO}_2$  e não foi observado a presença de depressões (imagem 3D).

A Figura 5-10 (c) com escala de  $3 \mu\text{m}$  mostrou uma superfície complexa sem uniformidade com altura máxima de  $111,97 \text{ nm}$  para o filme de PVDF com nanotubos de  $\text{TiO}_2$ . Detalhes na Figura 5-10 (c) com escala  $1 \mu\text{m}$  e imagem 3D mostram picos arredondados com distribuição não-homogênea. A Figura 5-10 (d) mostra a topografia para PVDF-NP Au, onde se observa alguns pontos claros com altura máxima de  $488,60 \text{ nm}$  para cluster de nanopartículas de ouro semelhante ao observado no filme de PVDF-NP  $\text{TiO}_2$ . As imagens com escala de  $1 \mu\text{m}$  e imagem 3D da Figura 5-10 (d) mostram estruturas fibrosas entre as nanopartículas de ouro.

Tabela 5-2. Valores de rugosidade média ( $R_a$ ) e correntes anódicas ( $i_a$ ) para PVDF-NP-TiO<sub>2</sub>, PVDF-NT-TiO<sub>2</sub> e PVDF-NP-Au.

<b>Rugosidade média, <math>R_a</math></b>		
PVDF-NP TiO <sub>2</sub>	PVDF-NT TiO <sub>2</sub>	PVDF-NP Au
52,39 nm	5,32 nm	21,88 nm
<b>Passivação de corrente anódica, <math>i_a</math></b>		
anti-Tg/PVDF-NP TiO <sub>2</sub>	anti-Tg/PVDF-NT TiO <sub>2</sub>	anti-Tg/PVDF-NP Au
-41,1%	-25,7%	-29,3%

Fonte: Autor, 2019.

Na Tabela 5-2, pode-se observar que o eletrodo de PVDF-NP TiO<sub>2</sub> apresentou um valor de rugosidade de 52,39 nm e -41,1 % de passivação, o PVDF-NP Au apresentou 21,88 nm de rugosidade e -29,3 % de passivação e o PVDF-NT TiO<sub>2</sub> apresentou 5,32 nm de rugosidade e -25,7 % de passivação indicando claramente que o aumento da rugosidade superficial favorece a imobilização dos anticorpos anti-Tg. As nanoestruturas de TiO<sub>2</sub> e de ouro são regiões polares distribuídas sobre a superfície do PVDF como já apresentado e discutido a partir dos resultados de ângulo de contato e micrografia de MEV.

#### 5.4. Caracterização e validação dos imunossensores para Tireoglobulina

Foram obtidas respostas eletroquímicas dos ensaios de incubação com diferentes filmes nanocompósitos com objetivo de avaliar a imobilização dos anticorpos anti-Tg:

- (i) NCP/anti-Tg = imobilização de anticorpos anti-Tg sobre nanocompósitos poliméricos (NCP com NP TiO<sub>2</sub>, NT TiO<sub>2</sub>, OxG e NP Au);
- (ii) NCP/MP/anti-Tg = imobilização das estreptavidina (MP) sobre o NPC, seguida da imobilização dos anticorpos anti-Tg;
- (iii) NCP-MP/anti-Tg = adição da estreptavidina na matriz NCP polimérica, seguida da imobilização dos anticorpos anti-Tg.

Os testes de imobilização dos anticorpos anti-Tg foram realizados por meio de incubação da Tg sobre os filmes NCP e a detecção de Tg foi acompanhada por voltametria de

onda quadrada (VOQ). Os ensaios de VOQ apresentados são referentes aos filmes PVDF-NP Au depositados sobre eletrodo de ouro nos quais os resultados obtidos foram semelhantes para todos os NCP obtidos.

A Figura 5-11 mostra as respostas eletroquímicas da imobilização de anti-Tg feita diretamente sobre a superfície do filme PVDF-NP Au (nomeado como PVDF-NP Au/anti-Tg). Posteriormente, diferentes concentrações de Tg foram depositados sobre o filme PVDF-NP Au/anti-Tg.

Foi observado que os valores de corrente de pico anódico não apresentaram uma correlação linear com as concentrações de Tg, indicando que após a formação do complexo imunológico sobre o filme de ITO/PVDF-NP Au/anti-Tg/Tg apresenta interações fracas do tipo eletrostática.

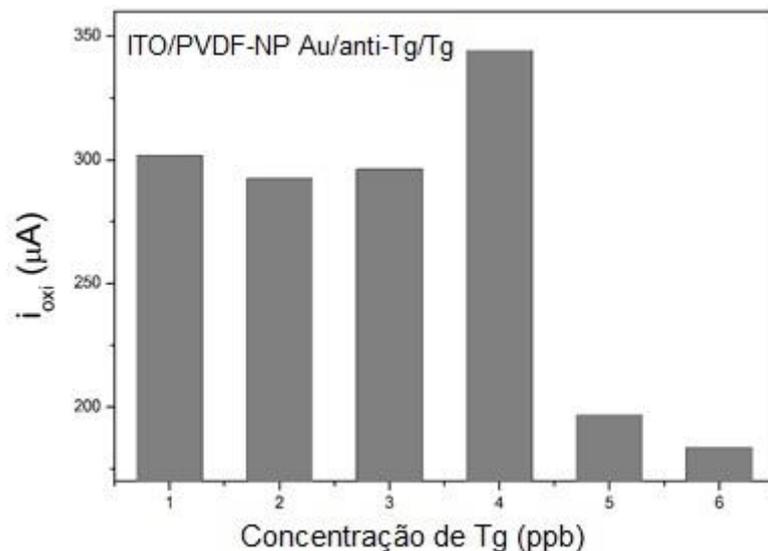


Figura 5-11. Teste de imobilização de anti-Tg empregando o eletrodo modificado ITO/PVDF-NP Au/anti-Tg/Tg em 5,0 mmol/L de  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  e 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) com velocidade de varredura de 0,05 V/s.

Na Figura 5-12, o segundo teste de imobilização dos anti-Tg foi realizado empregando o método de detecção estreptavidina-biotina onde a estreptavidina encontra-se revestindo micropartículas magnéticas e a biotina encontra-se ligada ao domínio do anti-Tg. As

micropartículas revestidas com estreptavidina foram imobilizadas diretamente sobre o filme de PVDF-NP Au (nomeado como PVDF-NP Au/MP), posteriormente, os anticorpos anti-Tg foram imobilizados sobre o PVDF-NP Au/MP (nomeado como PVDF-NP Au/MP/anti-Tg).

O processo de incubação foi feito com diferentes concentrações de Tg sobre o filme PVDF-NP Au/MP/anti-Tg, porém não foi observada uma dependência linear entre os valores de corrente de pico anódico e as concentrações de Tg incubadas. Os resultados sugerem que a interação da estreptavidina com a superfície do filme PVDF-NP Au pode apresentar interações de natureza eletrostática, desta forma, assim que o complexo anti-Tg/Tg é formado pode ocorrer o enfraquecimento da ligação entre MP e as NP Au.

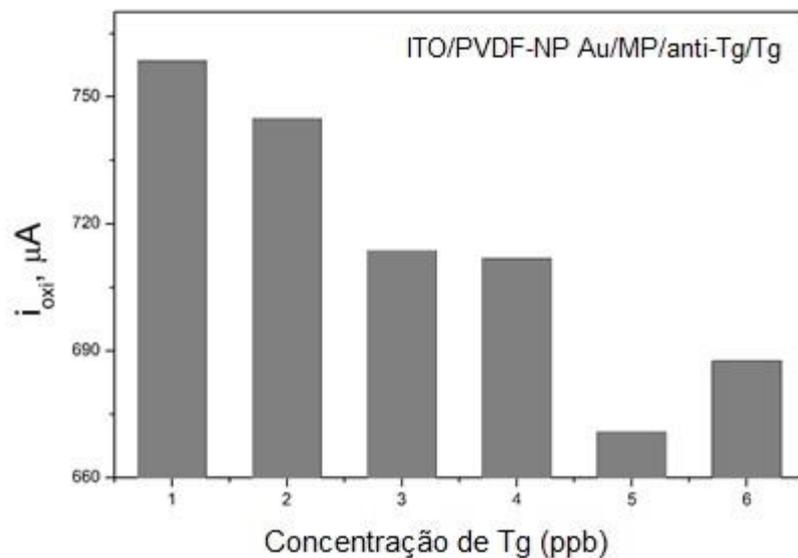


Figura 5-12. Teste de imobilização de anti-Tg empregando o eletrodo modificado ITO/PVDF-NP Au/MP/anti-Tg/Tg em 5,0 mmol/L de  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  e 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) com velocidade de varredura de 0,05 V/s.

No terceiro teste de imobilização de anti-Tg, também foi empregando o sistema estreptavidina-biotina onde a estreptavidina foi incorporado à matriz polimérica do PVDF-NP Au (nomeado PVDF-NP Au-MP). Antes, foi necessário ajustar a concentração de PVDF como mostra a Figura 5-13 onde um estudo de concentração das soluções de PVDF 0,2%, 0,5% e 1,0% é apresentado. Nos estudos anteriores, os filmes de PVDF 1,0% com NP Au foram

depositados sobre eletrodos de ITO (10x70 mm) empregando o método *spin coating*; neste, os filmes de PVDF 1,0%, 0,5% e 0,2% foram depositados por *casting* sobre eletrodos de bastão de ouro (1,6 mm diâmetro) em temperatura ambiente.

Os voltamogramas obtidos apresentaram uma correlação linear indireta entre os valores de correntes de pico redox e as concentrações das soluções de PVDF, enquanto que o diagrama de *Nyquist* (no *inset* da Figura 5-13) indicou que a resistividade do filme de PVDF 0,2% diminuiu significativamente, favorecendo a transferência de carga e, conseqüentemente, apresentando um melhor perfil eletroquímico quando comparado com os demais.

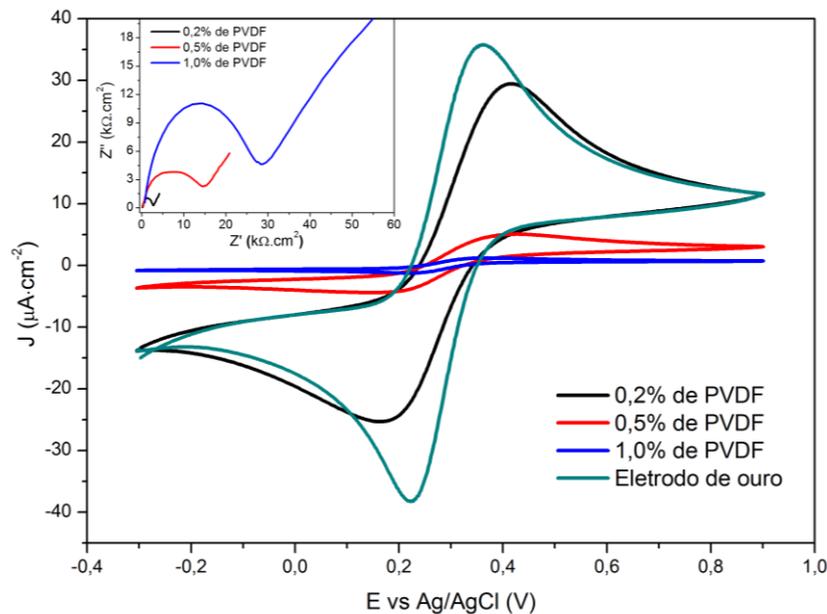


Figura 5-13. Voltamogramas cíclicos dos filmes de PVDF em diferentes concentrações (m/m%). *Inset*: diagrama de Nyquist dos filmes de PVDF 0,2%, 0,5%, 1,0% em 5,0 mmol/L de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  e 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) com velocidade de varredura de 0,05 V/s.

Desta forma, os anticorpos anti-Tg foram imobilizados sobre o filme de PVDF-NP Au-MP depositado por *casting* sobre eletrodo de ouro. Na Figura 5-14, é mostrado o teste de imobilização onde observa-se que após a incubação da Tg em diferentes concentrações, os valores de corrente de oxidação diminuem gradativamente à medida que a concentração de Tg aumenta, revelando uma dependência linear entre estes dois parâmetros.

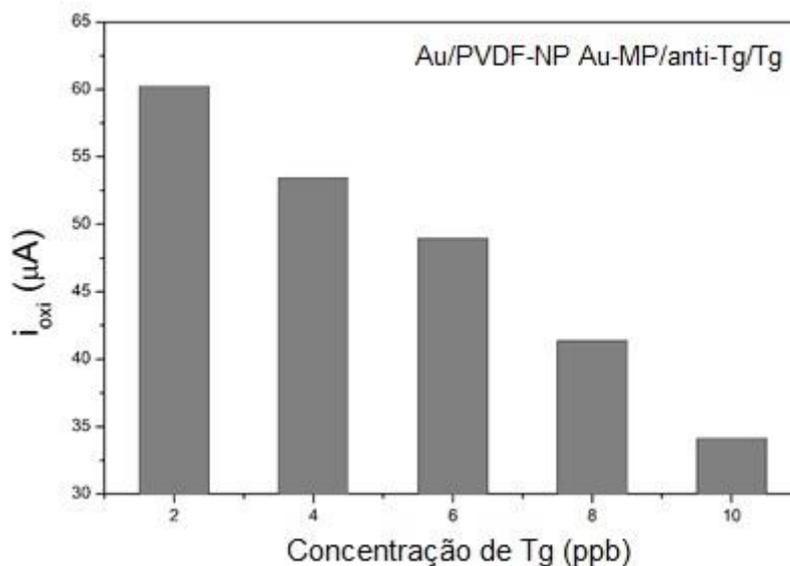


Figura 5-14. Teste de imobilização de anti-Tg empregando o eletrodo modificado Au/PVDF-NP Au-MP/anti-Tg/Tg em 5,0 mmol/L de  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  e 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) com velocidade de varredura de 0,05 V/s.

A incorporação da estreptavidina na solução polimérica de PVDF-NP Au proporcionou ao filme NCP-MP a capacidade de realizar ligações covalente entre a estreptavidina presente no filme nanocompósito e a biotina ligada ao anti-Tg, propiciando a formação eficaz do complexo anti-Tg/Tg. A incorporação das MPs no filme nanocompósito mostrou-se ser o melhor método de imobilização de anti-Tg para detecção eficaz de Tg, promovendo uma melhora significativa na resposta dos imunossensores obtidos.

A seguir, caracterizações químicas e morfológicas serão apresentadas para os componentes e os filmes de PVDF-NP  $TiO_2$ -MP, PVDF-NT  $TiO_2$ -MP, PVDF-OxG-MP e PVDF-NP Au-MP, visto que apresentaram os melhores resultados na detecção de Tg quando aplicado como suporte de imobilização de anti-Tg para determinação de Tg.

A Figura 5-15 mostra os espectros de FTIR do filme de PVDF e dos filmes de nanocompósitos poliméricos PVDF-NP  $TiO_2$ , PVDF-NT  $TiO_2$ , PVDF-OxG e PVDF-NP Au, confirmando a síntese dos nanocompósitos e sua interação dentro da matriz polimérica do PVDF.

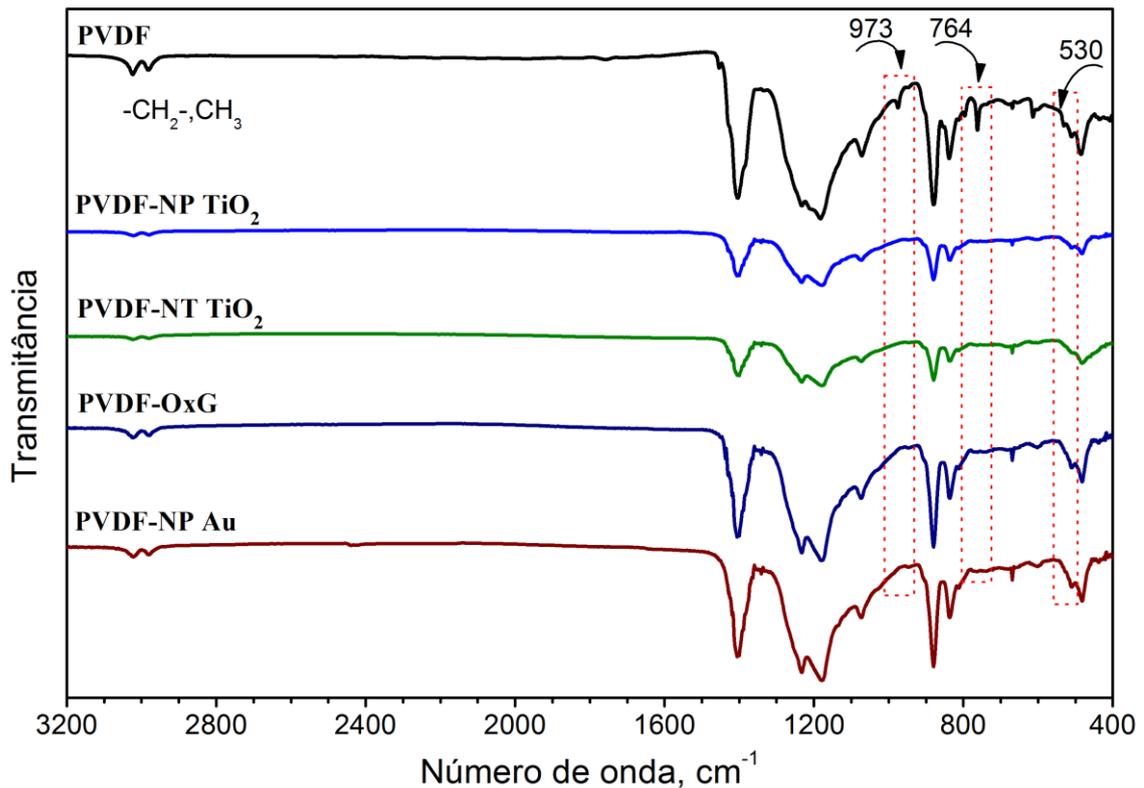


Figura 5-15. Espectros de FTIR dos filmes de PVDF, PVDF-NP TiO<sub>2</sub>, PVDF-NT TiO<sub>2</sub>, PVDF-OxG e PVDF-NP Au.

No espectro IV do filme de PVDF foram observadas as principais bandas vibracionais. O estiramento do grupo molecular  $\nu(\text{C-F}_2)$  foi atribuída à banda vibracional em  $1181 \text{ cm}^{-1}$  e o estiramento do grupo molecular  $\nu(\text{C-H}_2)$  foi atribuída à banda vibracional em  $1404 \text{ cm}^{-1}$ . Também, as bandas vibracionais em  $2982 \text{ cm}^{-1}$  e  $3025 \text{ cm}^{-1}$  foram atribuídas aos estiramentos de  $\nu(\text{CH}_2/\text{CH}_3)$  presentes na cadeia do polímero de PVDF (GONZAGA, 2014; WANG, et. al., 2014). Foram identificadas as fases cristalinas  $\alpha$  e  $\beta$  do PVDF onde a presença da banda vibracional em  $764 \text{ cm}^{-1}$  foi atribuída à flexão  $\delta(\text{CF}_2)$  da cadeia primária do polímero, a banda em  $795 \text{ cm}^{-1}$  foi atribuída ao modo vibracional balanço do  $r(\text{CH}_2)$ , a banda em  $874 \text{ cm}^{-1}$  e  $975 \text{ cm}^{-1}$  estão associadas a uma fase  $\alpha$  e a banda vibracional em  $838 \text{ cm}^{-1}$   $r(\text{CH}_2)$ , em  $511 \text{ cm}^{-1}$   $\delta(\text{CF}_2)$ ,  $443 \text{ cm}^{-1}$  ( $r\text{CF}_2 + r\text{CH}_2$ ) corresponde à fase  $\beta$ . O comparativo entre os espectros de absorção IV demonstrou que as principais bandas vibracionais do PVDF estão presentes nos materiais nanocompósitos poliméricos obtidos.

Os espectros de FTIR correspondentes aos filmes PVDF-NP TiO<sub>2</sub>, PVDF-NT TiO<sub>2</sub>, PVDF-OxG e PVDF-NP Au apresentaram bandas vibracionais semelhantes entre si. Após a incorporação dos nanomateriais na matriz do PVDF não foi observada a presença das bandas vibracionais em 973 cm<sup>-1</sup>, 764 cm<sup>-1</sup> e 530 cm<sup>-1</sup> indicando que a presença das nanoestruturas interfere nos movimentos vibracionais correspondentes à fase cristalina  $\alpha$ . Portanto, os resultados mostraram que as nanoestruturas interagem em regiões específicas da fase cristalina  $\alpha$  dentro da matriz do PVDF sem reduzir o teor de cristalização da fase  $\beta$ .

Na Figura 5-16, é apresentada uma imagem de MEV de micropartículas de óxido de ferro revestida com estreptavidina (MPs), onde foi possível observar estruturas esféricas bem definidas com sulcos na superfície, podendo indicar que houve processo de aglutinação entre as estruturas de MPs. As estruturas de MPs observadas apresentaram um diâmetro médio de  $2,03 \pm 0,02 \mu\text{m}$ .

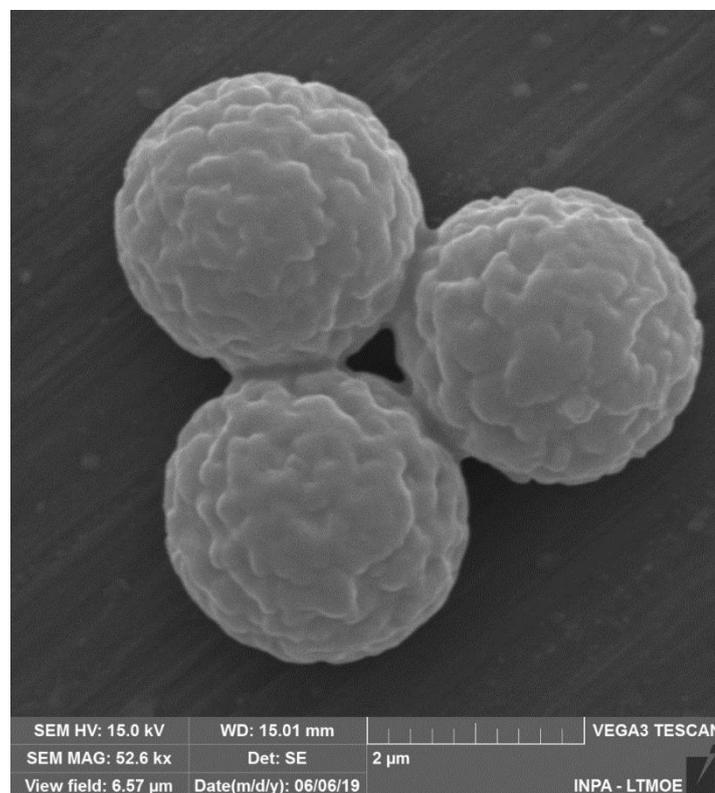


Figura 5-16. Imagem de MEV das micropartículas de óxido de ferro revestidas com estreptavidina (MPs).

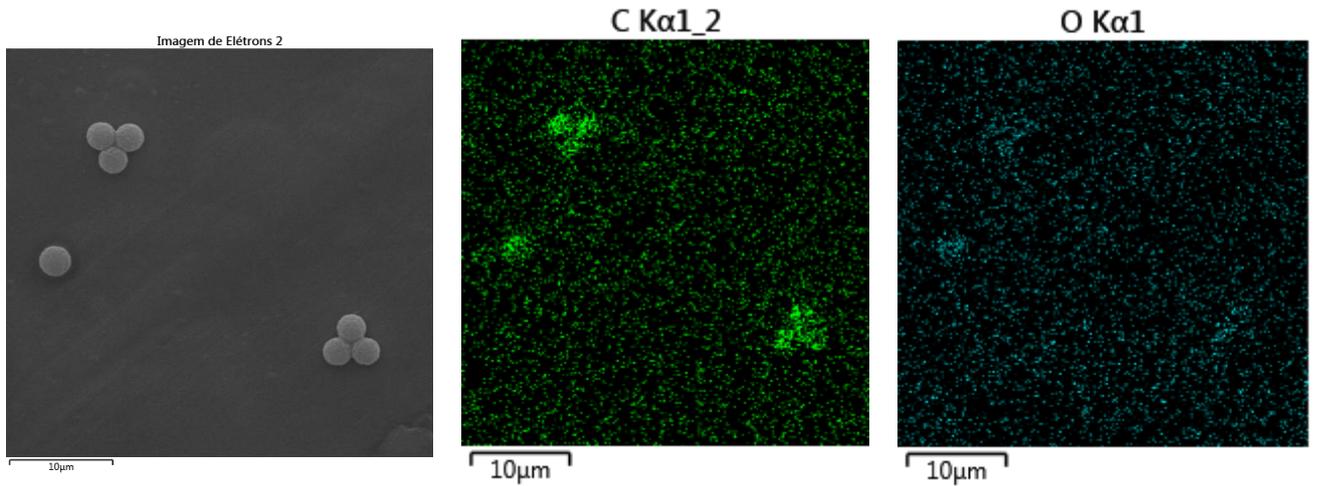
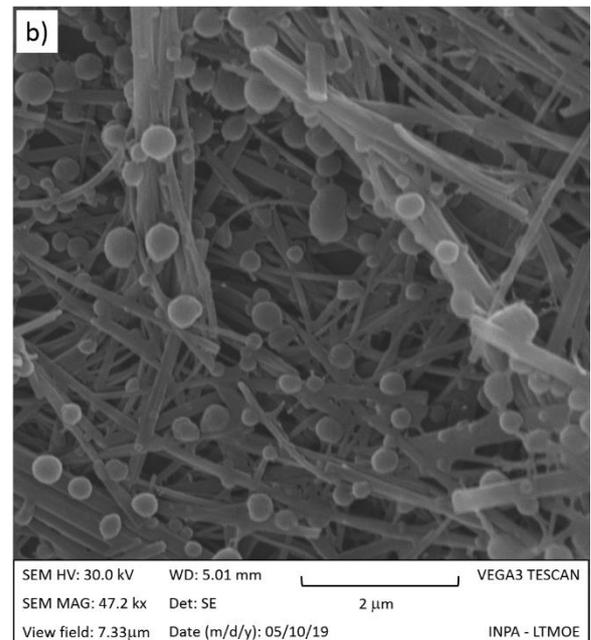
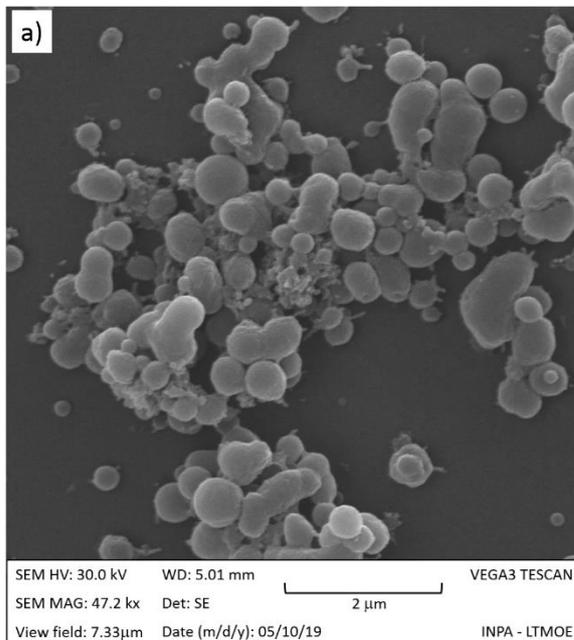


Figura 5-17. Mapeamento elementar por dispersão de raio-X para micropartícula de óxido de ferro revestido com estreptavidina (MPs).

Na Figura 5-17, o mapeamento elementar avaliou a distribuição dos elementos químicos presentes na superfície das MPs. Note que na região analisada os elementos carbono e oxigênio encontram-se homogeneamente distribuídos nas MPs.



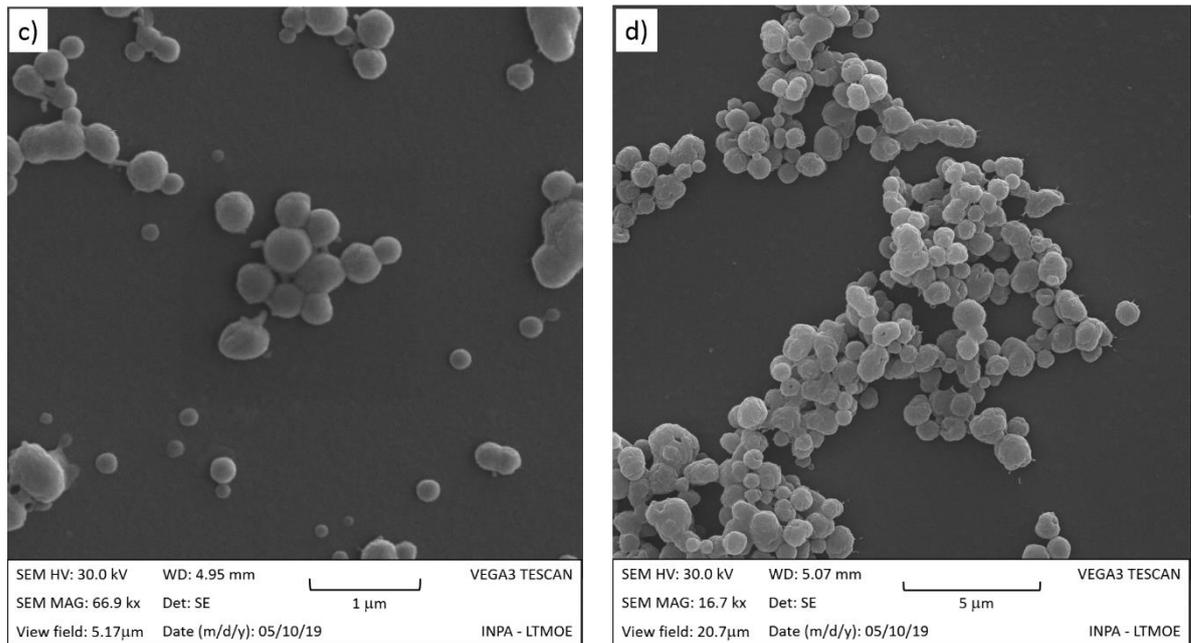


Figura 5-18. Imagens de MEV dos filmes (a) PVDF-NP TiO<sub>2</sub>-MP, (b) PVDF-NT TiO<sub>2</sub>-MP, (c) PVDF-OxG-MP e (d) PVDF-NP Au-MP.

Na Figura 5-18, são apresentadas as imagens de MEV dos filmes de PVDF-NP TiO<sub>2</sub>-MP, PVDF-NT TiO<sub>2</sub>-MP, PVDF-OxG-MP e PVDF-NP Au-MP para verificar a formação dos filmes e a interação com os MPs. Notoriamente, observa-se uma redução substancial do diâmetro médio das MPs após sua incorporação nos filmes nanocompósitos.

No filme de PVDF-NP TiO<sub>2</sub>-MP, é possível distinguir as nanopartículas de TiO<sub>2</sub> e as micropartículas revestidas com estreptavidina, principalmente pelo formato e diâmetro das estruturas. Nota-se que os particulados de TiO<sub>2</sub> atuam como agente de aglutinação, devido à propriedade de bioafinidade do TiO<sub>2</sub> formando aglomerações de MPs sobre o filme polimérico. Após a adição das MPs, o diâmetro médio diminuiu consideravelmente com valor médio de  $0,346 \pm 0,113 \mu\text{m}$  apresentou um tamanho mínimo de  $0,15 \mu\text{m}$  e tamanho máximo de  $0,77 \mu\text{m}$ . Foi observado, também, que algumas MPs apresentaram um formato não-geométrico indicando que houve junção de dois ou mais MPs.

O filme de PVDF-NT TiO<sub>2</sub>-MP apresentou estruturas tubulares que também agem como regiões de ancoragem para as MPs onde o diâmetro médio foi de  $0,251 \pm 0,102 \mu\text{m}$  com tamanho mínimo de  $0,08 \mu\text{m}$  e tamanho máximo de  $0,54 \mu\text{m}$  das MPs. No filme de PVDF-OxG-MP observou-se o tamanho mínimo de  $0,08 \mu\text{m}$  e tamanho máximo de  $0,51 \mu\text{m}$  com diâmetro médio de  $0,233 \pm 0,091 \mu\text{m}$  sobre a superfície de PVDF, enquanto no filme de PVDF-NP Au-MP, as MPs com diâmetro médio de  $0,706 \pm 0,235 \mu\text{m}$  em uma faixa de  $0,18 \mu\text{m}$  a  $1,57 \mu\text{m}$ .

A adição das MPs nos filmes nanocompósitos poliméricos diminuiu o tamanho das MPs que isoladamente apresentaram um diâmetro de  $2 \mu\text{m}$ . A distribuição das MPs indica uma baixa afinidade das proteínas de estreptavidina dentro das soluções poliméricas uma vez que é observado uma grande quantidade de MPs na superfície dos filmes nanocompósitos. Pode-se também, supor que a natureza das nanoestruturas pode influenciar no tamanho das MPs presentes na superfície dos nanocompósitos.

A fim de verificar a presença das MPs na superfície dos filmes NCP à base PVDF e sua influência na matriz do PVDF, foram obtidos espectros de XPS do C1s e F1s em alta resolução.

Na Figura 5-19 são apresentados os espectros de XPS do C1s para os filmes de PVDF, PVDF-NP TiO<sub>2</sub>-MP e PVDF-NPAu-MP. Foi realizado a deconvolução dos espectros em quatro curvas gaussianas. Para o filme de PVDF, a primeira curva gaussiana centrada em  $284,8 \text{ eV}$  foi atribuída à ligação C-C correspondente ao grupo molecular C-CH<sub>2</sub> e a quarta curva gaussiana centrada em  $290,9 \text{ eV}$  foi atribuída à ligação C-F do grupo molecular C-CF<sub>2</sub>. Estes dois grupos moleculares pertencem à estrutura molecular do PVDF (HE et al., 2014; TAO; LIU; XUE, 2012). No espectro XPS do C1s do PVDF, também foi observado mais duas curvas gaussianas centradas em  $286,3 \text{ eV}$  e  $287,8 \text{ eV}$  referentes às ligações C-N e C-O, respectivamente, advindas do solvente dimetilformamida (DMF) utilizada na dissolução do polímero PVDF (MYHRE et al., 2018).

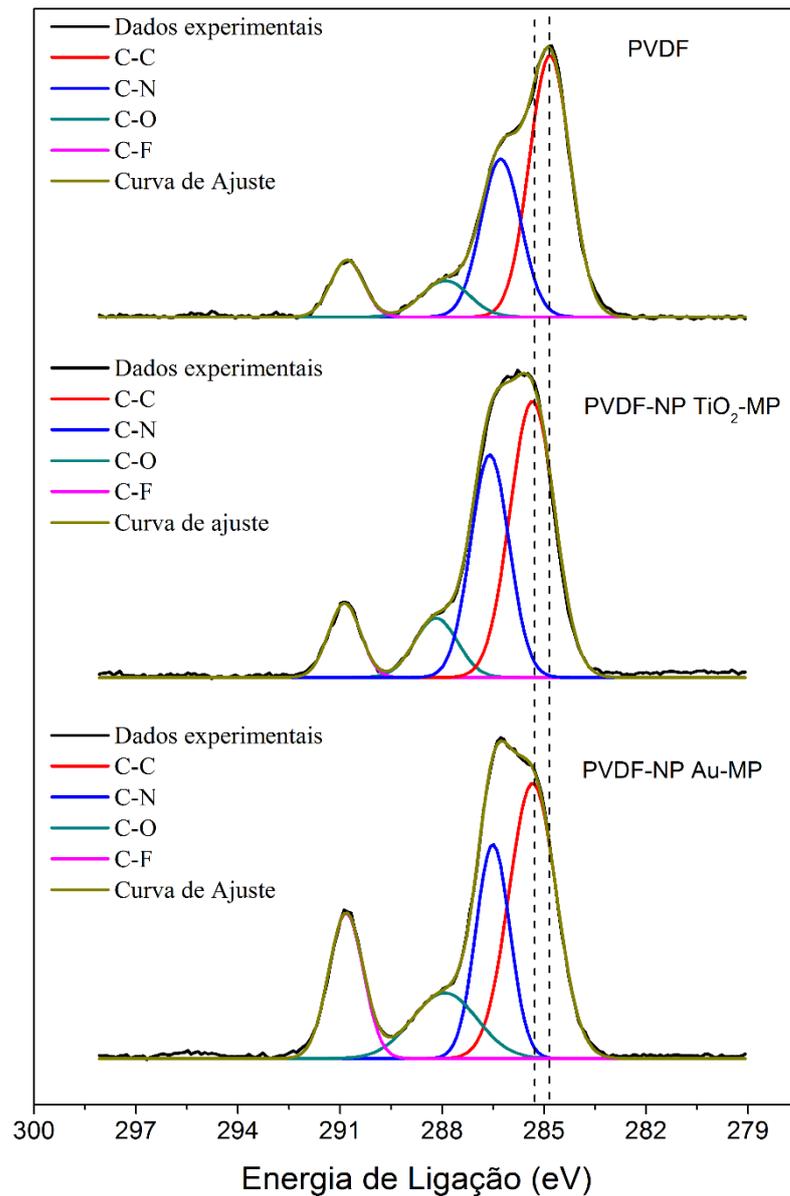


Figura 5-19. Espectros de XPS do C1s para os filmes de PVDF, PVDF-NP TiO<sub>2</sub>-MP e PVDF-NP Au-MP.

Os filmes nanocompósitos com as MPs foram produzidos pela técnica *casting* onde o material polimérico foi depositado sobre a superfície dos eletrodos de ouro, carbono vítreo e Dropsens<sup>®</sup>(C220 AT) sem tratamento térmico, enquanto os filmes nanocompósitos depositados sobre a superfície de ITO foram obtidos pela técnica de *spin coating*, onde há uma etapa de vaporização centrífuga, seguida de tratamento térmico que favorece a vaporização do solvente da matriz do PVDF.

Nos filmes de PVDF-NP TiO<sub>2</sub>-MP e de PVDF-NP Au-MP, foram observadas as mesmas espécies de carbono, por isso foram feitas as mesmas atribuições para os grupos moleculares. Foi observado um deslocamento de 0,6 eV referentes às espécies de C-C em relação ao filme de PVDF, provavelmente, devido à presença das nanopartículas e das MPs que causaram uma diferença na densidade eletrônica do átomo de carbono na superfície dos filmes. Entretanto, foram obtidos os valores da razão atômica entre as ligações C-C e C-N (C-N/C-C) para estimar as contribuições das espécies de C oriundas da proteína que reveste as MPs. Portanto, os valores obtidos são 0,60 para PVDF, 0,80 para PVDF-NP TiO<sub>2</sub> e 0,78 para PVDF-NP Au-MP indicando que há um aumento da área dos picos referentes às ligações C-N, confirmando a presença das MPs nos filmes e também observou-se que a FWHM (largura à meia altura) dos picos das ligações C-O aumentou após a incorporação das MPs.

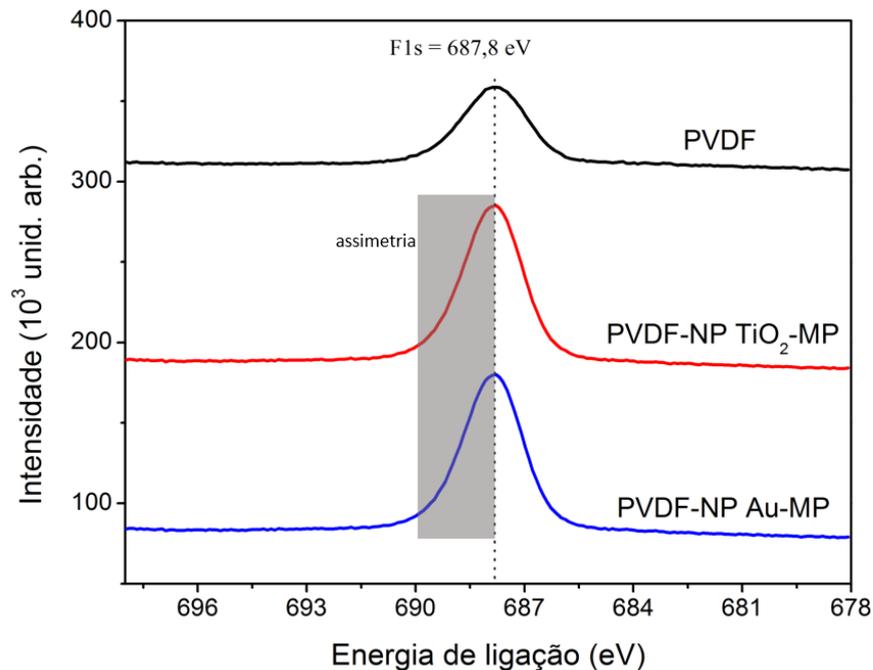


Figura 5-20. Espectros de XPS do F1s para os filmes de PVDF, PVDF-NP TiO<sub>2</sub> e PVDF-NP Au-MP.

Na Figura 5-20, são apresentados os espectros de XPS do F1s para os filmes de PVDF, PVDF-NP TiO<sub>2</sub>-MP e PVDF-NP Au-MP. Os espectros um único pico com energia de ligação centrada em 687,8 eV atribuída a ligação C-F (SARKAR et al., 2014; TAO; LIU; XUE, 2012).

O comparativo entre os espectros não mostrou um deslocamento nas energias de ligação, somente um aumento de intensidade dos picos referente aos filmes nanocompósitos, sugerindo que as espécies C-F<sub>2</sub> estão mais presentes na superfície dos filmes com nanopartículas de dióxido de titânio e ouro do que no filme PVDF sem as nanopartículas. A suave assimetria observada revelou que a presença das MPs orientou os grupos moleculares C-F<sub>2</sub> do PVDF para a superfície dos filmes nanocompósitos, indicando que houve um aumento da fase  $\beta$  nos filmes de PVDF (SARKAR et al., 2014).

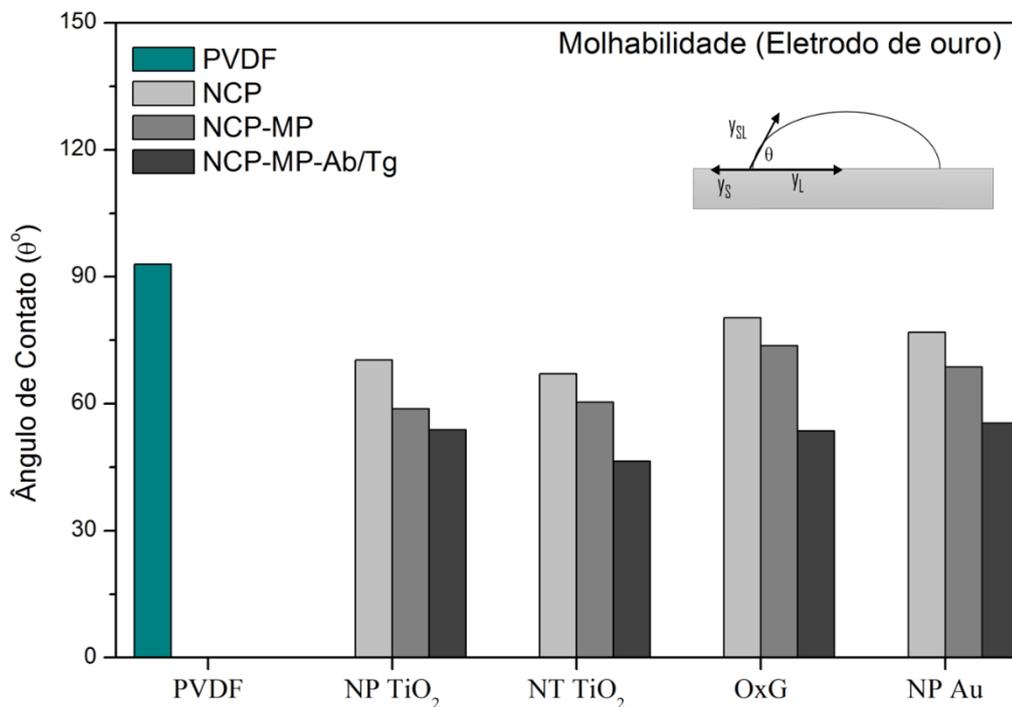


Figura 5-21. Gráfico dos valores de ângulos de contato dos filmes de PVDF, NCP, NCP-MP e NCP-MP-Ab/Tg sobre eletrodo de ouro.

Na Figura 5-21 é mostrado o gráfico de molhabilidade comparando os ângulos de contato do filme de PVDF com os filmes nanocompósitos poliméricos (NCP), com os filmes de NPC com MPs incorporados e com os filmes NCP-MP com o complexo anti-Tg/Tg (NCP-MP-anti-Tg/Tg) onde é possível acompanhar as modificações químicas superficiais durante o

processo de modificação do eletrodo e de interação do anti-Tg (Ab) e a Tg usando eletrodos de ouro.

O filme de PVDF possui uma característica predominantemente hidrofóbica com ângulo de contato de 93°. Após a incorporação dos nanomateriais na matriz polimérica de PVDF, os ângulos de contato referentes aos NCPs apresentaram uma diminuição do ângulo de contato indicando uma modificação química na superfície dos filmes. O aumento da molhabilidade da superfície dos eletrodos modificados com NCP que pode ser explicado pela hidrofiliidade devido à incorporação de grupos hidroxilas (-OH), de vacâncias oxigênicas, de espécies oxigenadas presente na superfície das nanoestruturas.

O filme PVDF-NT TiO<sub>2</sub> apresentou menor ângulo de contato demonstrando que sua superfície é a mais hidrofílica quando comparado com os demais NCP. Depois da inserção das MPs (NCP-MP), os valores de ângulo de contato diminuíram ainda mais e mesma tendência foi observada após a formação do complexo anti-Tg/Tg sobre os filmes de NCP-MP provavelmente devido à presença das proteínas na MPs e anticorpo-antígeno. O processo de modificação do eletrodo e de detecção de Tg foram acompanhadas pela diminuição dos ângulos de contato indicando um aumento de grupos moleculares polares na superfície dos filmes citados em que notoriamente sua superfície hidrofóbica torna-se hidrofílica em diferentes graus de molhabilidade. Os valores de ângulo de contato dos filmes encontram-se na Tabela 5-3.

Tabela 5-3. Valores de ângulo de contato dos filmes de NCP, NCP-MP e NCP-MP-Ab/Tg sobre eletrodo de ouro.

<b>Nanomaterial</b>	<b>NCP</b>	<b>NCP-MP</b>	<b>NCP-MP-Ab/Tg</b>
NP TiO <sub>2</sub>	70,3°	58,7°	53,8°
NT TiO <sub>2</sub>	67,1°	60,4°	46,4°
OxG	80,3°	73,7°	53,5°
NP Au	77,0°	68,7°	55,4°

Fonte: Autor, 2019.

A hidrofiliçidade pode ser melhor expressada através da determinação da tensão superficial ( $\gamma_s$ ) por meio das suas componentes polar e dispersiva. Foram utilizados três solventes polares: água, etilenoglicol e glicerol para determinar as contribuições das componentes polares e dispersivas de cada filme nanocompósito com e sem MPs empregando as equações de Young-Dupre (WU; SHANKS, 2004).

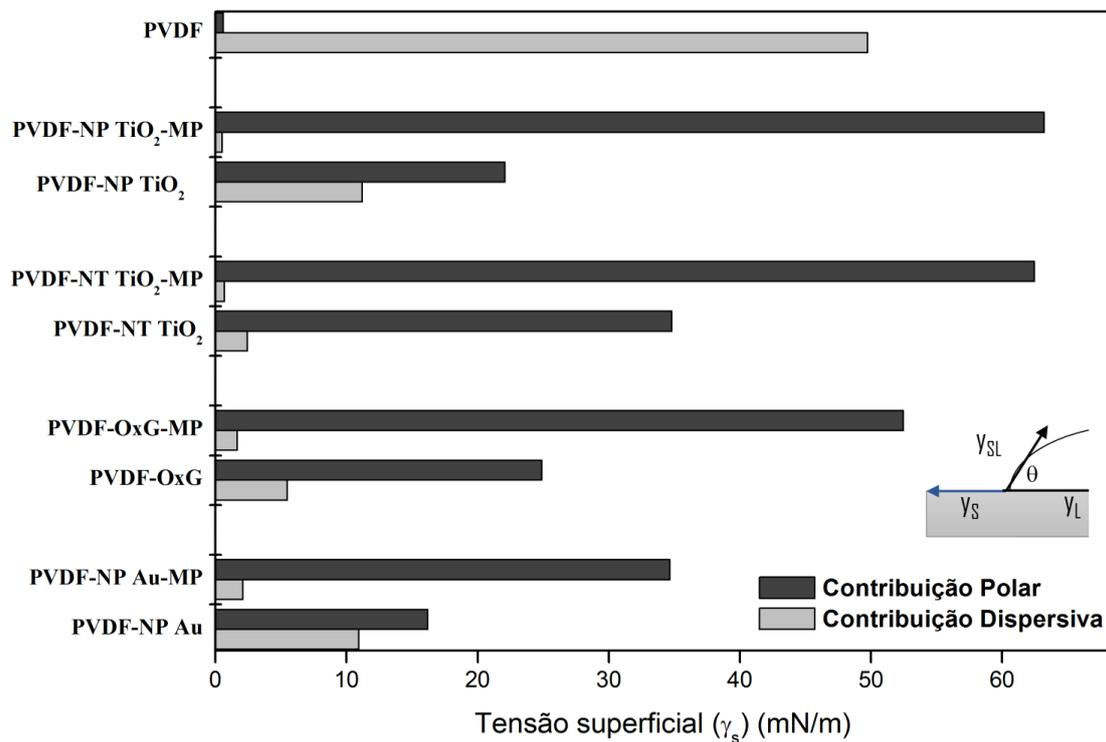


Figura 5-22. Gráfico das componentes polar e dispersiva da tensão superficial sólido dos eletrodos de PVDF, PVDF-NP-TiO<sub>2</sub>, PVDF-NT-TiO<sub>2</sub> e PVDF-NP-Au com e sem MPs.

A Figura 5-22 apresenta as componentes polares, onde observa-se que a componente polar do filme de PVDF é extremamente baixa, em contraste com a componente dispersiva. Após a incorporação dos nanomateriais nos filmes de NCP, os valores da componente polar aumentaram consideravelmente comparado ao filme de PVDF, assim como também foi observado que os valores de componentes polares dos filmes de NCP-MP aumentaram significativamente, superando a contribuição dispersiva do PVDF. Estes resultados indicam que

as proteínas (MPs, anti-Tg e Tg) têm forte caráter hidrofílico, o qual foi transferido à superfície dos filmes analisados.

Nos estudos de reconhecimento molecular da Tg foram empregadas as técnicas de voltametria de pulso diferencial (VPD) e a voltametria de onda quadrada (VOQ). Foram utilizados parâmetros padrão de VPD e VOQ (voltametria realizada no sentido anódico) utilizando 5,0 mmol/L de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  em solução tampão de 0,1 mol/L de PBS (pH 7,4) em eletrodos de ouro, de carbono vítreo e de ouro *screen-print* (Dropsens<sup>®</sup>) modificados com os filmes de PVDF-NP  $\text{TiO}_2$ -MP, PVDF-NT  $\text{TiO}_2$ -MP, PVDF-OxG-MP e PVDF-NP Au-MP

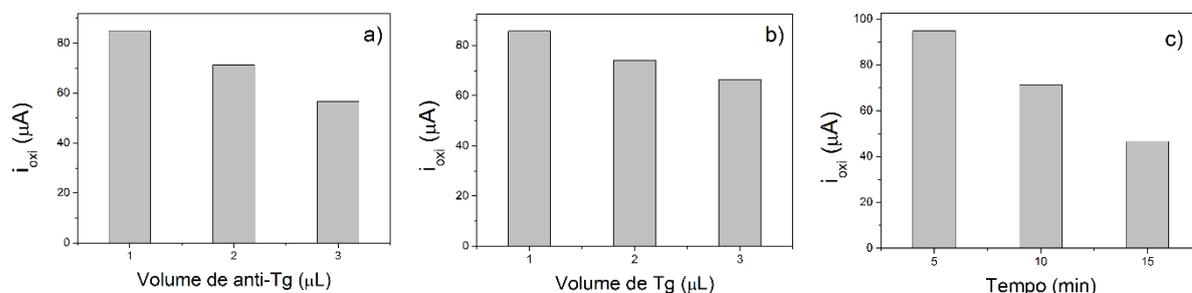


Figura 5-23. Otimização do (a) volume de deposição de anti-Tg, do (b) volume de deposição de Tg e do (c) tempo de incubação de Tg em 5,0 mmol/L de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  e 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) com velocidade de varredura de 0,05 V/s.

Em geral, os ensaios de otimização de volume de deposição de anti-Tg, volume de deposição de Tg e tempo de incubação de Tg mostrados na Figura 5-23 indicaram um efeito de passivação da superfície do eletrodo à medida que os valores de volume e tempo aumentam, isso já era esperado, uma vez que as proteínas comumente agem como agente isolante.

Os parâmetros selecionados foram: (i) de 2  $\mu\text{L}$  de anti-Tg depositado por 10 min e 2  $\mu\text{L}$  de Tg para incubação de 10 min para formação efetiva do imunocomplexo na superfície do eletrodo de ouro, (ii) de 3  $\mu\text{L}$  de anti-Tg depositado por 10 min e 3  $\mu\text{L}$  de Tg para incubação de 10 min sobre o eletrodo de carbono vítreo e, (iii) de 3  $\mu\text{L}$  de anti-Tg depositado por 10 min e

3  $\mu\text{L}$  de Tg para incubação de 10 min sobre o eletrodo de ouro *screen-print* (Dropsens<sup>®</sup> C220 AT).

O tempo de incubação é um parâmetro muito importante para avaliar o tempo de análise e, portanto, o tempo necessário para a determinação de Tg. O tempo de 10 min mostrou-se um tempo adequado para um teste rápido quando comparado com o tempo de análise é de 30 min com os eletrodos de ITO.

O estudo de interferência foi realizado a fim de avaliar a especificidade e seletividade dos imunossensores na determinação de Tg. Alguns compostos biológicos presentes em amostras reais foram testados: 100 ng/mL de glicina, de glicose e de BSA. A capacidade de interferência dos materiais biológicos foi avaliada incubando uma mistura de 1,0 ng/mL de antígeno Tg e 100 ng/mL do material biológico. Os compostos biológicos avaliados foram: glicina (100 ng/mL + 1 ppb de Tg), glicose (100 ng/mL + 1 ppb de Tg) e BSA (100 ng/mL + 1 ppb de Tg) em 10 mmol/L de PBS (pH = 7,4).

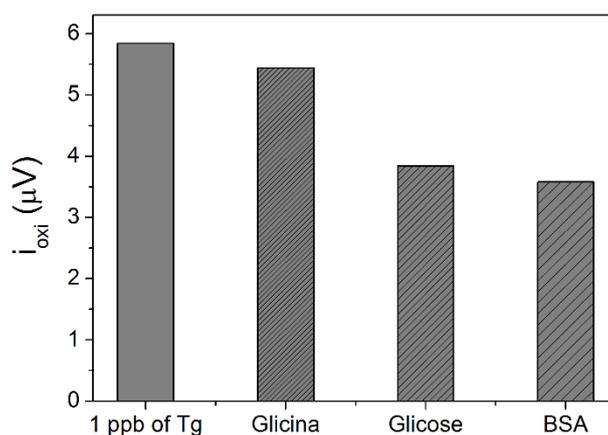


Figura 5-24. Estudo de interferência de compostos em relação à resposta do imunossensor, compostos testados: glicina (100 ng/mL + 1 ppb de Tg), glicose (100 ng/mL + 1 ppb de Tg) e BSA (100 ng/mL + 1 ppb de Tg) em 10 mmol/L de PBS em 5,0 mmol/L de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  e 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) com velocidade de varredura de 0,05 V/s.

As respostas eletroquímicas obtidas nesse estudo estão apresentadas na Figura 5-24, sendo que um baixo nível de interferência (inferior a 30%) foi observado para todos os

compostos testados, quando comparados ao teste de controle (incubação de 1 ppb de Tg apenas em PBS) indicando uma boa especificidade e seletividade.

Para validação dos imunossensores propostos foram determinados os seguintes parâmetros: limite de detecção  $LD = 3DP/m$  ( $DP =$  desvio-padrão da medida do branco e  $m =$  coeficiente angular da linear da curva analítica), limite de quantificação  $LQ = 10 DP/m$ , fator de recuperação ( $FR\% = \text{valor calculado}/\text{valor real} \cdot 100$ ) e curvas analíticas de calibração usando duas técnicas eletroanalíticas de pulso, a VOQ e a VPD. Três eletrodos foram testados: eletrodo de ouro, eletrodo de carbono vítreo e eletrodo de ouro *screen-print* (Dropsens®). Os valores dos parâmetros de validação encontram-se na Tabela 5-4.

Tabela 5-4. Respostas eletroquímicas dos imunossensores eletroquímicos obtidas para parâmetros de limite de detecção, limite quantificação e fatores recuperação para 1 ppb (ng/mL) de Tg por voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada referentes aos filmes NCP-MP.

	Eletrodo de ouro					
	VPD			VOQ		
	LD (ng/mL)	LQ (ng/mL)	FR%	LD (ng/mL)	LQ (ng/mL)	FR%
NP TiO <sub>2</sub>	0,028	0,087	93	0,031	0,094	87
NT TiO <sub>2</sub>	0,011	0,003	94	0,017	0,053	89
OxG	0,044	0,133	96	0,358	1,086	92
NP Au	0,015	0,046	95	0,043	0,131	91
	Eletrodo de Carbono Vítreo					
	VPD			VOQ		
	LD	LQ	FR%	LD	LQ	FR%
NP -TiO <sub>2</sub>	0,019	0,058	95	0,165	0,498	83
NT TiO <sub>2</sub>	0,015	0,047	97	0,190	0,576	88
OxG	0,082	0,249	98	0,164	0,497	86
NP Au	0,049	0,151	97	0,124	0,376	87
	Eletrodo de ouro <i>screen-print</i> (Dropsens®)					
	VPD			VOQ		
	LD	LQ	FR%	LD	LQ	FR%
NP TiO <sub>2</sub>	0,127	0,385	90	0,021	0,062	88
NP Au	0,328	0,995	94	0,307	0,931	91

Fonte: Autor, 2019.

Os valores de LD obtidos neste trabalho para todos os filmes de NCP-MP/anti-Tg depositados sobre os eletrodos de ouro, de carbono vítreo e de ouro *screen-print* foram abaixo de 1,0 ng/mL, portanto são ultrasensíveis na determinação de Tg *in vitro*. Os valores de LD

calculados correspondem à menor concentração de Tg que pode ser detectada acima do valor do limite do branco com 95% de confiança sob as condições experimentais estabelecidas neste trabalho.

Foi realizado uma comparação com os valores de LD e LQ do equipamento MODULAR ANALYTICS E170 da Roche<sup>®</sup> que utiliza um analisador de imunoensaio baseado em eletroquimioluminescência, segundo as especificações do analisador e do kit *Cobas e 411*, o LD = 0,04 ng/mL, o LQ = 0,1 ng/mL e FR% =  $\pm 90\%$  ( $\leq 2,0$  ng/mL).

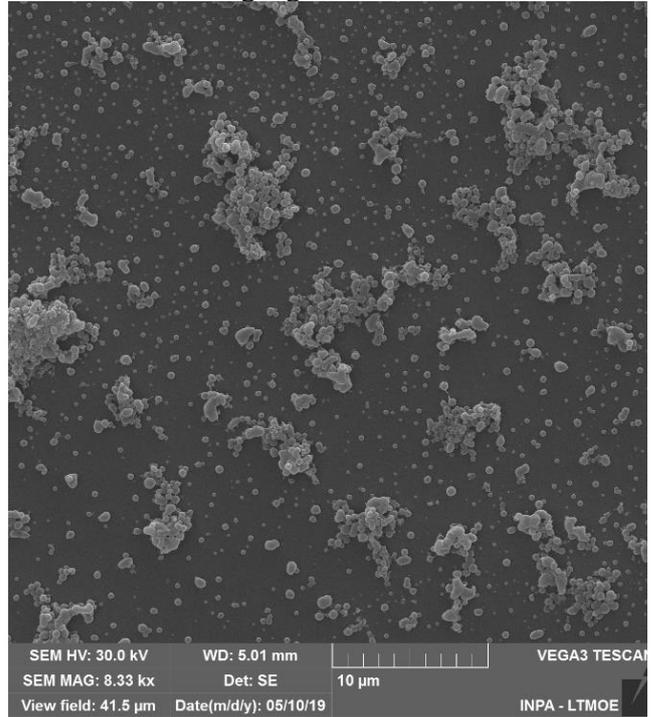
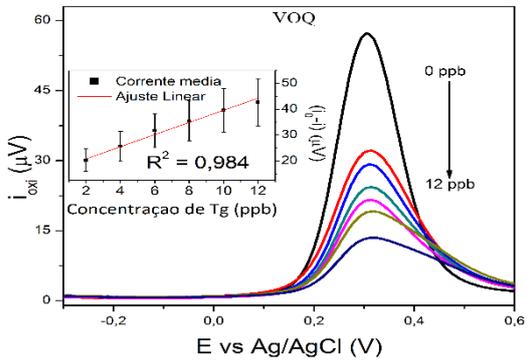
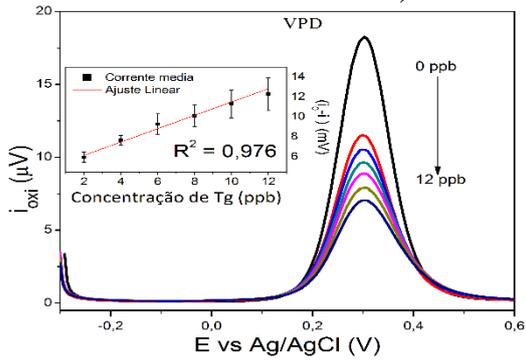
Comparando os valores de LD da Roche<sup>®</sup> com técnica de VPD, todos os filmes NCP-MP/anti-Tg depositados sobre eletrodo de ouro apresentaram resultados excelentes com valores de LD abaixo de 0,04 ng/mL. Os filmes de NCP-MP/anti-Tg depositados sobre eletrodo de carbono vítreo, apresentaram valores abaixo de 0,04 ng/mL com exceção do filme de PVDF-OxG-MP/anti-Tg.

Para a técnica de VOQ, todos os filmes de NCP-MP/anti-Tg depositados sobre eletrodo de ouro apresentaram valores abaixo de 0,04 ng/mL, com exceção do filme de PVDF-OxG-MP/anti-Tg, enquanto que para os eletrodos de carbono vítreo modificados com filmes de NCP-MP/anti-Tg os valores de LD foram acima de 0,04 ng/mL.

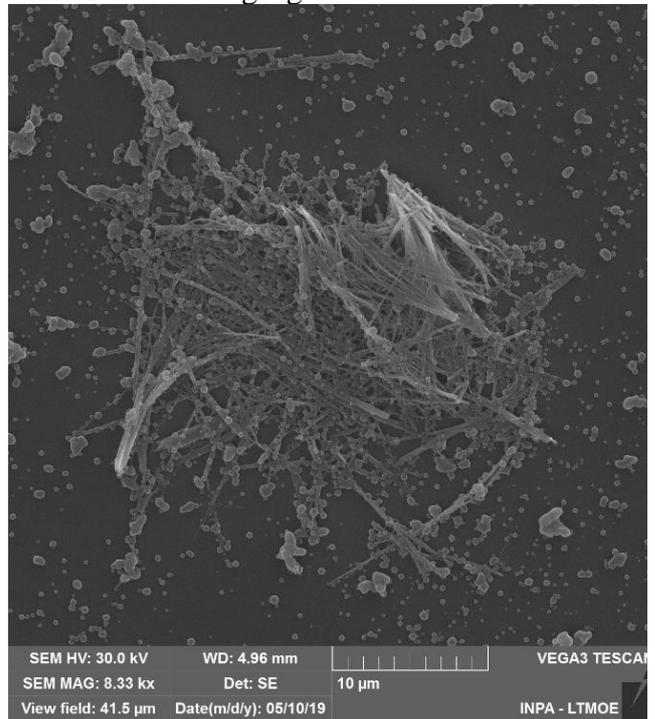
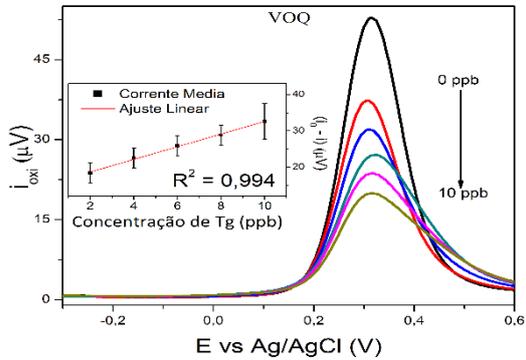
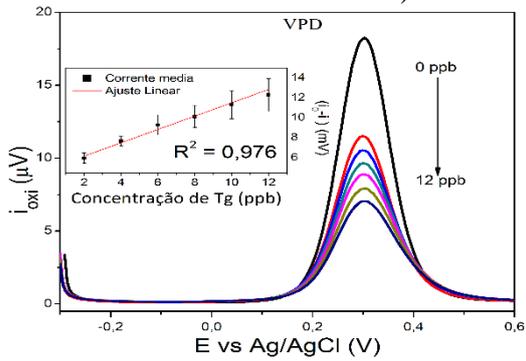
Os eletrodos de ouro *screen-print* modificados com os filmes de NCP-MP/anti-Tg analisados por ambas as técnicas de VPD e VOQ apresentaram valores de LD acima de 0,04 ng/mL, com exceção do filme PVDF-NP TiO<sub>2</sub>-MP/anti-Tg que apresentou um valor de LD igual a 0,02 ng/mL.

Os fatores de recuperação são um indicativo da exatidão do método em que os resultados dos três eletrodos se mostraram bastante satisfatórios comparado com FR% de referência da Roche<sup>®</sup>.

a) Au/PVDF-NP TiO<sub>2</sub>-MP/anti-Tg/Tg



b) Au/PVDF-NT TiO<sub>2</sub>-MP/anti-Tg/Tg



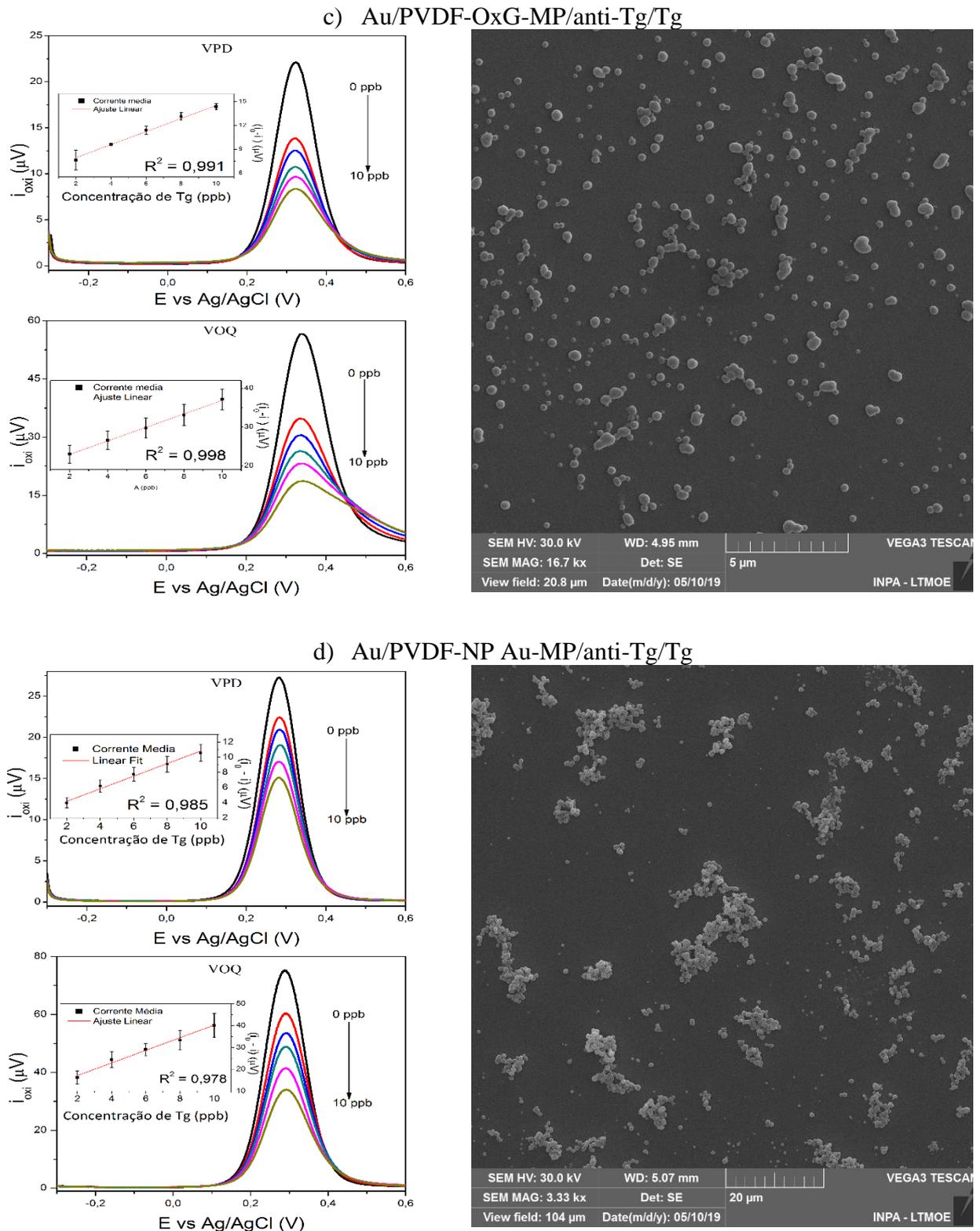


Figura 5-25. Respostas eletroquímicas obtidas por VPD e VOQ na detecção de Tg usando eletrodo de ouro modificados com os filmes de (a) PVDF-NP  $\text{TiO}_2$ -MP/anti-Tg, (b) PVDF-NT  $\text{TiO}_2$ -MP/anti-Tg, (c) PVDF-OxG-MP/anti-Tg e (d) PVDF-NP Au-MP/anti-Tg em 5,0 mmol/L de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  e 0,1 mol/L de PBS (pH = 7,4) com velocidade de varredura de 0,05 V/s. No lado direito, imagens de MEV correspondente aos filmes NCP-MP. *Inset*, curvas de calibração com barras de desvio-padrão e  $R^2$ .

Na Figura 5-25 (a-d), são apresentadas as respostas eletroquímicas obtidas por VPD e VOQ com as curvas analíticas de calibração dos eletrodos de ouro modificados com os filmes NCP-MP/anti-Tg/Tg, e no lado direito, imagens de MEV da superfície dos filmes NCP-MP correspondentes.

Em geral, foi observada uma diminuição na intensidade da corrente de pico anódico à medida que a concentração de Tg aumenta, indicando que a diminuição da intensidade do sinal é inversamente proporcional à detecção de Tg. Ao subtrair o sinal de corrente anódico do complexo anti-Tg/Tg ( $i$ ) do sinal de corrente anódico de anti-Tg ( $i_0$ ) obtém-se o valor de corrente anódico correspondente ao Tg isolado ( $i_{Tg} = i_{anti-Tg} - i_{anti-Tg/Tg}$ ). Neste caso, a concentração de Tg é diretamente proporcional à corrente anódica. A dependência linear (no *inset*) entre a corrente de oxidação (anódica) em função da concentração de Tg dos filmes NCP-MP/anti-Tg foi obtida no intervalo de trabalho de 2 – 12 ppb (ng/mL) com valores de  $R^2$  satisfatórios.

O filme PVDF-NP TiO<sub>2</sub>-MP/anti-Tg apresentou respostas eletroquímicas linearmente proporcionais à concentração de Tg dentro da faixa analítica de 2 – 12 ppb. O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) é um indicativo da linearidade do método, neste caso, a técnica de VOQ apresentou o valor mais próximo de 1, enquanto que a técnica de VPD apresentou menor desvio-padrão (< 10%), indicando ser a técnica mais precisa do que VOQ (< 35%).

A técnica de VOQ apresentou um ombro em 0,5 V a partir de 10 ppb indicando que a sonda  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  pode está interagindo em outra região da superfície do eletrodo modificado diferente do imunocomplexo sobre o filme NCP-MP/anti-Tg. Este mesmo comportamento foi observado nos outros filmes.

O filme PVDF-NT TiO<sub>2</sub>-MP/anti-Tg também apresentou respostas eletroquímicas linearmente proporcional à concentração de Tg, onde os coeficientes de correlação ( $R^2$ ) do

VOQ indicaram uma melhor linearidade do que a VPD. Entretanto, a técnica de VPD apresentou menor desvio-padrão (< 10%), sendo a técnica com maior precisão em determinar a concentração de Tg do que VOQ (< 15%).

O filme PVDF-OxG-MP/anti-Tg apresentou valores de desvio-padrão menores que 10%, tendo uma ótima precisão em determinar Tg. Somente o filme de PVDF-NP Au-MP/anti-Tg apresentou valores de  $R^2$  em que VPD está mais próximo de 1 portanto melhor linearização e o voltamograma de onda quadrada apresentou o menor valor de  $R^2$  comparado aos demais. Os desvios-padrão < 12% para VPD e < 15% para VOQ.

Os resultados e parâmetros analíticos obtidos reforçam que o NCP aliado ao sistema estreptavidina-biotina foi determinante para obtenção dos excelentes resultados em determinar Tg *in vitro* apresentando uma alta sensibilidade e especificidade, indicando que os imunossensores apresentam grande potencial na aplicação no seguimento pós-operatório e/ou no rastreamento de metástase em pacientes com CDT.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, foram apresentados nanocompósitos poliméricos funcionalizados para imobilização de anticorpos anti-Tg para construção de imunossensor eletroquímico para detecção de Tg em caso recorrente de CDT.

Primeiramente, foi realizada a obtenção de nanocompósitos com nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ , a fim de obter um filme com propriedades elétricas e bioafinidade em meio aquoso em condições específicas de pH sanguíneo e concentração salina. O estudo eletroquímico para seleção do substrato polimérico foi realizado com três polímeros: acetato de celulose, EuDragit e PVDF. Os testes eletroquímicos mostraram que os filmes poliméricos testados apresentaram grande potencial para aplicação como substrato polimérico para imobilização de biomoléculas, entretanto, dentre os três polímeros, os filmes de PVDF apresentaram melhor desempenho em relação à estabilidade, perfil eletroquímico nas condições de pH sanguíneo e concentração salina e processabilidade.

Foram realizadas caracterizações química, eletroquímica, microscópica e superficial dos filmes nanocompósitos poliméricos de PVDF com nanomateriais de  $\text{TiO}_2$ , ouro e óxido de grafeno. Os espectros de FTIR mostraram que os nanomateriais têm preferência em interagir com a fase- $\alpha$  da matriz polimérica de PVDF. A partir das medidas de ângulo de contato foram determinadas as contribuições das componentes polar e dispersiva da tensão superficial sólido presentes na superfície dos nanocompósitos poliméricos de PVDF, indicando uma mudança química interfacial, principalmente após a incorporação das MPs. As medidas de XPS mostraram que há uma forte contribuição dos grupos moleculares advindos do solvente DMF nos filmes nanocompósitos de PVDF, devido ao processo de *casting* empregado na obtenção dos substratos poliméricos.

A caracterização morfológica mostrou a presença das MPs onde foi possível determinar o diâmetro das MPs, e sua disposição na superfície dos filmes. O mapeamento elementar mostrou a distribuição do elemento de carbono e oxigênio na superfície das MPs.

Ensaio de incubação da Tg empregando os filmes de PVDF com as nanoestruturas (NP TiO<sub>2</sub>, NT TiO<sub>2</sub> e NP Au) não apresentaram uma correlação linear, porém após incorporação de MPs na matriz polimérica dos nanocompósitos, foi observado que o sinal eletroquímico respondeu linearmente com o aumento da concentração de Tg.

O processo de detecção de Tg ocorre por passivação da superfície do filme sobre eletrodo, desta forma, foram obtidas curvas de calibração a partir da correlação linear que ocorre a partir da supressão do sinal eletroquímico da sonda [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> em diferentes concentrações de Tg. Foi determinado os valores de LD, LQ e fatores de recuperação e, quando comparado com as especificações da Roche®, os filmes com nanoestruturas e MPs depositados sobre eletrodos de ouro mostraram-se superiores aos dados de referências em relação aos eletrodos de carbono vítreo e Dropsens®.

A proteína estreptavidina tem uma alta afinidade de ligação com a molécula de biotina; assim, a incorporação de MPs foi essencial para a imobilização dos anticorpos anti-Tg biotinilado na superfície dos filmes nanocompósitos poliméricos. O sistema estreptavidina-biotina conferiu aos eletrodos modificados com filmes nanocompósitos poliméricos uma boa sensibilidade, especificidade, estabilidade e reprodutibilidade sendo utilizado com sucesso na determinação ultrasensível de Tg.

Portanto, conclui-se que os imunossensores eletroquímicos baseados em NCP-MP construídos sobre eletrodos de ouro, de carbono vítreo e de ouro *screen-print* demonstraram uma ótima eficiência e confiabilidade na detecção quantitativa *in vitro* do antígeno Tg com limites de detecção abaixo de  $\leq 0,04$  ng/mL (valor de referência da Roche®). Deste modo, os imunossensores propostos mostraram ser ultrasensíveis na determinação de Tg, podendo

auxiliar na monitoração de Tg em pacientes que realizaram o procedimento cirúrgico de tireoidectomia total e ablação da tireoide com iodo 131 para rastreamento de reincidência de CDT.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

De modo geral, muito estudo ainda pode ser realizado para otimizar os parâmetros dos imunossensores propostos, garantindo um melhor desempenho nas medidas de reconhecimento biológico da Tg. A seguir, apresentam-se algumas perspectivas futuras:

- Propõe-se dar continuidade ao trabalho de pesquisa para determinação quantitativa da Tg em soro e plasma humano em colaboração com Hospital Universitário Getúlio Vargas.
- Realizar estudos comparativo de detecção de Tg com outras técnicas laboratoriais e otimizar os resultados.
- Aperfeiçoar os parâmetros de VOQ e de VPD para detecção dos antígenos Tg.
- Otimizar a distribuição das MPs sobre a superfície dos filmes NCP para otimizar as respostas eletroquímicas, diminuindo os valores de desvio-padrão.
- Realizar a caracterização química dos filmes NCP-MP.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEIXO, L. M. Voltametria: Conceitos e Técnicas. **Chemkeys**, v. 1, p. 1–40, 2003.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Treating thyroid cancer**.
- BANDEIRA, L. et al. Thyroglobulin levels before radioactive iodine therapy and dynamic risk stratification after 1 year in patients with differentiated thyroid cancer. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 61, p. 590–599, 2017.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods -Fundamentals and Applications**. 2. ed. New York: JOHN WILEY, 2001.
- BASKIN, H. J. Detection of recurrent papillary thyroid carcinoma by thyroglobulin assessment in the needle washout by fine-needle aspiration of suspicious lymph nodes. **Thyroid**, v. 14, p. 959–63, 2004.
- BERTELLI, A. A. T. et al. Mutação BRAF em pacientes idosos submetidos à tireoidectomia. **Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgioes**, v. 40, n. 2, p. 110–116, 2013.
- BHOLE, Y. S. et al. Assessing feasibility of polyarylate–clay nanocomposites towards improvement of gas selectivity. **Journal of Membrane Science**, v. 306, n. 1, p. 277–286, 2007.
- BOI, F. et al. The diagnostic value for differentiated thyroid carcinoma metastases of thyroglobulin (Tg) measurement in washout fluid from fineneedle aspiration biopsy of neck lymph nodes is maintained in the presence of circulating anti-Tg antibodies. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 91, n. 4, p. 1364–9, 2006.
- BORGMANN, S. et al. Amperometric Biosensors. In: ALKIRE, R.; KOLB, D.; LIPKOWSKI, J. (Org.). **Adv. Electrochem. Sci. Eng.** New York: Wiley, 2012. p. 229–238.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ASSISTÊNCIA À SAÚDE. **Portaria nº 7, de 03 de janeiro de 2014. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Carcinoma Diferenciado da Tireoide**. Brasília: Ministério da Saúde. , 2014
- BRETT, C.; BRETT, A. **Electrochemistry: principles, methods, and applications**. II ed. New York: Oxford University, 1993.
- BROWN, A. P.; ANSON, F. C. Cyclic and differential pulse voltammetric behavior of reactants confined to the electrode surface. **Analytical Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 1589–1595, 1977.
- BRYAN, D. J. et al. Enhanced peripheral nerve regeneration through a poled bioresorbable poly(lactic-co-glycolic acid) guidance channel. **Journal of Neural Engineering**, v. 1, n. 2, p. 91, 2004.
- BUENO, L.; DE ARAUJO, W. R.; PAIXÃO, T. R. L. C. Point of care (POC) medical biosensors for cancer detection. **Medical Biosensors for Point of Care (POC) Applications**, p. 183–201, 2017.
- CAI, D. et al. A molecular-imprint nanosensor for ultrasensitive detection of proteins. **Nature Nanotechnology**, v. 5, n. 8, p. 597–601, 2010.
- CAMARGO, R. Y. A.; TOMIMORI, E. K. Uso da Ultra-Sonografia no Diagnóstico e Seguimento do Carcinoma Bem Diferenciado da Tireóide. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 51, n. 5, p. 783–792, 2007.
- CARDOSO, C. A. **Pacientes com carcinoma papilífero de tireoide tratados com**

**tireoidectomia total e não submetidos a dose ablativa com iodo radioativo: evolução da captação cervical do iodo radioativo e da tireoglobulina.** 2013. 86 f. Universidade de São Paulo, 2013.

CARVALHO, M. B. **Tratado de Tireoide e Paratireoides.** 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2018.

CERATTI, S. et al. Ultrasound-guided fine-needle aspiration of thyroid nodules: assessment of the ideal number of punctures. **Radiologia Brasileira**, v. 45, p. 145–148, 2012.

CHEN, A.; SHAH, B. Electrochemical sensing and biosensing based on square wave voltammetry. **Analytical Methods**, v. 5, n. 9, p. 2158–2173, 2013.

CHO, I. H. et al. Current technologies of electrochemical immunosensors: Perspective on signal amplification. **Sensors**, v. 18, n. 1, p. 1–18, 2018.

CHU, B. et al. A Dielectric Polymer with High Electric Energy Density and Fast Discharge Speed. **Science**, v. 313, n. 5785, p. 334–340, 2006.

CINQUANTA, L.; FONTANA, D. E.; BIZZARO, N. Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? **Auto- immunity highlights**, v. 8, n. 1, p. 9, 2017.

CLARK, P.; FRANKLYN, J. Can we interpret serum thyroglobulin results? **Ann Clin Biochem**, v. 49, p. 313–322, 2012.

COBURN, M.; TEATES, D.; WANEBO, H. J. Recurrent thyroid cancer: Role of surgery versus radioactive iodine (I131). **Annals of surgery**, v. 219, n. 6, p. 587–595, 1994.

CUNHA, N. et al. Thyroglobulin detection in fine-needle aspirates of cervical lymph nodes: a technique for the diagnosis of metastatic differentiated thyroid cancer. **Eur J Endocrinol.**, v. 157, p. 101–7, 2007.

DI JESO, B.; ARVAN, P. Thyroglobulin from molecular and cellular biology to clinical endocrinology. **Endocrine Reviews**, v. 37, n. 1, p. 2–36, 2016.

DIEHL, L. A. **Protocolo - Tratamento e acompanhamento do Câncer Diferenciado de Tireóide (CDT).** 2006. 30 f. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

FEIBELMANN, T. C. M. **Doença auto-imune de tireóide e urticária crônica idiopática: um estudo de caso-controle.** 2007. 90 f. Universidade Federal de Uberlândia, 2007.

FELTZ, K. P. et al. A review of electrospinning manipulation techniques to direct fiber deposition and maximize pore size. **Electrospinning**, v. 1, n. 1, p. 46, 2017.

FISCHER, L. M. et al. Gold cleaning methods for electrochemical detection applications. **Microelectronic Engineering**, v. 86, n. 4, p. 1282–1285, 2009.

FLORES-REBOLLAR, A. et al. Clinical utility of an ultrasensitive thyroglobulin assay in the follow-up of patients with differentiated thyroid cancer: can the stimulation test be avoided in patients with an intermediate recurrence risk? **Acta otorhinolaryngologica Italica**, v. 38, n. 3, p. 188–193, 2018.

GAO, R. et al. Clinical Value of 99m Tc-3PRGD2 SPECT/CT in Differentiated Thyroid Carcinoma with Negative 131 I Whole-Body Scan and Elevated Thyroglobulin Level. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2018.

GARIBYAN, L.; AVASHIA, N. Polymerase chain reaction. **The Journal of investigative**

**dermatology**, v. 133, n. 3, p. 1–4, 2013.

GOETTLER, L. A.; LEE, K. Y.; THAKKAR, H. Layered Silicate Reinforced Polymer Nanocomposites: Development and Applications. **Polymer Reviews**, v. 47, n. 2, p. 291–317, 2007.

GONÇALVES, F. T. **Doença Auto-imune de Tireóide e Disfunção Tireoidiana em pacientes com Artrite Reumatóide**. 2007. 93 f. Universidade Federal de Uberlândia, 2007.

GOPINATH, S. C. B. et al. Current aspects in immunosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 57, p. 292–302, 2014.

GREEN, R. M.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**. 4th. ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Press, 2012.

HABIBI, M. H.; NASR-ESFAHANI, M. Preparation, characterization and photocatalytic activity of a novel nanostructure composite film derived from nanopowder TiO<sub>2</sub> and sol–gel process using organic dispersant. **Dyes and Pigments**, v. 75, n. 3, p. 714–722, 2007.

HAN, J. M. et al. Clinical outcomes of differentiated thyroid cancer patients with local recurrence or distant metastasis detected in old age. **Endocrinology and Metabolism**, v. 33, n. 4, p. 459–465, 2018.

HE, F. et al. PVDF film tethered with RGD-click-poly(glycidyl methacrylate) brushes by combination of direct surface-initiated ATRP and click chemistry for improved cytocompatibility. **RSC Advances**, v. 4, n. 1, p. 105–117, 2014.

HOCK, B. Antibodies for immunosensors a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 347, n. 1, p. 177–186, 1997.

HOLLENBEAK, C. S. et al. Recurrence of differentiated thyroid cancer in the elderly. **European Journal of Endocrinology**, v. 168, n. 4, p. 549–556, 2013.

HU, C.; DOU, W.; ZHAO, G. Enzyme Immunosensor Based on Gold Nanoparticles Electroposition and Streptavidin-biotin System for Detection of *S. pullorum* & *S. gallinarum*. **Electrochimica Acta**, v. 117, p. 239–245, 2014.

HUANG, L. et al. Synthesis of Biodegradable and Electroactive Multiblock Polylactide and Aniline Pentamer Copolymer for Tissue Engineering Applications. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 3, p. 850–858, 2008.

HUSKIĆ, M.; ZIGON, M. PMMA/MMT nanocomposites prepared by one-step in situ intercalative solution polymerization. **European Polymer Journal**, v. 43, p. 4891–4897, 2007.

INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2017.

\_\_\_\_\_. Iodine therapy for thyroid differentiated carcinoma - Procedures. **Revista Brasileira de cancerologia**, v. 48, n. 2, p. 187–189, 2002.

JAIN, A.; CHENG, K. The principles and applications of avidin-based nanoparticles in drug delivery and diagnosis. **Journal of controlled release**, v. 245, p. 27–40, 2017.

JONES, H. E. H.; ROITT, I. M. Experimental Auto-Immune Thyroiditis in the Rat. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 42, n. 6, p. 546–557, 1961.

JU, H.; LAI, G.; YAN, F. Chemiluminescent immunoassay. **Immunosensing Detect. Protein Biomarkers**. 1. ed. Cambridge: Glyn Jones, 2017a. p. 143–169.

- \_\_\_\_\_. Electrochemiluminescent immunosensing. **Immunosensing Detect. Protein Biomarkers**. 1. ed. Cambridge: Glyn Jones, 2017b. p. 171–206.
- JUNG, Y.; JEONG, J.; CHUNG, B. Recent Advances in Immobilization Methods of Antibodies on Solid Supports. **The Analyst**, v. 133, p. 697–701, 2008.
- KABIR, E. et al. Pure  $\beta$ -phase formation in polyvinylidene fluoride (PVDF)-carbon nanotube composites. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 50, n. 16, p. 163002–20, 2017.
- KAKUDO, K. et al. The new 4th edition World Health Organization classification for thyroid tumors, Asian perspectives. **Pathology International**, v. 68, 2018.
- KIM, M. J. et al. Thyroglobulin measurement in fine-needle aspirate washouts: the criteria for neck node dissection for patients with thyroid cancer. **Clin Endocrinol**, v. 1, p. 145–51, 2009.
- KONOPKA, S. J.; MCDUFFIE, B. Diffusion Coefficients of Ferri- and Ferrocyanide Ions in Aqueous Media, Using Twin-Electrode Thin-Layer Electrochemistry. **Analytical Chemistry**, v. 42, n. 14, p. 1741–1746, 1970.
- KRONENBERG, H. M.; MELMED, S.; POLONSKY, K. S. **Williams Textbook of Endocrinology**. 12th. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2011.
- KUSHCHAYEVA, Y. S. et al. Spinal Metastases Due to Thyroid Carcinoma: An Analysis of 202 Patients. **Thyroid**, v. 24, n. 10, p. 1488–1500, 2014.
- LEBOULLEUX, S. Prognostic role of undetectable ablation thyroglobulin and follow-up thyroglobulin in patients with thyroid cancer. **Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism**, v. 4, n. 8, p. 436–437, 2008.
- LI, C. et al. An ultrasensitive and label-free electrochemical DNA biosensor for detection of DNase I activity. **RSC Advances**, v. 7, n. 35, p. 21666–21670, 2017.
- LI, S.; ZHAO, D.; ZHENG, J. Studies on preparation and characterization of 3DOM TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub> materials with high photocatalytic ability. **J Porous Mater**, v. 20, p. 473–479, 2013.
- LIANG, M.; GUO, L.-H. Photoelectrochemical DNA Sensor for the Rapid Detection of DNA Damage Induced by Styrene Oxide and the Fenton Reaction. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 2, p. 658–664, 2007.
- LIM, S. A.; AHMED, M. U. Electrochemical immunosensors and their recent nanomaterial-based signal amplification strategies: a review. **RSC Advances**, v. 6, n. 30, p. 24995–25014, 2016.
- LIVAGE, J.; CORADIN, T. Encapsulation of Enzymes, Antibodies, and Bacteria BT - Handbook of Sol-Gel Science and Technology. In: KLEIN, L.; APARICIO, M.; JITIANU, A. (Org.). . Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 1–23.
- LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Química Nova**, v. 29, p. 1318–1325, 2006.
- LUPOLI, G. A. et al. Prognostic significance of thyroglobulin antibody epitopes in differentiated thyroid cancer. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 100, n. 1, p. 100–108, 2015.
- MACIEL, R. M. B. Carcinoma diferenciado da tiróide (Papilífero e Folicular): diagnóstico e conduta. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 42, n. 4, p. 299–305,

1998.

\_\_\_\_\_. O Laboratório no Diagnóstico e Seguimento de Doenças Auto-Imunes e Neoplásicas de Tireóide. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, p. 65–71, 2002.

MAIA, A. L. et al. Nódulos de Tireóide e Câncer Diferenciado de Tireóide: Consenso Brasileiro. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 51, n. 5, p. 867–893, 2007.

MAKARAVICIUTE, A.; RAMANAVICIENE, A. Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 50, p. 460–471, 2013.

MALTHIÉRY, Y.; LISSITZKY, S. Primary structure of human thyroglobulin deduced from sequence of its 8448-base complementary DNA. **Eur J Biochem**, v. 165, p. 491–498, 1987.

MALTHIÉRY, Yves et al. Thyroglobulin structure and function: recent advances. **Biochimie**, v. 71, n. 2, p. 195–209, 1989.

MANGUSO, F. et al. Electrochemiluminescence immunoassay method underestimates cortisol suppression in ulcerative colitis patients treated with oral prednisone. **World journal of gastroenterology**, v. 20, n. 31, p. 10895–10899, 2014.

MARTINS, M. **Biossensores de colesterol baseados no sistema poli(álcool vinílico)/ftalocianina**. 2006. 143 f. Universidade Federal de Itajubá, 2006.

MARTINS, P.; LOPES, A. C.; LANCEROS-MENDEZ, S. Electroactive phases of poly(vinylidene fluoride): Determination, processing and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 4, p. 683–706, 2014.

MEHROTRA, P. Biosensors and their applications - A review. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 6, n. 2, p. 153–159, 2016.

MICHELS, F. A. S. **Câncer de Tireóide no Município de São Paulo: Análises de Tendência e Espacial dos Dados do Registro de Câncer de Base Populacional**. 2013. 124 f. Universidade de São Paulo, 2013.

MILAZZO, G. et al. Electrochemistry of Biomolecules. **Electroanalytical Chemistry**, v. 9, 2001.

MIRCESKI, V. et al. Square-Wave Voltammetry: A Review on the Recent Progress. **Electroanalysis**, v. 25, 2013.

MIYAZAKI, C. M.; SHIMIZU, F. M.; FERREIRA, M. Surface Plasmon Resonance (SPR) for Sensors and Biosensors. **Micro and Nano Technologies**, p. 183–200, 2017.

MOHAMAD, N. R. et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology, biotechnological equipment**, v. 29, n. 2, p. 205–220, 2015.

MORRIS, L. G. T. et al. The increasing incidence of thyroid cancer: the influence of access to care. **Thyroid**, v. 23, n. 7, p. 885–891, 2013.

MURUSSI, M. et al. Punção aspirativa de tireóide com agulha fina em um hospital geral: estudo de 754 punções. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, p. 576–583, 2001.

MYHRE, K. G. et al. Samarium thin films molecular plated from N,N-dimethylformamide

- characterized by XPS. **Surface Science Spectra**, v. 25, n. 2, p. 24003, 2018.
- NEWMAN, B. A. et al. Piezoelectricity in nylon 11. **Journal of Applied Physics**, v. 51, n. 10, p. 5161–5164, 1980.
- OLALEYE, O. et al. Increasing incidence of differentiated thyroid cancer in southeast England: 1987-2006. **Eur Arch Otorhinolaringol**, v. 268, p. 899–906, 2011.
- OLIVEIRA, J. P. et al. Impact of conjugation strategies for targeting of antibodies in gold nanoparticles for ultrasensitive detection of 17 $\beta$ -estradiol. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 13859, 2019.
- PACHECO, W. F. et al. Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.
- PACINI, F.; PINCHERA, A. Serum and tissue thyroglobulin measurement: Clinical applications in thyroid disease. **Biochemie**, v. 81, p. 463–467, 1999.
- PACINI, F.; SCHLUMBERGER, M.; DRALLE, H. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. **Eur J Endocrinol**, v. 154, p. 787 – 803, 2006.
- PARK, M. Orientation Control of the Molecular Recognition Layer for Improved Sensitivity: a Review. **BioChip Journal**, v. 13, n. 1, p. 82–94, 2019.
- PARK, S. et al. Changes in Serum Thyroglobulin Levels after Lobectomy in Patients with Low-Risk Papillary Thyroid Cancer. **Thyroid**, v. 28, n. 8, p. 997–1003, 2018.
- POHANKA, M. Overview of Piezoelectric Biosensors, Immunosensors and DNA Sensors and Their Applications. **Materials**, v. 11, n. 3, p. 448, 2018.
- ROCHA, R. M. et al. Well-differentiated tireoid carcinoma: Epidemiological profile, surgical results and oncological response. **Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgioes**, v. 45, n. 5, p. 1–9, 2018.
- RODRIGUES, D. M. C. **Imunossensor optoeletrônico para detecção de contaminação de escherichia coli na água**. 2017. 157 f. UFRJ/COPPE, 2017.
- ROMANI, A. et al. Comparison among Differential Pulse Voltammetry, Amperometric Biosensor, and HPLC/DAD Analysis for Polyphenol Determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 1197–1203, 1 abr. 2000.
- ROSÁRIO, P. W. et al. Seguimento de pacientes de alto risco com carcinoma diferenciado de tireóide sem doença persistente após a terapia inicial. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, p. 909–913, 2006.
- \_\_\_\_\_. Thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: update on the Brazilian consensus. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 57, p. 240–264, 2013.
- ROSÁRIO, P. W. S. et al. Antithyroglobulin antibodies in patients with differentiated thyroid carcinoma: methods of detection, interference with serum thyroglobulin measurement and clinical significance. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 48, n. 4, p. 487–492, 2004.
- SABOORI, A. M. et al. Peptides of Human Thyroglobulin Reactive with Sera of Patients with Autoimmune Thyroid Disease. **The Journal of Immunology**, v. 163, n. 11, p. 6244–6250, 1999.

- SAPIENZA, M. T. Radioguided localization of recurrent lymph nodes in differentiated thyroid cancer – Where are we now? **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 62, n. 5, p. 491–492, 2018.
- SARKAR, S. et al. Electro-active phase formation in PVDF-BiVO<sub>4</sub> flexible nanocomposite films for high energy density storage application. **RSC Advances**, v. 4, n. 89, p. 48220–48227, 2014.
- SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 489–511, 2012.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, p. 671, 2012.
- SCHROEDER, B. et al. Preactivation Crosslinking - An Efficient Method for the Oriented Immobilization of Antibodies. **Methods and Protocols**, v. 2, n. 2, p. 35, 2019.
- SCOTT, K. Electrochemical principles and characterization of bioelectrochemical systems. In: SCOTT, Keith; YU, E. H. B. T.-M. E. and F. C. (Org.). . Boston: Woodhead Publishing, 2016. p. 29–66.
- SHEN, M.; RUSLING, J.; DIXIT, C. K. Site-selective orientated immobilization of antibodies and conjugates for immunodiagnosics development. **Methods**, v. 116, p. 95–111, 2017.
- SHRIVASTAVA, S.; JADON, N.; JAIN, R. Next generation polymer nanocomposites based electrochemical sensors and biosensors: a review. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 4, p. 1–53, 2016.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 1, p. 7–30, 2018.
- SILVA-MORAES, M. O. et al. Geometry-dependent DNA-TiO<sub>2</sub> immobilization mechanism: A spectroscopic approach. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 199, p. 349–355, 2018.
- SILVA, E. R. P. da. **Formulação e caracterização de um nanocompósito polimérico eco-amigável**. 2012. 63 f. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2012.
- SNOZEK, C. et al. Serum thyroglobulin, high-resolution ultrasound and lymph node thyroglobulin in diagnosis of differentiated thyroid carcinoma nodal metastases. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 92, n. 11, p. 4278–81, 2007.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA METABOLOGIA. **Projeto Diretrizes. Câncer Diferenciado da Tireóide: Fatores de Risco e Diagnóstico**. São Paulo: Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, 2006.
- SONG, C. et al. Recovery TiO<sub>2</sub> and sodium titanate nanowires as Cd(II) adsorbent from waste V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> -WO<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> selective catalytic reduction catalysts by Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaCl-KCl molten salt roasting method. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 0, p. 1–8, 2018.
- SOUZA, D. de; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, p. 81–89, 2003.
- SPENCER, C. A.; LOPRESTI, J. S. Technology Insigth: measuring thyroglobulin and thyroglobulin autoantibody in patients with differentiated thyroid-cancers. **Nat Clin Pract Endocrinol Metab**, v. 4, n. 4, p. 223–233, 2008.

- SPENCER, Carole A. Clinical utility of Thyroglobulin antibody (TgAb) measurements for patients with differentiated thyroid cancers (DTC). **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 12, p. 3615–3627, 2011.
- TAO, M.; LIU, F.; XUE, L. Hydrophilic poly(vinylidene fluoride) (PVDF) membrane by in situ polymerisation of 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and micro-phase separation. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 18, p. 9131–9137, 2012.
- TORRÉNS, J. I.; BURCH, H. B. Serum thyroglobulin measurement. Utility in clinical practice. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 30, n. 2, p. 429–467, 2001.
- TYONA, M. D. A theoretical study on spin coating technique. **Advances in materials Research**, v. 2, 2013.
- URKEN, M. L. et al. Management of recurrent and persistent metastatic lymph nodes in well-differentiated thyroid cancer: A multifactorial decision-making guide for the Thyroid Cancer Care Collaborative. **Head and Neck**, v. 36, n. 10, p. 605–614, 2015.
- VALENTE, M. F.; CAPELA-COSTA, J. Carcinoma anaplásico da tiróide: tendências atuais e perspectivas futuras. **Revista Portuguesa de Cirurgia**, p. 29–39, 2017.
- VOLPI, E.; FRIGUGLIETTI, C.; AURÉLIO, M. **Câncer da Tireoide Abordagem Multidisciplinar**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2010.
- WANG, J. **Analytical electrochemistry**. [S.l.]: Wiley-VCH, 2006.
- WELCH, N. G. et al. Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays (Review). **Biointerphases**, v. 12, n. 2, p. 02D301, 16 mar. 2017.
- WEN, W. et al. Recent Advances in Electrochemical Immunosensors. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 138–156, 2017.
- WU, S.; SHANKS, R. A. Solubility Study of Polyacrylamide in Polar Solvents. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 93, n. 3, p. 1493–1499, 2004.
- XU, Y. et al. Improving the physical properties of PEA/PMMA blends by the uniform dispersion of clay platelets. **Polymer**, v. 47, n. 13, p. 4564–4570, 2006.
- ZANELLA, A. B. et al. Thyroglobulin measurements in washout of fine needle aspirates in cervical lymph nodes for detection of papillary thyroid cancer metastases. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 54, n. 6, p. 550–554, 2010.
- ZHU, L. et al. Electrochemical behaviors of methylene blue on DNA modified electrode and its application to the detection of PCR product from NOS sequence. **Sensors**, v. 8, n. 9, p. 5649–5660, 2008.