



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

RÁVILA ALMEIDA DE OLIVEIRA

**CONSTRUÇÃO DE UM IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO À  
BASE DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA PARA  
DETECÇÃO DE MICROCISTINA-LR**

Florianópolis – SC  
2019



Rávila Almeida de Oliveira

**CONSTRUÇÃO DE UM IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO À  
BASE DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA PARA  
DETECÇÃO DE MICROCISTINA-LR**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Química da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Mestre em Química  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Iolanda Cruz  
Vieira

Florianópolis  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Oliveira, Rávila Almeida de  
Construção de um imunossensor eletroquímico à base  
de nanopartículas de magnetita para detecção de  
microcistina-LR / Rávila Almeida de Oliveira ;  
orientadora, Iolanda Cruz Vieira, 2019.  
120 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e  
Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química,  
Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Química. 2. Nanopartículas de magnetita. 3.  
Polietilenoimina. 4. Imunossensor label-free. 5.  
Microcistina-LR. I. Vieira, Iolanda Cruz. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Química. III. Título.

Rávila Almeida de Oliveira

**CONSTRUÇÃO DE UM IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO À  
BASE DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA PARA  
DETECÇÃO DE MICROCISTINA-LR**

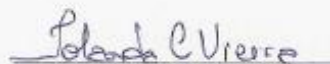
Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de  
Mestre em Química e aprovada em sua forma final pelo Programa de  
Pós-Graduação em Química

Florianópolis, 01 de março de 2019.



Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**



Prof.ª Dr.ª Iolanda Cruz Vieira  
Orientadora

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)



Prof. Dr. Eduardo Zapp

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC/Blumenau)



Prof. Dr. Luciano Vitali

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Este trabalho é dedicado aos meus pais  
Vilma e Ribert por todo carinho,  
paciência e apoio nos momentos em  
que mais precisei. Sem vocês eu não  
teria conseguido ....



## AGRADECIMENTOS

Aqui quero registrar os meus profundos agradecimentos a todas as pessoas que diretamente ou indiretamente contribuíram para que eu desse mais um passo na minha vida.

Primeiramente quero agradecer a Deus, por sempre estar ao meu lado, me acompanhar, me dar forças quando eu pensei que não fosse capaz, me dar coragem, porque só ele sabe o caminho que tive que traçar para chegar até aqui. Quero agradecer a Ele, pois apesar de muitos caminhos de obstáculos, me proporcionou imensas alegrias, aprendizados, novos amigos, realizações e lições que vou levar para o resto da minha vida.

Gostaria de deixar aqui os meus profundos agradecimentos aos meus pais Vilma e Ribert, por terem me dado a vida, a educação, o caráter e o apoio nos momentos em que mais precisei. Dedico esta importante vitória da minha vida a vocês mamãe e papai. Amo vocês!

Meu imenso obrigada para minhas parceiras de laboratório Nicole e Aline, por toda parceria, por todo apoio nos momentos em que mais precisei, pelas divertidas conversas e conselhos, por toda paciência, por terem me orientado e ajudado na construção e conclusão deste trabalho. Serei eternamente grata a vocês minhas grandes amigas!

Meu muito obrigada aos meus companheiros de estudo que sempre me ajudaram não só em grande parte deste mestrado, mas também com muitas alegrias e risadas. Agradeço a vocês meus amigos: Nicole, Duda, Giuli, Ana, Lucas Murara, Lucas Morés, Letícia, Diogo, Augusto, Michela, Gustavo e Caio.

Um intenso e amoroso obrigada para meus parceiros de laboratório Nicole, Aline, Felipe, Ana, Tânia, Amanda, Carol, Amanda Zimmerman e Carlos. Obrigada por ter deixado tudo isso mais leve, obrigada por me dar esperança, conselhos, alegrias, risadas, por me ensinarem a ser uma pessoa melhor! Vocês sempre estarão gravados na minha memória e no meu coração.

Um obrigada mais que especial aos meus amigos que acabaram se tornando minha família e transformaram minha vida de uma forma que eu jamais poderia imaginar, pois jamais pensei que eu pudesse aprender tanto e viver coisas tão incríveis como eu vivi com eles. Tenho certeza que vocês foram um grande especial presente que Deus me deu! Então meus sinceros agradecimentos aos amigos da vida e da Missão Universitária Luterana (Munil): Vitória, Dona Ezilda, Seu Zé, Pastor Bruno, Dona Nina, Marcela, Dani Beirich, Lígia, Simone, Búrigo, Aline Cabral, Amanda Figueiredo, Thaís Carlini, Leo Kargel, Ana Farias,



Lauren Bauer, Nicolás, Natan, Ian, Rodrigo, Samuel, Carlos, Gabriel, Jackson, Willian, Leo Cunha, Rubico, Carlinha, Aline Pfeifer, Karla, Gustavo Fertig, Kris Fertig, Kath Fertig, Bruninho, Charles, Deas, Duda, Fred, Betina, Pastor Daniel, Leleca, Leo Peres, Isa Eidam, Rogério, Isa Floriano, Rafa, Rose Fabrin, Zeca Fabrin, Lauren Fabrin, Simone Poppi, Yan, Vanessa, Thiago Costa, Daniel, Allan, Rebeka, Deise, Josiel, Aline, Linde, Alex, Lídia, Lucas, Mendes, Raphael, Ryan, Luísa, Stéfany, Viny, Thiago Galdino e Tomaz.

Agradeço a minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Iolanda Cruz Vieira por me proporcionar a oportunidade de ter feito pesquisa no LaBios e pelos ensinamentos e aprendizados.

A todos os meus professores que me ensinaram e me ajudaram nesta jornada, sempre tão atenciosos e dispostos a dar ao seu melhor. Meu muito obrigada Luciano Vitali, Ademir Neves, Daniel Lazaro Gallindo Borges e Almir Spinelli.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Luisa Sartorelli e ao aluno de Doutorado de Aldo (Departamento de Física da UFSC), pela grande ajuda nas medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica. Ao amigo Adauto da Engenharia Elétrica, pela grande ajuda nas medidas de impedância.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME/UFSC), pelas análises de microscopia.

Aos professores: Dr. Eduardo Zapp e Dr. Luciano Vitali por aceitarem participar da banca examinadora.

À UFSC e ao Programa de Pós-graduação em química pela oportunidade e estrutura oferecidas.

Ao apoio financeiro realizado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

O amor é paciente, o amor é bondoso. Não inveja, não se vangloria, não se orgulha. Não maltrata, não procura seus interesses, não se ira facilmente, não guarda rancor. O amor não se alegra com a injustiça, mas se alegra com a verdade. Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.

(1 Coríntios 13:4-7)



## RESUMO

Este trabalho apresenta o desenvolvimento de um novo imunossensor eletroquímico *label-free* para a detecção de microcistina-LR (MC-LR) na água da Lagoa do Peri (Florianópolis – SC). O imunossensor foi construído a partir da modificação da superfície de um eletrodo de carbono vítreo (GCE) utilizando, para isso, nanopartículas de magnetita (MGNnP) estabilizadas em polietilenoimina (PEI). Esta plataforma polimérica (MGNnP-PEI) foi empregada na imobilização de anticorpos ab-MC-LR. A voltametria de onda quadrada (SWV) foi a técnica escolhida para realizar as medidas eletroquímicas, a qual utilizou-se hidroquinona como sonda redox. Para um melhor desempenho analítico do método proposto, foram otimizados tanto os parâmetros voltamétricos da técnica (frequência, incremento e amplitude), como também os parâmetros de construção do imunossensor, tais como: proporção nanopartícula/água; proporção nanopartícula/anticorpo e pH do eletrólito suporte. Sob condições otimizadas, foi construída uma curva de calibração para a MC-LR, a qual obteve-se uma faixa de trabalho de 0,1 a 500 ng mL<sup>-1</sup>. A exatidão do método foi avaliada a partir de um ensaio de recuperação, o qual também foi utilizado para a posterior determinação de MC-LR na amostra. A partir dos dados experimentais obtidos, foi possível concluir que o recobrimento da superfície de GCE com o filme MGNnP-PEI, aumentou consideravelmente a resposta do imunossensor. O dispositivo desenvolvido também apresentou: simplicidade de construção; linearidade na faixa de trabalho empregada; alta sensibilidade; seletividade razoável e baixo limite de detecção (0,053 ng mL<sup>-1</sup>). Além disso, o método proposto obteve boa repetibilidade intra-day (RSD% = 1,09%) e inter-day (RSD% = 2,44%), assim como, boa porcentagem de recuperação (98,3 a 101,8%), apresentando valores de RSD% entre 0,57 e 13,6% sendo, portanto, o método considerado exato e preciso.

**Palavras-chave:** Microcistina-LR. Imunossensor *label-free*. Magnetita. Polietilenoimina.





## ABSTRACT

This work presents the development of a new electrochemical label-free immunosensor for the detection of microcystin-LR (MC-LR) in Peri Lagoon water (Florianópolis - SC). The immunosensor was constructed by modifying the surface of a glassy carbon electrode (GCE) using, for this purpose, magnetite nanoparticles (MGNnP) stabilized in polyethyleneimine (PEI). This polymeric platform (MGNnP-PEI) was employed in the immobilization of ab-MC-LR antibodies. Square wave voltammetry (SWV) was the technique chosen to perform the electrochemical measurements, which used hydroquinone as redox probe. For better analytical performance of the proposed method, both the voltammetric parameters of the technique (frequency, increment and amplitude), as well as the immunosensor construction parameters were optimized, such as: nanoparticle/water ratio; nanoparticle/antibody ratio and pH of the supporting electrolyte. Under optimized conditions, a calibration curve for MC-LR was constructed, which obtained a working range of 0.1 to 500 ng mL<sup>-1</sup>. The accuracy of the method was evaluated with a recovery assay, which was also used for the subsequent determination of MC-LR in the sample. From the experimental data obtained, it was possible to conclude that the coating of the GCE surface with the MGNnP-PEI film increased the immunosensor response considerably. The developed device also presented: simplicity of construction; linearity in the range of work employed; high sensitivity; moderate selectivity and low detection limit (0.053 ng mL<sup>-1</sup>). In addition, the proposed method obtained good intra-day (RSD% = 1.09%) and inter-day (RSD% = 2.44%) repeatability, as well as a good recovery percentage (98.3 to 101.8 %), presenting values of RSD% between 0.57 and 13.6%, being, therefore, the method considered accurate and precise.

**Keywords:** Microcystin-LR. Immunosensor label-free. Magnetite. Polyethyleneimine.





## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estrutura molecular geral da microcistina, onde X e Y correspondem aos aminoácidos variáveis. .... 37
- Figura 2** – Estrutura química da microcistina-LR. .... 37
- Figura 3** – Relação entre sensibilidade e seletividade de alguns dos métodos empregados na detecção e quantificação das cianotoxinas. RMN: Ressonância Magnética Nuclear; EM: Espectrometria de Massas (FAB – Bombardeamento rápido de átomos e LSI – Espectrometria de Massas de íons secundários); CL/EM: Cromatografia líquida acoplada a Espectrometria de Massas; HPLC: Cromatografia a líquido de alta eficiência; MMPB: método do 2-metil-3-metoxi-4-ácido fenilbutírico; CCD: Cromatografia em camada delgada; ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*. .... 41
- Figura 4** – Organização dos componentes funcionais de um biossensor. O reconhecimento do analito-alvo é feito por um componente biológico (receptor), o qual gera um sinal (A), sendo posteriormente convertido em (B) e processado (C). .... 42
- Figura 5** – Representação esquemática das cadeias constantes e hipervariáveis presentes nos anticorpos, onde **C** = domínios constantes, **V** = domínios variáveis, **L** = cadeia leve, **H** = cadeia pesada e **CH<sub>2</sub>** é o domínio onde está acoplado o carboidrato. .... 44
- Figura 6** – Representação esquemática da interação antígeno/anticorpo. .... 45
- Figura 7** – Representação esquemática das etapas de imunodeteção do método ELISA do tipo direto. .... 46
- Figura 8** – Representação esquemática de um imunossensor eletroquímico não marcado (à esquerda) e resposta de corrente esperada (à direita), utilizando voltametria de onda quadrada (SWV) e hidroquinona como sonda redox, onde (a) representa a medida de corrente na ausência de antígeno e (b) a medida de corrente na presença de antígeno. .... 47
- Figura 9** – Modificação da superfície do eletrodo com a criação de grupos funcionais. .... 49
- Figura 10** – Esquema reacional da ativação pela EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) de suportes contendo grupos

carboxílicos, sendo representadas as seguintes reações: (I) reação direta com grupo amina primária da biomolécula; (II) uma reação de hidrólise que regenera o grupo carboxílico e (III) uma nova ativação com N-hidroxisuccinimida (NHS) formando um intermediário ativado estável à base de um éster amino reativo. .... 51

**Figura 11** – Formação da nanoestrutura do colóide metálico a partir da redução do sal metálico. .... 53

**Figura 12** – Estabilização de nanopartículas por (a) método eletrostático e (b) método estérico. .... 54

**Figura 13** – Estrutura cristalina cúbica de espinel invertido da magnetita ( $Fe_3O_4$ ), onde o oxigênio forma um empacotamento denso fcc (cúbico de face centrada) e os cátions de Fe ( $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ ) ocupam sítios intersticiais tetraédricos e octaédricos. .... 55

**Figura 14** – Ilustração esquemática de um polieletrólito estendido em solução. .... 57

**Figura 15** – Ilustração esquemática de uma conformação compactada de um polieletrólito em solução. .... 57

**Figura 16** – Estrutura da PEI com 25% de aminas primárias, 50% de aminas secundárias e 25% de aminas terciárias. .... 58

**Figura 17** – Configuração de uma célula eletroquímica contendo três eletrodos: 1) eletrodo de referência; 2) eletrodo de trabalho e 3) eletrodo auxiliar (contra-eletrodo). .... 63

**Figura 18** – Representação esquemática da aplicação de potencial em função do tempo (à esquerda) e voltamograma cíclico (à direita), onde:  $E_{pa}$  – potencial de pico anódico;  $E_{pc}$  – potencial de pico catódico;  $i_{pa}$  – corrente de pico anódica;  $i_{pc}$  – corrente de pico catódica;  $\Delta E_p$  – Diferença de potencial de pico; Red – espécie reduzida e Ox – espécie oxidada. .... 64

**Figura 19** – Forma de aplicação de pulsos sobre uma rampa linear de potencial (A) e voltamograma esquemático (corrente *versus* potencial) da voltametria de pulso diferencial (B). .... 65

**Figura 20** – Aplicação de pulsos sobre uma rampa de potencial na forma de escada (*staircase*), tendo como resultado o voltamograma de onda quadrada (à direita), onde  $E_\infty$  representa a altura do pulso,  $E_{etapa}$  corresponde à altura do degrau de potencial e  $\tau$  o período de aplicação do pulso. .... 66

<b>Figura 21</b> – Diagrama de Nyquist baseado no circuito de <i>Randles-Ershler</i> , onde ( $C_{dl}$ ) representa a capacitância da dupla camada elétrica; ( $R_s$ ) a resistência da solução; ( $R_{ct}$ ) a resistência à transferência de carga e ( $Z_w$ ) a impedância de Warburg. Inserido: circuito de <i>Randles-Ershler</i> . .....	68
<b>Figura 22</b> – Etapas de síntese e lavagem das nanopartículas de magnetita (MGNnP). .....	71
<b>Figura 23</b> – Preparo da suspensão de nanopartículas de magnetita (MGNnP) estabilizadas em PEI. ....	72
<b>Figura 24</b> – Etapas envolvidas na construção do imunossensor. .....	73
<b>Figura 25</b> – Representação esquemática do funcionamento do imunossensor eletroquímico baseado na oxidação da sonda redox, hidroquinona ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em solução tampão PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ; pH 7,5) por SWV: (a) resposta de corrente referente à modificação da superfície de GCE pela mistura MGNnP-PEI-ab-MC-LR-BSA; (b) medida de corrente na presença do antígeno (MC-LR). .....	77
<b>Figura 26</b> – Voltamogramas obtidos para as técnicas eletroanalíticas: (a) SWV e (b) DPV, utilizando-se o eletrodo GCE modificado com MGNnP em eletrólito suporte PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5) e sonda redox hidroquinona ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ). .....	79
<b>Figura 27</b> – Voltamogramas de onda quadrada obtidos utilizando-se o eletrodo de carbono vítreo modificado com: (a) CGE/MGNnP-Nafion e (b) CGE/MGNnP-PEI, em eletrólito suporte PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5) e sonda redox hidroquinona ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ). .....	80
<b>Figura 28</b> – Voltamogramas obtidos a partir da técnica SWV, os quais representam os sinais de corrente resultante ( $\Delta i$ ) referentes ao estudo da frequência na faixa de 20 a 100 Hz, em eletrólito suporte PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5) e sonda redox hidroquinona ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ). .....	82
<b>Figura 29</b> – Voltamogramas obtidos a partir da técnica SWV, os quais representam os sinais de corrente resultante ( $\Delta i$ ) referentes ao estudo do incremento de potencial na faixa de 2 a 7 mV, em eletrólito suporte PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5) e sonda redox hidroquinona ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ). .....	82
<b>Figura 30</b> – Voltamogramas obtidos a partir da técnica SWV, os quais representam os sinais de corrente resultante ( $\Delta i$ ) referentes ao estudo da amplitude na faixa de 20 a 100 mV, em eletrólito suporte PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5) e sonda redox hidroquinona ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ). .....	83

**Figura 31** – Estudo da resposta relativa de corrente em função das proporções (1:1, 1:2 e 1:3) de MGNnP-PEI/água utilizadas na construção do imunossensor proposto, sendo este estudo, obtido a partir da técnica SWV, em eletrólito suporte PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5) e sonda redox hidroquinona (0,1 mmol L<sup>-1</sup>). ..... 84

**Figura 32** – Estudo da resposta relativa de corrente em função das proporções (2:1, 1:1, 1:2 e 1:3) de MGNnP-PEI/ab-MC-LR utilizadas na construção do imunossensor proposto, sendo este estudo, obtido a partir da técnica SWV, em eletrólito suporte PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5) e sonda redox hidroquinona (0,1 mmol L<sup>-1</sup>). ..... 85

**Figura 33** – Resposta relativa dos valores de supressão obtidas para o imunossensor nos tempos de incubação de 10, 20, 30 e 40 min, sendo este estudo realizado por SWV, utilizando-se uma solução padrão 1,0 ng mL<sup>-1</sup> do antígeno MC-LR, em eletrólito suporte PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5) e sonda redox hidroquinona (0,1 mmol L<sup>-1</sup>). ..... 86

**Figura 34** – Voltamogramas de onda quadrada obtidos para as diversas etapas na construção do imunossensor: (a) GCE não modificado; (b) GCE/MGNnP-PEI; (c) GCE/MGNnP-PEI-ab-MC-LR e (d) GCE/MGNnP-PEI-ab-MC-LR-(MC-LR), utilizando como sonda redox hidroquinona 0,1 mmol L<sup>-1</sup> em tampão PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>; pH 7,5). ... 87

**Figura 35** – Estudo da corrente resultante  $\Delta i$  obtida para os eletrólitos suporte fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0) e PBS 0,01 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0 e 7,5), sendo as medidas eletroquímicas realizadas por SWV, sonda redox hidroquinona 0,1 mmol L<sup>-1</sup> e eletrodos de carbono vítreo modificados, separadamente, pelos filmes poliméricos MGNnP-Nafion (à esquerda) e MGNnP-PEI (à direita). ..... 89

**Figura 36** – Estudo da resposta relativa de corrente obtida para o eletrólito suporte PBS 0,01 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0, 7,5 e 8,0), sendo as medidas eletroquímicas realizadas por SWV, sonda redox hidroquinona 0,1 mmol L<sup>-1</sup> e eletrodo de carbono vítreo modificado pelo filme polimérico MGNnP-PEI..... 90

**Figura 37** – Voltamogramas cíclicos obtidos para as diversas etapas na construção do imunossensor: (a) GCE não modificado; (b) GCE/MGNnP-PEI; (c) GCE/MGNnP-PEI-ab-MC-LR e (d) GCE/PEI em solução de KCl (0,1 mol L<sup>-1</sup>) contendo [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> (5 mmol L<sup>-1</sup>). ..... 91

**Figura 38** – Diagrama de Nyquist obtido para os seguintes sistemas: (a) GCE/MGNnP-PEI-anti-MC-LR; (b) GCE/MGNnP-PEI; (c) GCE não modificado e (d) GCE/PEI. A amplitude aplicada foi a de 10 mV, na faixa de frequência de 100000 a 0,1 Hz, em solução de KCl (0,1 mol L<sup>-1</sup>) contendo o par redox [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> (5 mmol L<sup>-1</sup>)..... 92

**Figura 39** – Micrografias obtidas em um microscópio de transmissão eletrônica (TEM 100 keV) para os sistemas: (a) MGNnP-PEI e (b) MGNnP-PEI-ab-MC-LR..... 93

**Figura 40** – Estudo de compostos potencialmente interferentes na reposta do imunossensor, sendo as medidas eletroquímicas realizadas por SWV, sonda redox hidroquinona 0,1 mmol L<sup>-1</sup> e eletrodo de carbono vítreo modificado pelo filme polimérico MGNnP-PEI..... 95

**Figura 41** – Voltamogramas obtidos, por SWV, em PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5), com soluções padrão nas seguintes concentrações: (a) 0,0; (b) 0,1; (c) 0,5; (d) 5,0 e (e) 50,0 e (f) 500,0 ng mL<sup>-1</sup> de MC-LR..... 98

**Figura 42** – Curva de calibração para a MC-LR, obtida em PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5), com soluções padrão nas seguintes concentrações: (i) 0,1; (ii) 0,5; (iii) 5,0; (iv) 50,0 e (v) 500,0 ng mL<sup>-1</sup> de MC-LR..... 98



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Aminoácidos (D-aminoácidos, aminoácidos fixos e L-aminoácidos variáveis) que compõem a estrutura molecular da microcistina. ....	36
<b>Tabela 2</b> – Toxicidade de algumas formas de microcistina. ....	38
<b>Tabela 3</b> – Tipos de imunossensores com exemplos de substratos, transdutores, camada sensora e aplicação. ....	61
<b>Tabela 3</b> – Continuação. ....	62
<b>Tabela 4</b> – Respectivos volumes de amostra e do padrão de MC-LR (500 ng mL <sup>-1</sup> ) adicionados no preparo das soluções padrão utilizadas para o ensaio de recuperação da MC-LR. ....	75
<b>Tabela 5</b> – Estudo de recuperação para a MC-LR em amostra de água da Lagoa do Peri, utilizando o imunossensor proposto. ....	100
<b>Tabela 6</b> – Dados comparativos de diferentes imunossensores eletroquímicos para detecção de microcistina-LR. ....	102





## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ab-MC-LR – Anticorpo anti-microcistina-LR  
ADDA – Ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico  
Ag/AgCl – Eletrodo de referência prata/cloreto de prata  
AgNP-Nafion-xGnP – Nanopartículas de prata estabilizadas em Nafion com nanoplaquetas de grafite  
Ala – Alanina  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
AR – Alanina, arginina  
Arg – Arginina  
Au – Nanopartículas de ouro  
BSA – Albumina do soro bovino (*Bovine serum albumin*)  
CCD – Cromatografia em camada delgada  
C<sub>dl</sub> – Capacitância da dupla camada elétrica  
CN – Nanoesfera de carbono (*Carbon nanosphere*)  
CNPs – Nanofibras de carbono (*Carbon nanofibers*)  
CN<sub>x</sub>-MWNTs – Nanotubos de carbono de parede múltipla dopada com nitrogênio  
CS – Quitosana (*Chitosan*)  
CV – Voltametria cíclica (*Cyclic voltammetry*)  
DPV – Voltametria de pulso diferencial (*Differential pulse voltammetry*)  
EIS – Espectroscopia de impedância eletroquímica (*Electrochemical impedance spectroscopy*)  
ELISA – Ensaio imunoenzimático (*Enzyme linked immuno sorbent assay*)  
E<sub>pa</sub> – Potencial de pico anódico  
E<sub>pc</sub> – Potencial de pico catódico  
FAB – Bombardeamento rápido de átomos (*Fast atom bombardment*)  
GCE – Eletrodo de carbono vítreo (*Glassy carbon electrode*)  
GNP – Nanopartículas de ouro  
GS – Folha de grafeno  
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (*High performance liquid chromatography*)  
HRP – Peroxidase de raiz forte (*Horseradish Peroxidase*)  
INMETRO – Instituto Nacional de Meteorologia  
i<sub>rel</sub> % – Porcentagem de corrente suprimida  
LCME – Laboratório central de microscopia eletrônica  
LC-MS – Cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas (*Liquid chromatography and mass spectrometry*)

LD – Limite de detecção (*Limit of detection*)  
Leu – Leucina  
LQ – Limite de quantificação (*Limit of quantification*)  
LR – Leucina, arginina  
MC – Microcistina  
MC-LR – Microcistina-LR  
Mdha – N-metildehidroalanina  
Met – Metionina  
MGNnP-PEI – Nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) estabilizadas em polietilenoimina  
MMPB – Ácido 2-metil-3-metóxi-4-fenilbutírico  
MS – Espectrometria de massas (*Mass spectrometry*)  
MSN – Sílica mesoporosa (*Mesoporous sílica*)  
NP – Nanopartículas  
PBS – Tampão fosfato salino (*Phosphate buffer saline*)  
PEG – Polietilenoglicol  
PEI – Polietilenoimina  
 $R_{ct}$  – Resistência à transferência de carga (*Charge-transfer resistance*)  
 $R_s$  – Resistência da solução eletrolítica  
RSD – Desvio padrão relativo (*Relative standard deviation*)  
SPE – Eletrodo impresso (*Screen-printed electrode*)  
SWV – Voltametria de onda quadrada (*Square-wave voltammetry*)  
TEM – Microscopia eletrônica de transmissão (*Transmission electron microscopy*)  
Tyr – Tirosina  
vs – versus  
xGnP – Nanoplaquetas esfoliadas de grafite  
YR – Tirosina, arginina  
 $Z'$  – Componente real da impedância  
 $Z''$  – Componente imaginária da impedância  
 $Z_w$  – Impedância de Warburg  
 $\Delta E_p$  – Diferença de potencial de pico  
 $\Delta i$  – Corrente de pico resultante

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>31</b>
1.1	OBJETIVOS .....	33
1.1.1	Objetivo geral .....	33
1.1.2	Objetivos específicos .....	33
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>35</b>
2.1	MICROCISTINA.....	35
2.1.1	Principais métodos de determinação de microcistina .....	39
2.1.1.1	Métodos bioquímicos de <i>screening</i> para análise de cianotoxinas.....	39
2.1.1.2	Métodos físico-químicos para a análise de cianotoxinas .....	40
2.2	BIOSSENSORES.....	41
2.2.1	Definição e princípio de funcionamento.....	42
2.2.2	Aspectos básicos de imunologia .....	43
2.2.3	Imunossensores eletroquímicos.....	46
2.2.4	Imobilização de biomoléculas sobre a superfície do eletrodo .....	48
2.2.5	Reações covalentes de imobilização .....	49
2.2.6	Adsorção .....	51
2.2.7	Modificação do eletrodo com filmes poliméricos.....	52
2.2.8	Nanopartículas metálicas (MnPs).....	53
2.2.9	Magnetita .....	55
2.2.10	Polieletrólitos .....	56
2.2.11	Estabilização de nanopartículas em polietilenoimina (PEI) .....	58
2.2.12	Aplicação de imunossensores .....	59
2.2.13	Voltametria .....	63
2.2.14	Espectroscopia de impedância eletroquímica .....	67
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>69</b>
3.1	REAGENTES E MATERIAIS .....	69

3.2	INSTRUMENTAÇÃO .....	70
3.3	METODOLOGIA .....	70
3.3.1	Síntese das nanopartículas de magnetita (MGNnP) .....	70
3.3.2	Preparo da suspensão de nanopartículas de magnetita estabilizadas em PEI (MGNnP-PEI) .....	71
3.3.3	Construção do imunossensor .....	72
3.3.4	Medidas eletroquímicas.....	73
3.3.5	Precisão e estabilidade do método .....	73
3.3.6	Exatidão do método e quantificação de MC-LR.....	74
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	77
4.1	PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DO IMUNOSSENSOR .....	77
4.2	ESCOLHA DA TÉCNICA VOLTAMÉTRICA.....	78
4.3	ESTUDO DE ESTABILIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS .....	79
4.4	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA TÉCNICA VOLTAMÉTRICA.....	81
4.5	ESTUDO DA PROPORÇÃO NANOPARTÍCULA/ÁGUA	83
4.6	ESTUDO DA PROPORÇÃO MGNnP-PEI/ANTICORPO .	84
4.7	ESTUDO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO DO ANTÍGENO .. .....	85
4.8	ESTUDO DA CONTRIBUIÇÃO DO MODIFICADOR .....	87
4.9	ESTUDO DO pH DO ELETRÓLITO SUPORTE .....	88
4.10	COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO .....	90
4.11	CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS MGNnP-PEI e MGNnP-PEI-ab-MC-LR.....	93
4.12	ESTUDO DA SELETIVIDADE DO MÉTODO.....	94
4.13	ESTUDO DA PRECISÃO E ESTABILIDADE DO MÉTODO .....	96
4.14	CURVA DE CALIBRAÇÃO, INTERVALO DE TRABALHO, LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO .....	97

4.15	ESTUDO DE RECUPERAÇÃO E APLICAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO .....	99
4.16	DETERMINAÇÃO DE MC-LR.....	100
4.17	COMPARAÇÃO COM A LITERATURA.....	101
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>103</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>105</b>



## 1 INTRODUÇÃO

As cianobactérias, anteriormente denominadas algas azuis, são micro-organismos pertencentes ao grupo das bactérias, aos quais realizam fotossíntese e, como produtoras primárias, constituem a base da cadeia alimentar aquática. Apesar da sua positiva contribuição para o meio ambiente, estes micro-organismos são responsáveis pela produção de uma toxina denominada cianotoxina, a qual apresenta elevados riscos de toxicidade e pode trazer sérios riscos à saúde pública (CRUZ *et al.*, 2016).

A microcistina é um tipo de cianotoxina que pode ser encontrada em água doce ou salgada e que, quando ingerida, afeta diretamente o fígado, podendo causar vômito, cefaléia, hepato-enterite, gastroenterite e, eventualmente, câncer nos casos de intoxicação crônica. Dentre as formas de microcistinas que podem ser encontradas (LR, LA, RR e YR), a microcistina-LR (MC-LR) é a mais frequente e também a mais tóxica, apresentando uma  $DL_{50}$  de 50  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso corporal (BUTLER *et al.*, 2009).

Geralmente, a detecção e quantificação de cianotoxinas são realizadas empregando-se métodos físico-químicos ou ensaios biológicos e bioquímicos. Muitos dos procedimentos reportados na literatura e utilizados nos dias atuais empregam o uso do HPLC (BORTOLI; PINTO, 2015). Porém, esta técnica exige equipamentos de alto custo, pré-tratamentos demorados e operadores especializados, surgindo dessa forma, a necessidade do desenvolvimento de técnicas mais rápidas, portáteis e de menor custo, como é o caso dos imunossensores eletroquímicos. (ZHANG, J. *et al.*, 2010; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2014; HOU *et al.*, 2016).

A detecção de cianotoxinas por meio de imunossensores é realizada a partir de interações entre a cianotoxina (antígeno) e anticorpos imobilizados sobre a superfície de um transdutor (interface eletrônica). Do ponto de vista analítico, as interações antígeno/anticorpo podem ser monitoradas por métodos que utilizam o anticorpo não marcado (método direto) e métodos que empregam o anticorpo marcado (método indireto) (RICCARDI; COSTA; YAMANAKA, 2002).

Os imunossensores eletroquímicos nem sempre necessitam do uso de anticorpos marcados. Neste caso, a resposta referente à formação do imunocomplexo é dada por meio de uma molécula eletroativa denominada sonda redox ou mediadora redox, sendo este procedimento conhecido como método direto ou *label-free*. Neste método,

inicialmente aplica-se um potencial à sonda redox de modo que haja a transferência de elétrons da sonda redox para a superfície do eletrodo. Com o objetivo de aumentar a sensibilidade e seletividade do imunossensor, geralmente utilizam-se modificadores químicos, pois além de facilitarem a transferência de elétrons que ocorre na interface eletrodo/solução, auxiliam na imobilização de biomoléculas como anticorpos e antígenos (ZANATO, 2016; ZAPP, 2014).

O uso de imunossensores tem apresentado várias vantagens como, por exemplo, a detecção analítica *in situ* e em tempo real, baixo custo, alta sensibilidade e seletividade, possibilidade de miniaturização e facilidade em termos de desenvolvimento e portabilidade. Estas características levam estes sensores a se tornarem uma importante ferramenta analítica empregada no monitoramento de poluentes aquáticos, em análises clínicas e na investigação de interações biomoleculares (MEHRVAR; ABDI, 2004; SONG *et al*, 2006).

Tendo em vista que estudos realizados na Lagoa do Peri (Florianópolis – SC) revelaram a presença de altas densidades de cianobactérias que variam entre  $587.884 \text{ cél mL}^{-1}$  e  $1.126.250 \text{ cél mL}^{-1}$ , o que exige análise com frequência semanal de cianotoxinas, o presente trabalho visa determinar a concentração de microcistina-LR na água da Lagoa do Peri. Para isso, foi desenvolvido um novo imunossensor eletroquímico *label-free*, construído a partir da modificação da superfície de um eletrodo de carbono (GCE) utilizando, como modificador, nanopartículas de magnetita (MGNnP) estabilizadas em polietilenoimina (PEI).



## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo principal desenvolver um novo imunossensor eletroquímico à base nanopartículas de magnetita (MGNNP) estabilizadas em polietilenoimina (PEI) para a detecção de microcistina-LR na água da Lagoa do Peri (Florianópolis – SC).

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Sintetizar as nanopartículas de magnetita (MGNNP);
- Caracterizar morfológicamente as nanopartículas (MGNNP) através de microscopia de transmissão eletrônica (TEM);
- Selecionar a técnica voltamétrica que será utilizada para as medidas eletroquímicas;
- Estudar a estabilização das MGNNPs utilizando, como agentes estabilizantes, os polímeros PEI e Nafion;
- Utilizar a plataforma polimérica para imobilizar anticorpos ab-MC-LR sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo (GCE);
- Otimizar os parâmetros (frequência, incremento e amplitude) da técnica voltamétrica escolhida;
- Otimizar parâmetros de construção do imunossensor, tais como: proporções de nanopartícula/água e de nanopartícula/anticorpo; tempo de incubação do antígeno e pH do eletrólito suporte;
- Utilizar as técnicas voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) para avaliar o comportamento eletroquímico referente à modificação da superfície do eletrodo;
- Construir curva de calibração para MC-LR;
- Avaliar a seletividade do método por meio do estudo de interferentes;
- Avaliar a linearidade, precisão e estabilidade do imunossensor desenvolvido;
- Avaliar a exatidão do método por meio de um estudo recuperação;
- Determinar a concentração de MC-LR presente na amostra de Lagoa do Peri utilizando o imunossensor proposto.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 MICROCISTINA

As cianobactérias, comumente conhecidas como algas azuis, são micro-organismos unicelulares procariontes pertencentes ao grupo das bactérias. Estes organismos são capazes de realizar fotossíntese e, como produtoras primárias, constituem juntamente com os demais organismos fitoplantônicos, a base da cadeia alimentar aquática. Apesar da sua positiva contribuição para o meio ambiente, estes microorganismos são responsáveis pela produção de uma toxina denominada cianotoxina, a qual apresenta elevados níveis de toxicidade e pode trazer sérios riscos à saúde pública (CRUZ *et al.*, 2016).

Considerando suas propriedades toxicológicas, as cianotoxinas podem ser classificadas em: (i) hepatotóxicas (microcistina e nodularinas); (ii) neurotóxicas (anatoxina-a, homoanatoxina-a, anatoxina-a(s) e saxitoxinas); (iii) citotóxica (cilindrospermopsina) e (iv) dermatotoxinas (toxinas lipopolissacarídicas, comuns a várias espécies de cianobactérias) (CHORUS; BARTRAM, 1999; VAN APELDOORN *et al.*, 2007).

O tipo mais comum de intoxicação envolvendo cianobactérias é ocasionado por hepatotoxinas, as quais podem causar mal-estar, vômitos, cefaléia, hepato-enterite, gastroenterite e, possivelmente, câncer nos casos de intoxicação crônica. Dentre as hepatotoxinas, as microcistinas são as mais comuns em ambientes de água doce, e são produzidas por alguns gêneros de cianobactérias, tais como: *Anabaena*; *Planktothrix*; *Nostoc*; *Hapalosiphon*; *Synechocystis*; *Aphanocapsa*; *Oscillatoria* e principalmente, pela *Microcystis aeruginosa* (CHORUS; BARTRAM, 1999; FALCONER, 2005; VAN APELDOORN *et al.*, 2007; JAMES *et al.*, 2008; PEGRAM *et al.*, 2008). Esta grande variedade de cepas potencialmente produtoras, bem como a frequência com que estas são observadas, fazem da microcistina um importante padrão para o estudo de toxicidade em florações de cianobactérias (YOO *et al.*, 1995).

A microcistina é um heptapeptídeo cíclico formado estruturalmente por dois **aminoácidos fixos** (Adda e Mdha), **três D-aminoácidos** (D-alanina, ácido D-*eritro*- $\beta$ -metil aspártico e ácido D-glutâmico) e dois **L-aminoácidos variáveis** presentes, respectivamente, nas posições X e Y (Figura 2). A posição X pode ser ocupada pelos aminoácidos leucina (L), arginina (R) ou tirosina (Y). Já a posição Y

pode ser ocupada por um dos seguintes aminoácidos: arginina (R), alanina (A) ou metionina (M) (BORTOLI; PINTO, 2015).

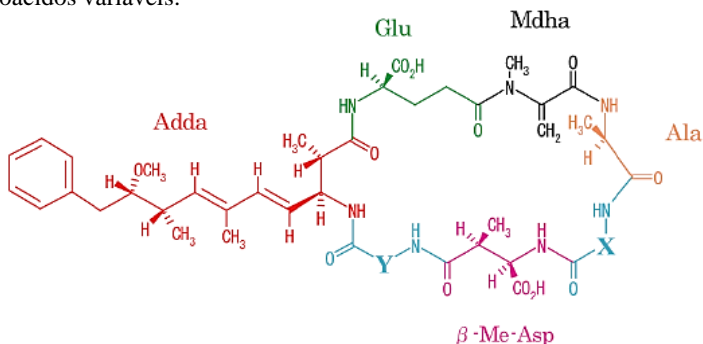
Conforme o par de aminoácidos variáveis presentes em sua estrutura molecular, as microcistinas podem ser classificadas como: i) microcistina-LR (leucina e arginina); ii) microcistina-RR (arginina e arginina); iii) microcistina-LA (leucina e alanina); iv) microcistina-YR (tirosina e arginina); v) microcistina-YA (tirosina e alanina) e vi) microcistina-YM (tirosina e metionina) (ANACLETO, 2016; LEAL; SOARES, 2004). Os aminoácidos presentes na estrutura molecular geral da microcistina (Tabela 1), bem como a estrutura química da microcistina-LR, podem ser observados nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

**Tabela 1** – Aminoácidos (D-aminoácidos, aminoácidos fixos e L-aminoácidos variáveis) que compõem a estrutura molecular da microcistina.

Aminoácidos	Abreviatura	Nomenclatura
D-aminoácidos	D-Ala	D-Alanina
	$\beta$ -MeAsp	Ácido D- <i>eritro</i> - $\beta$ -metil aspártico
	D-Glu	Ácido D-glutâmico
Aminoácidos fixos	Adda	Ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico
	Mdha	N-metildehidroalanina
L-aminoácidos variáveis	L = Leu	Leucina
	R = Arg	Arginina
	A = Ala	Alanina
	Y = Tyr	Tirosina
	M = Met	Metionina

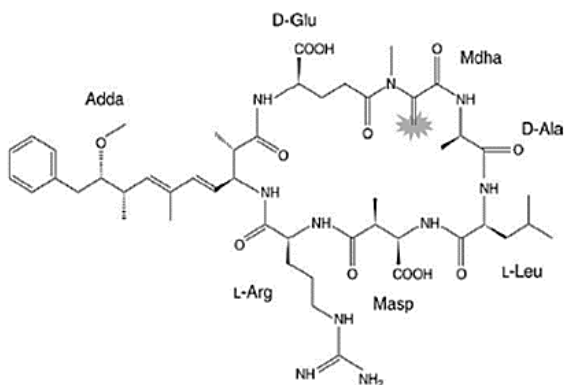
Fonte: Autoria própria (2018).

**Figura 1** – Estrutura molecular geral da microcistina, onde X e Y correspondem aos aminoácidos variáveis.



Fonte: Anacleto (2016).

**Figura 2** – Estrutura química da microcistina-LR.



Fonte: Timbrell (2009).

Dentre as formas gerais de microcistinas que podem ser encontradas, a microcistina-LR (MC-LR) é a forma mais frequente em reservatórios de água e também a mais tóxica, apresentando uma  $DL_{50}$  de 50  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso corporal (BUTLER *et al.*, 2009).

Estas toxinas afetam diretamente o fígado, podendo levar a morte num intervalo de poucos dias ou, até mesmo, poucas horas (BITTENCOURT-OLIVEIRA; OLIVEIRA; BOLCH, 2002). A Tabela 2 apresenta algumas formas de microcistina de acordo com o nível de toxicidade.

**Tabela 2** – Toxicidade de algumas formas de microcistina.

Microcistina	DL50* ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )
MC-LR	50
[D-Asp <sup>3</sup> ] MC-LR	160 - 300
[Dha <sup>7</sup> ] MC-LR	250
MC-RR	600
[Dha <sup>7</sup> ] MC-RR	180
MC-YR	70

\*Toxicidade determinada por via intraperitoneal em ratos ( $\mu\text{g}$  de toxina/ $\text{Kg}$  de peso corpóreo). A DL50\* representa o valor da dose de toxina letal a 50 % dos animais expostos.

Fonte: Chorus e Bartram (1999); Furey *et al.* (2008).

As florações tóxicas são consideradas como um dos maiores problemas em ecossistemas de água doce. Em 1996, um surto de doença ocorreu em uma clínica de hemodiálise em Caruaru (Pernambuco, Brasil). Após o tratamento de hemodiálise nesta clínica, 116 dos 131 pacientes apresentaram distúrbios visuais, náusea, vômito e fraqueza muscular. Posteriormente, 100 pacientes desenvolveram insuficiência hepática aguda. Em dezembro de 1996, 52 das mortes poderiam ser atribuídas a uma síndrome comum agora chamada de "Síndrome de Caruaru" (AZEVEDO *et al.*, 2002). Inicialmente, a causa apontada pela Secretária Estadual de Saúde foi hepatite tóxica. Posteriormente, foram realizadas investigações com as quais se tornou possível concluir que a morte dos pacientes foi provocada por uma toxina chamada microcistina, a qual estava presente na água de hemodiálise (DANTAS, 2016).

De acordo com a atual legislação vigente – Portaria MS/GM nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011, cabe aos responsáveis pelos sistemas de abastecimento de água, realizar o monitoramento de cianobactérias no ponto de captação de mananciais superficiais. Esta nova legislação também estabelece que o valor máximo de microcistinas permitido na água de abastecimento público é de  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ , porém para águas de

abastecimento de hospitais que realizam hemodiálise, esse valor tem que ser igual à zero (BRASIL, 2011; BRASIL, 2016)

Em Florianópolis (SC), a Lagoa do Peri é o maior corpo de água doce utilizado pela CASAN para abastecimento das populações do leste e sul da ilha. Devido a sua importância, vários estudos têm sido realizados no local, os quais revelaram a presença significativa de cianobactérias produtoras de toxinas (SYLVÉUS, 2012).

Estudos realizados por Sylvéus (2012), no Laboratório de Ficologia do Departamento de Botânica (UFSC), demonstraram que as espécies de cianobactérias *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Limnothrix sp* e *Planktolyngbya limnetica*, foram encontradas em densidades elevadas em amostras da Lagoa do Peri. As densidades encontradas, variaram entre 587.884 cél mL<sup>-1</sup> e 1.126.250 cél mL<sup>-1</sup>, sendo superiores a 20.000 cél mL<sup>-1</sup>, o que exige análise com frequência semanal de cianotoxinas na água do manancial. Este estudo mostrou também, que análises de microcistinas devem ser feitas já que foram encontradas densidades de *Planktolyngbya limnetica* e *Limnothrix sp.* maiores que 10.000 cel mL<sup>-1</sup> (SYLVÉUS, 2012).

### 2.1.1 Principais métodos de determinação de microcistina

Geralmente, a detecção e quantificação das cianotoxinas são realizadas empregando-se dois métodos: (i) ensaios biológicos ou bioquímicos de *screening* (rastreamento, reconhecimento ou varredura) e (ii) métodos físico-químicos. A escolha da técnica a ser empregada dependerá da disponibilidade e experiência com o método em questão, bem como o tipo de informação que se pretende obter. Os critérios mais importantes e, que devem ser avaliados antes da escolha da técnica empregada, são a seletividade e a sensibilidade (BORTOLI; PINTO, 2015; MSAGATI *et al.*, 2006).

#### 2.1.1.1 Métodos bioquímicos de *screening* para análise de cianotoxinas

Os ensaios de *screening* (varredura) são testes de diagnóstico que estabelecem a presença ou ausência de uma substância. Geralmente esses testes fornecem resultados rápidos, baratos e reprodutíveis. Dentre os métodos bioquímicos de *screening*, encontram-se os bioensaios em ratos ou camundongos, o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e ensaios de inibição da proteína fosfatase (MSAGATI *et al.*, 2006).

Os bioensaios em ratos foram amplamente utilizados para determinar a toxicidade do material proveniente de florações, apresentando o resultado qualitativo de, por exemplo, uma floração ser ou não tóxica (NICHOLSON; BURCH, 2001).

O ensaio ELISA ou enzima imunoensaio, foi desenvolvido para a detecção de microcistinas e provou ser um método muito sensível. É bastante utilizado em amostras ambientais e é um ótimo método de *screening*, pois detecta pequenas concentrações de microcistinas. (KFIR *et al.*, 1986).

O ensaio de inibição da proteína fosfatase foi desenvolvido para a detecção e quantificação de microcistinas e nodularinas. Este método, baseia-se no mecanismo de ação destas cianotoxinas, o qual está relacionado com a inibição das porções serina e treonina das proteínas fosfatases 1 e 2A (MSAGATI *et al.*, 2006).

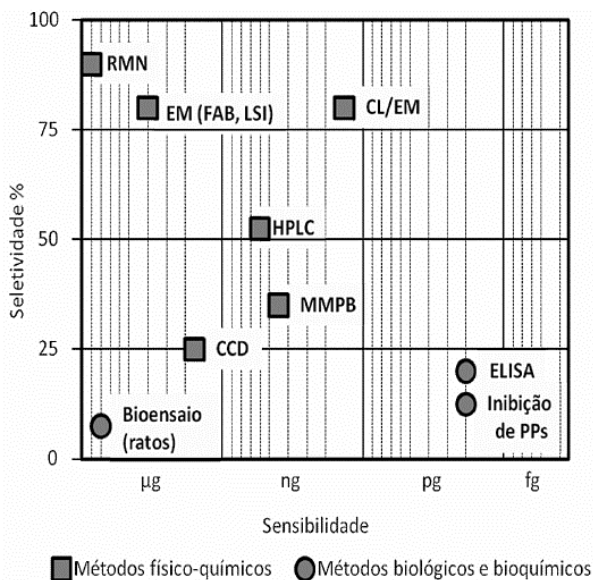
#### 2.1.1.2 Métodos físico-químicos para a análise de cianotoxinas

Estes são métodos analíticos que utilizam propriedades físico-químicas das cianotoxinas como, por exemplo, a massa molecular. Entre os métodos empregados estão cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (IKAWA *et al.*, 1999), eletroforese capilar (CE) (LI *et al.*, 1999), ressonância magnética nuclear (RMN) (HARADA *et al.*, 1995), espectrometria de massas (MS) e cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas (LC/MS) (ROBILLOT *et al.*, 2000).

Muitos dos procedimentos reportados e utilizados nos dias atuais para a separação, identificação e quantificação das cianotoxinas, empregam o uso do HPLC. A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (HPLC/MS) é considerado o método mais confiável para a detecção de microcistina, pois este método apresenta uma eficiente correção do efeito de matriz (BORTOLI; PINTO, 2015). Porém, exige equipamentos de alto custo, pré-tratamentos demorados e operadores especializados, surgindo dessa forma, a necessidade do desenvolvimento de novas técnicas mais rápidas, portáteis e de menor custo, como os imunossensores eletroquímicos (ZHANG, J. *et al.*, 2010; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2014; HOU *et al.*, 2016). Na Figura 3 está apresentada uma comparação entre a sensibilidade e seletividade dos diferentes métodos de detecção de cianotoxinas reportados na literatura.



**Figura 3** – Relação entre sensibilidade e seletividade de alguns dos métodos empregados na detecção e quantificação das cianotoxinas. RMN: Ressonância Magnética Nuclear; EM: Espectrometria de Massas (FAB – Bombardeamento rápido de átomos e LSI – Espectrometria de Massas de íons secundários); CL/EM: Cromatografia líquida acoplada a Espectrometria de Massas; HPLC: Cromatografia a líquido de alta eficiência; MMPB: método do 2-metil-3-metoxi-4-ácido-fenilbutírico; CCD: Cromatografia em camada delgada; ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*.



Fonte: Chorus e Bartram (1998); Msagati *et al.* (2006).

De acordo com a Figura 3, observa-se que a técnica que apresenta maior seletividade é o RMN, porém essa técnica possui baixa sensibilidade. Já os ensaios biológicos ELISA e inibição das proteínas fosfatases, apresentam-se como os métodos mais sensíveis, já que conseguem detectar concentrações na ordem de  $10^{-12}$  g (picograma), contudo estes métodos são pouco seletivos. No caso do ensaio ELISA, a baixa seletividade deve-se ao fato de anticorpos desenvolvidos para uma toxina específica, como por exemplo, a microcistina-LA, também reconhecerem outras formas de microcistinas (KFIR *et al.*, 1986).

## 2.2 BIOSSENSORES

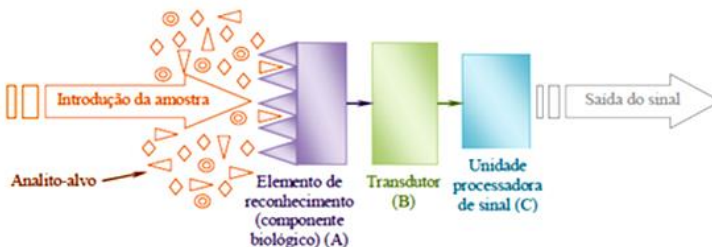
### 2.2.1 Definição e princípio de funcionamento

Biossensor pode ser definido como um dispositivo de análise que utiliza reações biológicas para a detecção de uma determinada espécie de interesse. Este dispositivo tem como princípio de funcionamento, a imobilização de um material de origem biológica (enzima, organela, tecido animal ou vegetal, microrganismo, antígeno, anticorpo, ácidos nucleicos ou lectina) sob a superfície de um transdutor (interface eletrônica) (FATIBELLO FILHO; CAPELATO, 1992; RICCARDI; COSTA; YAMANAKA, 2002).

O uso desses sensores apresenta várias vantagens como, por exemplo, a detecção analítica *in situ* e em tempo real, baixo custo, alta sensibilidade e seletividade, possibilidade de miniaturização e facilidade em termos de desenvolvimento e portabilidade. Estas características levam os biossensores a se tornarem uma importante ferramenta analítica empregada no monitoramento de poluentes aquáticos, em análises clínicas e na investigação de interações biomoleculares. Contudo, para os biossensores eletroquímicos, existem certas limitações que estão relacionadas com interferências eletroquimicamente ativas na amostra, pouca estabilidade em longo prazo e problemas de transferência de elétrons (MEHRVAR; ABDI, 2004; SONG *et al.*, 2006).

Estruturalmente, os biossensores apresentam os seguintes componentes funcionais: **i)** elemento de reconhecimento molecular; **ii)** sistema de detecção (transdutor) e **iii)** unidade processadora de sinal (LEE *et al.*, 2008). A organização destes componentes funcionais encontra-se ilustrada na Figura 4:

**Figura 4** – Organização dos componentes funcionais de um biossensor. O reconhecimento do analito-alvo é feito por um componente biológico (receptor), o qual gera um sinal (A), sendo posteriormente convertido em (B) e processado (C).



Fonte: Adaptado por Calil e Silva (2011).

O sistema de reconhecimento molecular é constituído por componentes biológicos que interagem com o analito alvo e geram sinal que posteriormente será convertido pelo transdutor. Funcionalmente, o componente biológico é responsável pela seletividade e especificidade dos sensores, sendo capaz de reconhecer, reagir ou ligar-se ao analito (SILVA, 2014).

O transdutor é responsável por converter o sinal biológico em uma resposta mensurável proporcional a concentração do analito. Dessa forma, este dispositivo mede as variações que ocorrem em sua superfície, sejam elas físicas (massa, calor) ou químicas (transferência de elétrons), e as converte em sinal elétrico, óptico, termométrico, magnético ou micromecânico. Por sua vez, a unidade processadora de sinal atua como um detector que filtra, amplifica e analisa o sinal, de modo que os dados são transferidos para um monitor ou armazenados em algum dispositivo (RAITERI *et al.*, 2002; PATHAK *et al.*, 2007).

A classificação dos biossensores pode ser feita tanto pelo material biológico utilizado como receptor, como também, pelo tipo de mudanças que ocorrem na superfície do transdutor. Com relação ao componente biológico, os biossensores podem ser classificados como: biossensores enzimáticos (usam enzimas como elementos bioreceptores); imunossensores (monitoram as interações do par anticorpo/antígeno) e biossensores celulares (utilizam microorganismos) (MOREIRA *et al.*, 2010)

No que diz respeito ao transdutor, os biossensores podem ser classificados em: biossensores eletroquímicos (medem as variações que ocorrem em sua superfície e as convertem em sinal elétrico); biossensores ópticos (se baseiam em mudanças nas propriedades ópticas das substâncias); biossensores acústicos (baseados na propriedade da piezoelétrico que os cristais anisotrópicos possuem) e biossensores calorimétricos (usam o calor gerado por reações exotérmicas para medir a concentração do analito) (MOREIRA *et al.*, 2010).

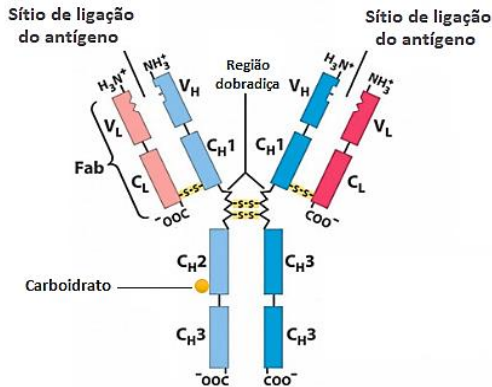
## **2.2.2 Aspectos básicos de imunologia**

Imunologia é a ciência que estuda os mecanismos de defesa relacionados à presença de substâncias estranhas no organismo, as quais são denominadas imunógenos ou antígenos (Ag). As bactérias, vírus, protozoários, fungos, vermes parasitas e as toxinas liberadas pelas bactérias, são considerados exemplos de antígenos. Quando introduzidos no organismo, estes antígenos ativam os linfócitos B e provocam a produção de anticorpos (Ac) (GIL; KUBOTA; YAMAMOTO, 1999).

Os anticorpos se referem a um grupo de glicoproteínas denominadas imunoglobulinas (Ig), as quais são altamente específicas e sintetizadas em resposta a um antígeno. Estas glicoproteínas atuam como principal mecanismo de defesa contra microrganismos extracelulares e suas toxinas, podendo reconhecer especificamente, se ligar, neutralizar, ou destruir estes antígenos (ZAPP, 2014).

Estruturalmente, os anticorpos possuem duas cadeias pesadas (*heavy chains* –  $C_H$ ) e duas cadeias leves (*light chains* –  $C_L$ ). As cadeias leves se ligam às cadeias pesadas por meio de pontes dissulfeto, formando uma estrutura simétrica em Y (Figura 5). Estas cadeias têm sua porção amino terminal próxima ao topo da estrutura em Y, onde se encontra o sítio determinante do anticorpo, denominado fragmento Fab (GIL; KUBOTA; YAMAMOTO, 1999).

**Figura 5** – Representação esquemática das cadeias constantes e hipervariáveis presentes nos anticorpos, onde **C** = domínios constantes, **V** = domínios variáveis, **L** = cadeia leve, **H** = cadeia pesada e  **$C_{H2}$**  é o domínio onde está acoplado o carboidrato.



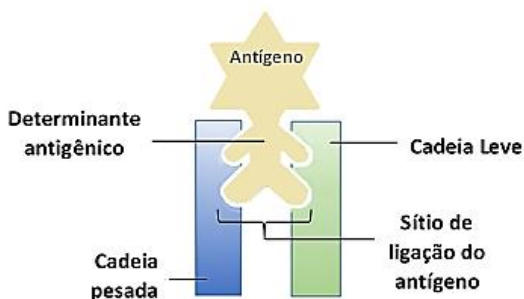
Fonte: Adaptado de Mandal (2018).

As cadeias leves e pesadas podem ser divididas em duas classes: constantes e hipervariáveis. As regiões constantes, também denominadas de C-terminal, tem a função de ancorar o anticorpo. Já as regiões hipervariáveis ou também conhecidas como regiões determinantes de complementaridade, são responsáveis pela a ligação antígeno/anticorpo. Estas regiões variáveis estão localizadas nos domínios  $V_L$  e  $V_H$  e são elas que determinam a especificidade do anticorpo (BENJAMINI *et al.*, 2000). Na estrutura dos anticorpos se encontra uma região dobradiça, na qual existe uma flexibilidade da

molécula neste ponto, assim como também podem ser encontrados carboidratos acoplados ao domínio C<sub>H2</sub> (MAYER, 2000).

No imunoensaio, o anticorpo (Ac) combina-se especificamente com o seu correspondente antígeno (Ag), formando o complexo Ag-Ac (Figura 6). A interação Ag-Ac é relativamente fraca e ocorre a curta distância, estando envolvidas interações não covalentes, tais como, interações eletrostáticas, hidrofóbicas, forças de Van der Waals e interações de hidrogênio (GIL; KUBOTA; YAMAMOTO, 1999). A interação anticorpo/antígeno é representada por uma estreita relação de complementaridade, a qual permite a aproximação máxima do antígeno aos sítios de ligação do anticorpo (ZAPP, 2014). Dessa forma, apenas algumas regiões do antígeno são capazes de formar ligações com o sítio determinante do anticorpo. Essas regiões específicas são chamadas epitopo ou determinante antigênico, as quais representam a menor porção de antígeno capaz de gerar a resposta imune (BENJAMIN *et al.*, 1984).

**Figura 6** – Representação esquemática da interação antígeno/anticorpo.



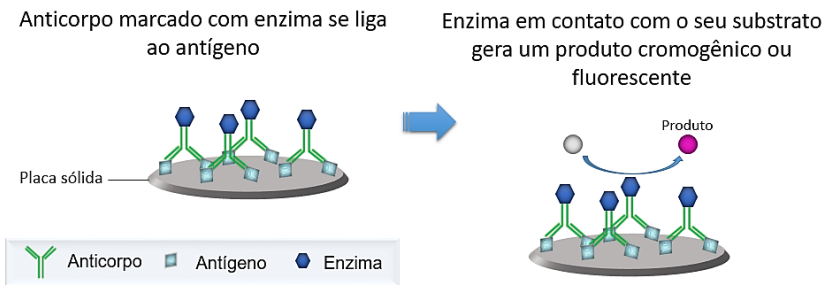
Fonte: Autoria própria (2018).

Do ponto de vista analítico, as interações Ag-Ac podem ser monitoradas por sistemas com marcação do anticorpo (método indireto) ou por sistemas sem marcação (método direto). A maioria dos imunoenaios utiliza o método indireto, no qual o sinal gerado é produzido a partir da adição de anticorpos ligados a radioisótopos (RICCARDI; COSTA; YAMANAKA, 2002). Contudo, as restrições relacionadas ao uso de radioisótopos, levaram ao desenvolvimento de imunoenaios que utilizam compostos fluorescentes ou enzimas como marcadores, tendo como exemplo, o ensaio ELISA (*Enzyme Linked*

*Immunosorbent Assays*) e o EMIT (*Enzyme Multiplied Immuno Technique*) (GIL; KUBOTA; YAMAMOTO, 1999).

O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) é utilizado no diagnóstico de várias doenças que induzem a produção de imunoglobulinas. Este teste permite a detecção de anticorpos específicos, sendo necessário para isso, fixar o antígeno a uma superfície sólida, e então liga-lo a um anticorpo acoplado a um marcador enzimático. Este marcador pode ser fluorescente ou pode ser uma enzima que catalisa uma reação que produza um produto mensurável. Com isso, a formação do imunocomplexo a partir de anticorpos marcados pode ser observada por meio de técnicas como: colorimetria (LEI *et al.*, 2010), fluorescência (BOUÇAS *et al.*, 2008), quimiluminescência (ZHAO; SUN; CHU, 2009) e eletroquímica (CAVALCANTI *et al.*, 2012). Dentre as maneiras de se realizar o ensaio ELISA, a Figura 7 representa, de forma esquemática, as etapas de imunodeteção para o método do tipo direto (ZAPP, 2014).

**Figura 7** – Representação esquemática das etapas de imunodeteção do método ELISA do tipo direto.



Fonte: Autoria própria (2018).

### 2.2.3 Imunossensores eletroquímicos

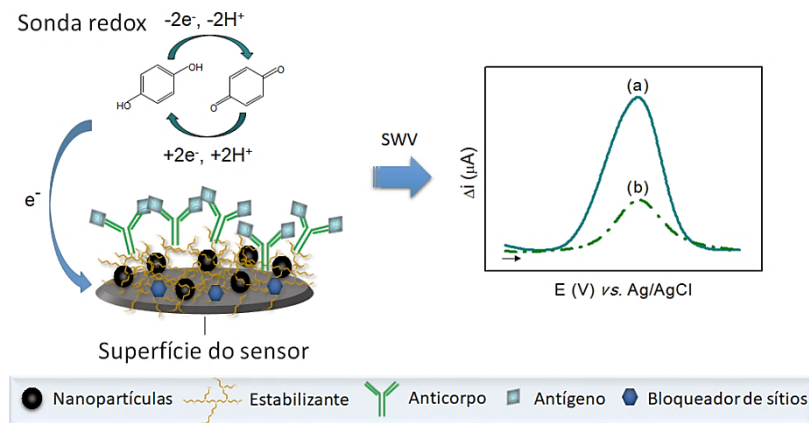
Imunossensor é um tipo de biossensor que se baseia na reação imunológica, onde o antígeno ou anticorpo são imobilizados sob a superfície de um transdutor. Quando o sinal biológico gerado pelo biorreconhecimento entre o antígeno e o anticorpo é convertido em sinal elétrico, este biossensor é dito eletroquímico. Diferentemente do teste ELISA, o uso de imunossensores eletroquímicos nem sempre necessita do emprego de anticorpos marcados. Isso se deve ao fato destes

dispositivos utilizarem espécies eletroativas como mediadoras das reações imunológicas, sendo este método conhecido como método direto ou *label-free* (ZANATO, 2016; ZAPP, 2014).

Tendo em vista que tanto o antígeno como o anticorpo são moléculas eletroquimicamente inertes, a resposta analítica dos imunossensores eletroquímicos não marcados é obtida por meio de espécies com atividade redox, as quais são chamadas de mediadores redox ou sonda redox. Estas moléculas eletroativas podem ser imobilizadas na superfície do eletrodo de trabalho ou estar presente em solução. São exemplos de sondas redox moléculas tais como: espécies orgânicas (quinonas, tetratiofulvaleno, tetracianoquinodimetano), compostos organometálicos (ferrocenos, ftalocianinas, óxidos de rutênio, metaloporfirinas) ou enzimas (SOUZA, 1997).

Quando a sonda redox se encontra presente em solução, a formação do imunocomplexo é acompanhada por meio do decaimento do sinal de corrente obtido para o imunossensor (Figura 8).

**Figura 8** – Representação esquemática de um imunossensor eletroquímico não marcado (à esquerda) e resposta de corrente esperada (à direita), utilizando voltametria de onda quadrada (SWV) e hidroquinona como sonda redox, onde (a) representa a medida de corrente na ausência de antígeno e (b) a medida de corrente na presença de antígeno.



Fonte: Autoria própria (2018).

Nesse sistema (Figura 8), a interação antígeno/anticorpo é observada por meio das seguintes etapas: (i) a partir do imunossensor contendo o anticorpo ligado a uma plataforma imobilizadora

(nanopartículas estabilizadas), mede-se o valor de corrente referente a alterações que ocorrem na sonda eletroquímica, sendo este sinal denominado pico base (Figura 8-a) e (ii) faz-se a medida da corrente na presença do antígeno, onde a resposta obtida é referente, novamente, à reação de oxidação/redução ocorrida na sonda redox, com a diferença de que nesta última etapa, a superfície do eletrodo encontra-se parcialmente bloqueada devido à interação antígeno/anticorpo. Com isso, a transferência de elétrons entre a sonda redox e a superfície do eletrodo é dificultada, tendo como consequência uma supressão (decaimento) no sinal de corrente (Figura 8-b) (LIANG *et al.*, 2011). Como forma de aumentar a eficiência da interação antígeno/anticorpo, geralmente adiciona-se, na etapa de construção do imunossensor, um bloqueador de sítios não específicos como, por exemplo, a albumina do soro bovino (*Bovine serum albumin* – BSA).

#### **2.2.4 Imobilização de biomoléculas sobre a superfície do eletrodo**

Tendo em vista que as reações imunológicas são altamente específicas, na construção de um imunossensor eletroquímico é necessário que as biomoléculas estejam organizadas e imobilizadas, de modo que o reconhecimento antígeno/anticorpo seja eficiente e seletivo. Para isso, a imobilização de biomoléculas é realizada a partir da modificação da superfície do sensor, de maneira que se permitam medidas rápidas do sinal elétrico proveniente da etapa de imunorreconhecimento. Neste processo, os sensores modificados são construídos a partir do eletrodo base e do modificador químico, onde o substrato consiste no eletrodo que sofrerá modificação de sua superfície, tendo como exemplo, ouro, platina, carbono vítreo, fibras de carbono, pasta de carbono, entre outros (ZAPP, 2014; SILVA, 2014; PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002).

O termo eletrodo quimicamente modificado (EQM) foi introduzido na eletroquímica por Murray e colaboradores (1975), os quais definiram EQM como sendo um dispositivo com moléculas quimicamente ativas imobilizadas sobre sua superfície, com o objetivo de pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução. Dessa forma, a modificação da superfície do EQM tem como objetivo criar grupos funcionais reativos que são geralmente inexistentes no eletrodo não modificado/ativado, de modo a alterar a sua reatividade e seletividade (SOUZA, 1997).

Considerando-se que os processos eletroquímicos se baseiam na transferência de elétrons, tanto o eletrodo base como os modificadores



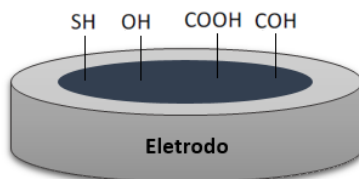
utilizados para imobilizar moléculas, devem apresentar características eletroquímicas apropriadas como, por exemplo, boa condutividade elétrica, biocompatibilidade, estabilidade térmica e química. A forma como as moléculas são imobilizadas na superfície do sensor, também é importante e depende das características que se deseja alcançar, tais como, aumento da sensibilidade, seletividade, estabilidade e reatividade (SOUZA, 1997; PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002).

De forma geral, os métodos mais empregados para a imobilização de moléculas sobre a superfície do eletrodo de trabalho consistem em: ligação covalente, adsorção, recobrimento com filmes poliméricos ou ainda a preparação de eletrodos à base de pasta de carbono, com adição de modificadores (MURRAY; EWING; DURST, 1987; BARROSO *et al.*, 2011).

### 2.2.5 Reações covalentes de imobilização

No processo de imobilização das moléculas, o modificador pode ser ligado covalentemente a superfície do eletrodo. A modificação de superfícies de carbono por meio de ligações covalentes tem sido em grande parte baseada na manipulação da reatividade de grupos funcionais presentes nessa superfície, tais como, álcoois (fenóis), ácidos carboxílicos, cetonas (quinonas) e anidridos (Figura 9). Geralmente, os substratos como o carbono e óxidos metálicos também são propícios para estabelecer ligações com ésteres, éteres e amidas (RUSMINI; ZHONG; FEIJEN, 2007).

**Figura 9** – Modificação da superfície do eletrodo com a criação de grupos funcionais.



Fonte: Autoria própria (2018).

Na imobilização do modificador via ligação covalente, algumas características importantes devem estar presentes, como por exemplo: **i)** as reações de imobilização devem ocorrer de forma rápida e que permita a utilização de baixas concentrações de reagentes; **ii)** os ligantes

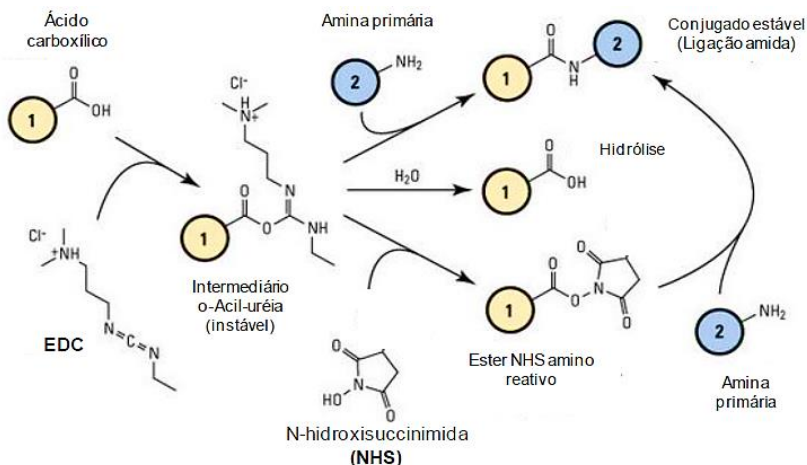
imobilizados devem ser orientados de modo que sua distribuição seja homogênea e **iii**) não devem ocorrer reações com os sítios de ligação da biomolécula usados para reconhecimento (GÓRECKA; JASTRZEBSKA, 2011). Os eletrodos modificados por meio de ligações covalentes são mais estáveis em relação aos demais métodos, entretanto são mais difíceis de preparar.

Geralmente, este método envolve duas etapas: i) a ativação do suporte com um reagente específico (bi ou multifuncional), e ii) a adição da biomolécula a qual pretende-se imobilizar. Em casos onde são empregadas reagentes bifuncionais como modificador, uma das extremidades do modificador reage com grupos funcionais presentes na superfície do eletrodo e a outra extremidade reage com o grupo reativo da biomolécula que se pretende imobilizar (GUILBAULT, 1984; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; MATEO *et al.*, 2007; SASSOLAS *et al.*, 2011). Quando as biomoléculas imobilizadas são anticorpos ou antígenos, os grupos reativos geralmente se resumem aos grupos N-terminal (-NH<sub>2</sub>) e C-terminal (-COOH), em razão da natureza proteica destas biomoléculas (JACOB; UNGER; HOROVITZ, 2013).

Na imobilização por ligação covalente cruzada, reagentes bi ou multifuncionais (ex.: glioxal, glutaraldeído) são empregados de modo a formar mais de uma ligação entre a biomolécula e o suporte, ou entre cadeias do suporte. Neste tipo de imobilização, dificilmente a molécula irá desprender-se do suporte e a estabilidade diante de variações físico-químicas é aumentada (GUILBAULT, 1984; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; MATEO *et al.*, 2007; SASSOLAS *et al.*, 2012).

Suportes contendo grupos carboxílicos são geralmente ativados com carbodiimidas, sendo a mais comumente empregada a 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). As carbodiimidas também podem ser chamadas de reagentes de ligação cruzada de ordem zero, pois são responsáveis por ativar os grupos reativos, porém não são mantidas na estrutura final após a imobilização. De maneira experimental, a ativação dos grupos carboxílicos é feita pela EDC, tendo como consequência a formação de um intermediário instável denominado éster ativado o-acyl-uréia (Figura 10). A partir deste intermediário, são possíveis três reações: (I) reação direta com grupo amina primária da biomolécula; (II) uma reação de hidrólise que regenera o grupo carboxílico e (III) uma nova ativação com N-hidroxissuccinimida (NHS) formando um intermediário ativado estável à base de um éster amino reativo (BOGDANOV *et al.*, 1988; PATEL *et al.*, 1997).

**Figura 10** – Esquema reacional da ativação pela EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) de suportes contendo grupos carboxílicos, sendo representadas as seguintes reações: (I) reação direta com grupo amina primária da biomolécula; (II) uma reação de hidrólise que regenera o grupo carboxílico e (III) uma nova ativação com N-hidroxissuccinimida (NHS) formando um intermediário ativado estável à base de um éster amino reativo.



Fonte: Hayworth (2014); Zapp (2014).

## 2.2.6 Adsorção

A adsorção consiste no método mais simples de fixar um modificador à superfície do eletrodo. Este método está baseado na dissolução do agente modificador em um solvente apropriado e na exposição, geralmente por imersão, do eletrodo a esta solução. A solução contendo o modificador também pode ser transferida (gotejada), com o auxílio de uma micropipeta, para a superfície do eletrodo, onde ocorrerá a posterior evaporação do solvente. A maioria dos trabalhos envolvendo este método, tem utilizado grafite e carbono vítreo como eletrodo de trabalho. Eletrodos de carbono apresentam uma importante capacidade de quimisorver reagentes que apresentem sistemas de elétrons  $\pi$  estendidos. Neste tipo de adsorção, há uma forte interação entre o plano basal (plano da folha) do eletrodo de carbono e o sistema  $\pi$  de elétrons na molécula (SOUZA, 1997).

A desvantagem deste método é a de produzir no máximo uma monocamada de modificador imobilizado, limitando a faixa de resposta linear. Além disso, como o fenômeno de adsorção é um processo de

equilíbrio, é de se esperar que ocorra a dessorção do modificador para o meio, perdendo dessa forma, reprodutibilidade e tempo de vida útil do EQM (SOUZA, 1997).

### 2.2.7 Modificação do eletrodo com filmes poliméricos

Uma técnica que tem se tornado bastante atrativa na construção de sensores é a preparação de eletrodos quimicamente modificados a partir do recobrimento de suas superfícies com filmes poliméricos. Isso se deve ao fato de ao contrário dos métodos por adsorção ou por ligação covalente, a modificação com membranas poliméricas permite a imobilização de muitas camadas (1 a 20000) da espécie ativa na superfície do eletrodo, tendo como consequência, um aumento na resposta eletroquímica (SOUZA, 1997)

A tecnologia de polímeros tem evidenciado que uma das propriedades mais importantes destes materiais é a capacidade de se comportar como excelentes isolantes elétricos. Contudo, uma nova classe de polímeros orgânicos tem sido desenvolvida com o intuito de combinar em um mesmo material, as propriedades elétricas de um semicondutor ou metal com as vantagens de um polímero. A condutividade eletrônica desses materiais orgânicos tem contribuído para a produção de células solares, baterias, aparelhos eletrocromáticos, sensores, aparelhos eletrônicos moleculares, biossensores e eletrodos quimicamente modificados (EQM) (SILVA, 2008).

O recobrimento polimérico é realizado a partir da formação de camadas poliméricas sobre a superfície do eletrodo, onde a membrana polimérica deve apresentar: **i)** interação com a superfície do substrato; **ii)** baixa solubilidade em solução aquosa; **iii)** ser condutora e **iv)** ser permeável ao eletrólito e ao analito de interesse. Vários métodos são utilizados na formação do filme polimérico, como por exemplo, recobrimento por imersão (“*dip-coating*”), recobrimento por rotação (“*spin-coating*”), eletrodeposição, fotodeposição, entre outros (SEGNINI, 2003).

A modificação de eletrodos com filmes poliméricos permite a imobilização de biomoléculas sobre a superfície modificada. Dessa forma, a escolha do polímero deve se basear na aplicação que se deseja destinar ao sensor proposto. Dependendo da aplicação, o polímero escolhido pode ser eletroativo (se o objetivo é eletrocatalise), quimicamente ativo (propriedades ligantes ou troca iônica) ou inerte (apenas exclusão de interferentes). Os filmes eletroativos estão divididos em duas categorias: **polímeros redox** (quando o centro redox é parte do

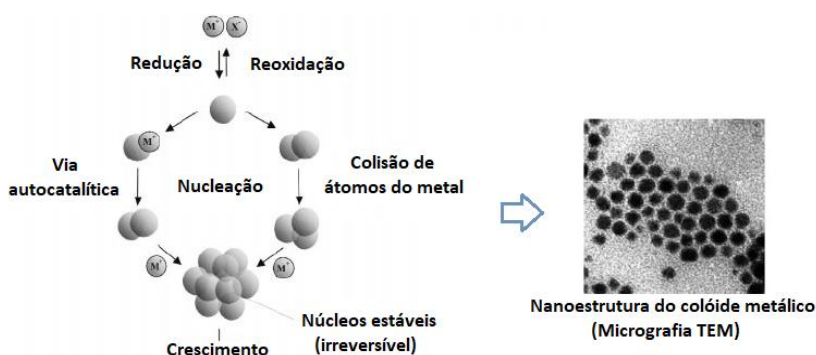
esqueleto polimérico e **polímeros de troca iônica** (quando o componente redox ativo é um contra-íon de um filme poli-iônico como polivinilpiridina ou Nafion (SOUZA, 1997).

## 2.2.8 Nanopartículas metálicas (MnPs)

A síntese e aplicação de MnPs têm atraído grande interesse devido às suas propriedades elétricas, magnéticas e óticas, as quais são utilizadas em diversas aplicações como computadores quânticos, diodos emissores de luz, padrões fotoquímicos, sensores químicos e biossensores enzimáticos. Além disso, devido a uma ampla área superficial por unidade de volume, as MnPs tornam-se promissoras para catálise, o que é de grande interesse industrial (SIGNORI, 2010).

No processo de síntese das MnPs, uma especial atenção é dada para as condições de reação, pelo fato destas influenciarem diretamente nas propriedades das nanopartículas. Nesse caso, as MnPs geralmente são preparadas por métodos químicos que envolvem a redução de um sal metálico ou íons metálicos por um agente redutor apropriado em meio líquido (Figura 11). Os agentes redutores utilizados são os mais variados e entre eles estão:  $H_2$  (CARTURAN *et al.*, 2007), álcoois (HAH; KOO, 2003),  $NaBH_4$  (TOSHIMA, 2007) e hidroquinona (GENTRY *et al.*, 2007; BÖNNEMANN; RICHARDS, 2001).

**Figura 11** – Formação da nanoestrutura do colóide metálico a partir da redução do sal metálico.



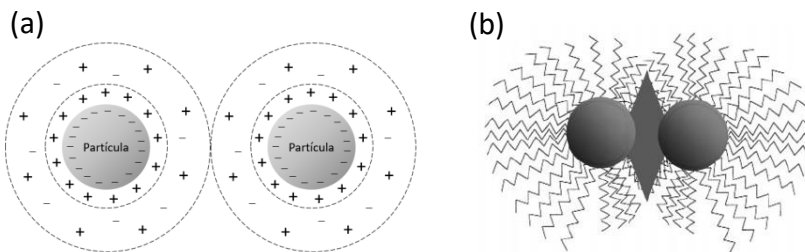
Fonte: Adaptado de Bönnemann e Richards (2001).

Na etapa de nucleação das MnPs, o sal metálico é reduzido gerando átomos metálicos com valência zero. Estes podem colidir em solução com outros íons metálicos, átomos do metal ou aglomerados, para formar uma “semente” irreversível de núcleo metálico estável. O diâmetro dos núcleos de "semente" pode ser de aproximadamente 1 nm, dependendo da força das ligações metal-metal e a diferença entre os potenciais redox do sal metálico e o agente redutor aplicado (BÖNNEMANN; RICHARDS, 2001).

Como forma de controlar o crescimento das MnPs, agentes estabilizantes são utilizados como estratégia para evitar a coalescência e por sua vez manter o tamanho nanométrico das partículas em solução. Dessa forma, são mantidas propriedades das MnPs como elevada atividade catalítica, área superficial e condutividade elétrica (ZAPP, 2014).

Os estabilizantes também são essenciais para dificultar a aglomeração das MnPs, já que estes são capazes de compensar as forças atrativas de Van der Waals por meio de forças de repulsão estéricas e eletrostáticas entre íons adsorvidos e contra-íons associados (SIGNORI, 2010). Dessa forma, a estabilização das MnPs pode ocorrer de duas formas: estabilização eletrostática e estabilização estérica (Figura 12).

**Figura 12** – Estabilização de nanopartículas por (a) método eletrostático e (b) método estérico.



Fonte: (a) Autoria própria (2018) e (b) Bönnemann e Richards (2001).

A estabilização eletrostática é baseada na repulsão coulombica entre os íons existentes na superfície das partículas e os contra-íons presentes na dupla camada elétrica. Já a estabilização estérica é alcançada pela coordenação de moléculas orgânicas que atuam como escudos de proteção da superfície metálica. Dessa forma, núcleos nanometálicos são separados uns dos outros e a aglomeração é impedida. Os principais grupos estabilizantes reportados na literatura

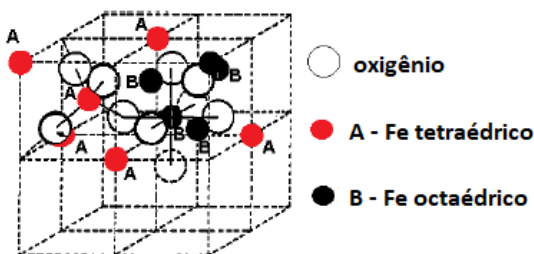
são: i) polímeros e copolímeros (HIRAI *et. al.*, 1976); ii) doadores P, N e S (por exemplo, fosfatos, aminas, tioéteres); iii) solventes como THF, THF/MeOH (BÖNNEMANN *et. al.*, 1994); iv) álcoois de cadeia longa; v) surfactantes (KIWI; GRAETZEL, 1979) e vi) organometálicos (BÖNNEMANN; RICHARDS, 2001).

### 2.2.9 Magnetita

As nanopartículas magnéticas têm atraído grande interesse e têm sido aplicadas em diversas áreas, como por exemplo: catálise, biotecnologia/biomedicina, imagem por ressonância magnética, armazenamento de dados e desenvolvimento de fármacos. A presença de grupos hidroxilas na superfície de nanopartículas magnéticas, tais como a magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), permite com que estas sejam funcionalizadas com diferentes ligantes, produzindo dessa forma, sistemas coloidais estáveis (SILVA, 2013).

A magnetita é um óxido de ferro (ferrita), com estrutura cúbica de espinélio invertido, com o oxigênio formando um empacotamento denso fcc (cúbico de face centrada) e os cátions de Fe ( $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ ) ocupando sítios intersticiais tetraédricos e octaédricos (Figura 13). A célula unitária contém 8 íons metálicos em sítios tetraédricos, 16 em sítios octaédricos e 32 íons oxigênio (SILVA, 2013; SANTOS, 2012).

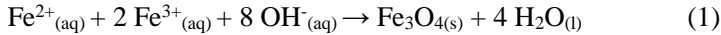
**Figura 13** – Estrutura cristalina cúbica de espinélio invertido da magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), onde o oxigênio forma um empacotamento denso fcc (cúbico de face centrada) e os cátions de Fe ( $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ ) ocupam sítios intersticiais tetraédricos e octaédricos.



Fonte: Silva (2013).

A síntese das nanopartículas de magnetita pode ser realizada de acordo com o método de cooprecipitação, no qual a ferrita (óxido de ferro) é preparada a partir da precipitação conjunta de íons metálicos

divalentes e íons  $\text{Fe}^{3+}$ , sendo esta, uma reação de hidrólise alcalina em meio aquoso (Equação 1). Para isso, uma solução básica é adicionada à solução dos íons metálicos sob agitação constante, sendo o tamanho, a forma e a composição química das nanopartículas controlados a partir da temperatura de reação, da velocidade de agitação, da força iônica do meio, dos sais e da base utilizados (KANG *et al.*, 1996).



### 2.2.10 Polieletrólitos

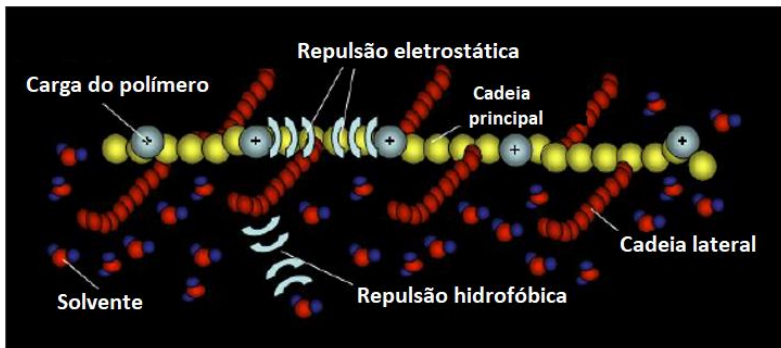
Polieletrólitos são polímeros que apresentam cargas ou grupos ionizáveis, quando dissolvidos em solventes polares. Em solução aquosa, o polieletrólito se dissocia em macro-íons e contra-íons. Tendo em vista que esta classe de polímeros é caracterizada pela presença de carga, estes polímeros podem ser diferenciados de acordo com a carga que apresentam quando ionizados. Se a carga produzida for negativa, o polímero ionizado torna-se um poliânion, enquanto que se a carga produzida for positiva, este se torna um policátion. Nos casos em que o polímero produz tanto carga positiva como negativa, tem-se como resultado um polianfótero (GUERRA, 2011).

As propriedades das soluções de polieletrólitos apresentam consideráveis diferenças em relação às soluções de polímeros neutros. A presença de cargas ao longo da cadeia leva a interações repulsivas intra e intermoleculares, as quais apresentam importantes consequências para as propriedades dinâmicas e estáticas do sistema, como por exemplo, no volume e na conformação. Os efeitos relacionados a estas interações são chamados de hidrodinâmicos (LUZ; SANTANA; OLIVEIRA, 2016).

Quando a densidade de carga, presente na cadeia principal, apresenta-se alta e a cadeia lateral demonstra um baixo caráter hidrofóbico, as repulsões eletrostáticas na cadeia principal são superiores às atrações hidrofóbicas das cadeias laterais, levando a uma conformação estendida da molécula, podendo ser observada conforme apresentado na Figura 14 (DUARTE, 2011).



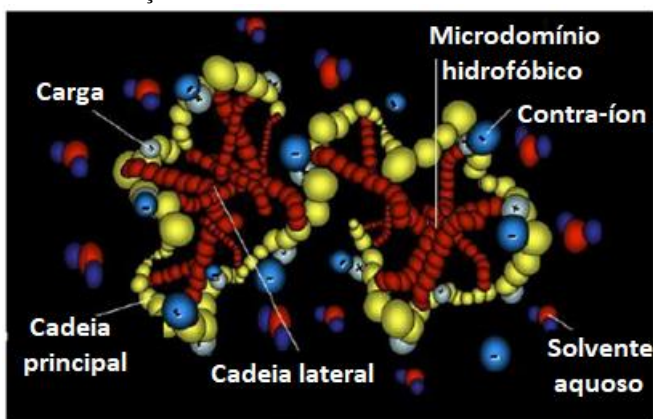
**Figura 14** – Ilustração esquemática de um polieletrólito estendido em solução.



Fonte: Duarte (2011).

Já no caso em que a densidade de carga no polieletrólito é menor, e a repulsão eletrostática não se sobrepõe às atrações hidrofóbicas, o polieletrólito adquire uma conformação compactada. Dessa forma, quanto mais apolar for a cadeia lateral maior será o caráter hidrofóbico e mais compacta será a conformação do polímero em solução aquosa, havendo dessa forma, a formação de microdomínios hidrofóbicos como forma de proteger as cadeias hidrofóbicas do contato com o solvente (Figura 15) (DUARTE, 2011).

**Figura 15** – Ilustração esquemática de uma conformação compactada de um polieletrólito em solução.



Fonte: Duarte (2011).

Além do efeito proveniente das interações repulsivas intra e intermolecular, a conformação de macromoléculas de polieletrólitos é dependente da força iônica, temperatura, pH, presença de íons metálicos, concentração de sólidos, diluição, contra-íons em solução, número e tipo de unidades carregadas presentes no polímero (LUZ; SANTANA; OLIVEIRA, 2016).

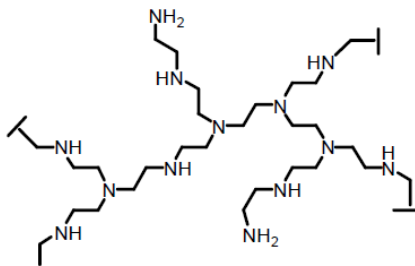
### 2.2.11 Estabilização de nanopartículas em polietilenoimina (PEI)

Polímeros são vastamente utilizados como matrizes para a estabilização de nanopartículas (NPs), pois muito deles são facilmente processáveis, permeáveis e/ou biodegradáveis. A formação de NPs estabilizadas com polímeros teve seu início nos anos 80, onde Koon e colaboradores utilizaram ferro em estruturas poliméricas (SIGNORI, 2010).

Estabilizantes poliméricos podem ser macromoléculas lineares, ramificadas ou agregados micelares que podem interagir fracamente com a nanopartícula, construindo dessa forma, uma casca polimérica protetora. Álcool polivinílico (PVA), ácido poliacrílico, ésteres polialfílicos, polivinilpirrolidona (PVP) e PEI (polietilenoimina) são alguns exemplos de estabilizantes poliméricos, sendo que alguns destes podem agir como estabilizantes e redutores, simultaneamente (SIGNORI, 2010).

O polímero PEI utilizado como estabilizante neste trabalho, é um polieletrólito fraco em solução aquosa que pode ser encontrado em sua forma linear ou ramificada. Em sua forma ramificada, a PEI comercial é constituída de 25% de aminas primárias, 50% de aminas secundárias e 25% de aminas terciárias (Figura 16) (SIGNORI, 2010).

**Figura 16** – Estrutura da PEI com 25% de aminas primárias, 50% de aminas secundárias e 25% de aminas terciárias.



Fonte: Signori (2010).

Em solução aquosa pH 10, a PEI é praticamente um polímero neutro. Já em pH 6,6, é um polieletrólito com aproximadamente 20-40 % dos grupos amino protonados (GUERRA, 2011). Devido aos diferentes valores de pKa dos grupos amino primários, secundários e terciários, este polímero tem a capacidade de capturar prótons em diferentes condições de pH, o que é conhecido como o mecanismo "esponja de prótons" (LU *et al.*, 2014). Os átomos de nitrogênio podem trocar prótons com a solução tampão, onde o nível de troca destes prótons é dependente do valor do pH. A PEI se torna menos básica à medida que o nível de protonação aumenta, tendo como consequência uma maior repulsão eletrostática entre os prótons em solução e a carga positiva nos grupos aminos. Em condições fisiológicas, aproximadamente 20 % dos átomos de nitrogênio do PEI são protonados (LU *et al.*, 2014; ROCHEFORT; KOUISNI; GENDRON, 2008).

Por ser um polímero condutor, com uma estrutura tridimensional, hidrofílica, altamente ramificada e flexível, a PEI (pH 7,5) foi escolhida, neste trabalho, para servir como matriz para a estabilização de nanopartículas magnéticas de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – Magnetita). Além disso, em virtude de sua estrutura transversalmente reticulada e alta densidade de carga, é capaz de condensar e complexar biomoléculas como as do anticorpo ab-MC-LR utilizado na construção do imunossensor eletroquímico proposto.

### **2.2.12 Aplicação de imunossensores**

Os imunossensores têm como objetivo trabalhar como teste POCT (*Point-of-care*), de modo que seja possível diagnosticar doenças ou substâncias tóxicas por meio de dispositivos portáteis. A conversão de imunossensores a dispositivos portáteis é fundamental para que o diagnóstico possa ser realizado em áreas onde os recursos e o atendimento à saúde são escassos (GOPINATH *et al.* 2014).

Ao longo dos anos, vários trabalhos foram desenvolvidos com o intuito de se construir imunossensores cada vez mais sensíveis, seletivos, com diagnósticos mais rápidos e de fácil construção. Dentre os estudos realizados, Balkenhohl e Lisdat (2007) desenvolveram um imunossensor eletroquímico capaz de detectar anticorpos anti-transglutaminase em soro humano. Este trabalho apresentou uma alta sensibilidade, a qual foi suficiente para indicar a sua aplicação no diagnóstico de doença celíaca. Os dados obtidos foram superiores aos de ensaios qualitativos, porém estes não foram precisos o suficiente para afirmar que o teste desenvolvido pudesse ser considerado mais preciso

que os realizados por kits comerciais de ELISA (SANTANA *et. al.*, 2017).

Segundo Ricci e colaboradores (2012), a sensibilidade de imunossensores eletroquímicos não é comparável à de métodos conjugados com enzimas, no entanto, apresentam limites de detecção consideravelmente baixos, sendo úteis para aplicações práticas, além de serem menos propensos a interferência do que os imunossensores ópticos. As vantagens apresentadas pelos imunossensores eletroquímicos estão na diversidade de opções de eletrodos disponíveis para o público e na ampla gama de possibilidades de modificações das plataformas de detecção (SANTANA *et. al.*, 2017). Com isso, a Tabela 3, na página seguinte, apresenta exemplos de diversos imunossensores reportados na literatura, bem como as suas aplicações.

**Tabela 3** – Tipos de imunossensores com exemplos de substratos, transdutores, camada sensora e aplicação.

SUBSTRATO	TRANSDUTOR	CAMADA SENSORA	APLICAÇÃO	REFERÊNCIA
Membrana celulósica (rede nylon)	POTENCIOMÉTRICO E AMPEROMÉTRICO	Anticorpo Anti-IgG humano e glicose oxidase	Determinação de Anti-IgG humana	CAMPANELLA <i>et al.</i> , 1999
Superfície de ouro	PIEZOELÉTRICO	Anticorpo antiHSA	Detecção de albuminúria	NAVRÁTILOVÁ, SKLÁDAL, VIKLICKY, 2001
Nanopartícula de Ouro	ÓPTICO	Polietilenoglicol e Anticorpo AntiEGFR.	Detecção de câncer	EL-SAYED; HUANG; EL- SAYED, 2005; SOKOLOV <i>et al.</i> , 2003.
Superfície de ouro	PIEZOELÉTRICO	Mercaptoundecanóico, Carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS) e IgG.	Detecção de câncer	GRONEWOLD <i>et al.</i> , 2006
Nanopartícula de sílica e prata magnetizada	MAGNÉTICO E ÓPTICO	Aminopropiltriétoxisila no (APTS), DETA, Glutaraldeído e Anticorpo Anti-IgG	Detecção de câncer	GONG <i>et al.</i> , 2007
Eletrodo impresso de ouro	ELETROQUÍMICO	Anticorpos antitransglutaminase em soros humanos	Diagnóstico de doença celíaca	BALKENHOHL, LISDAT, 2007
Eletrodo impresso de carbono	ELETROQUÍMICO	Anticorpo monoclonal antiácido ocaídoico (antiOA-MAb)	Detecção de ácido ocaídoico em amostra de músculo	HAYAT; BARTHELMEBS; MARTY, 2012
Eletrodo impresso de carbono	ELETROQUÍMICO IMPEDIMÉTRICO	Anticorpo antiACTH, ACTH biotinilado, fosfatase alcalina, estreptavidina marcada	Detecção de ACTH	MORENO-GUSMÁN <i>et al.</i> , 2012

**Tabela 3** – Continuação.

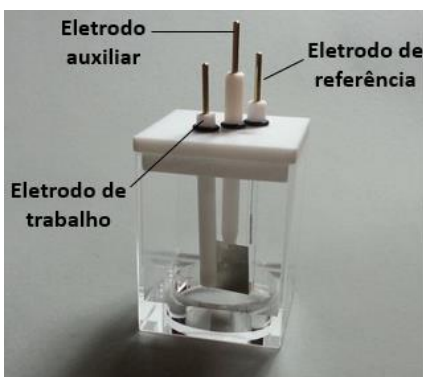
Superfície de ouro	ELETROQUÍMICO IMPEDIMÉTRICO	Anticorpo para receptor de lipoproteína AntisLOX1	Deteção de Troponina Cardíaca I	BILLAH <i>et al.</i> , 2012
Nanopartículas de Platina mesoporosas não enzimático	ELETROQUIMICO	Anticorpos AntiCA125, antiCA153 e antiCEA (Ab1)	Deteção de três tipos de marcadores tumorais de câncer de mama	CUI <i>et al.</i> , 2014

Fonte: Santana *et al.* (2017).

### 2.2.13 Voltametria

Dentre os métodos eletroanalíticos, a voltametria é uma técnica que se baseia nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada de solução adjacente a essa superfície. No procedimento voltamétrico, as informações sobre o analito são obtidas por meio da medida de corrente em função de um potencial aplicado. As curvas de corrente *versus* o potencial são realizadas durante a eletrólise do analito em uma célula eletroquímica (Figura 17) constituída por três eletrodos: (1) eletrodo de trabalho; (2) eletrodo de referência e (3) eletrodo auxiliar (contra-eletrodo) (BARD, 2001).

**Figura 17** – Configuração de uma célula eletroquímica contendo três eletrodos: 1) eletrodo de referência; 2) eletrodo de trabalho e 3) eletrodo auxiliar (contra-eletrodo).



Fonte: Adaptado de AliExpress (2019).

A reação de interesse, para a detecção do analito, ocorre no eletrodo de trabalho. Sobre este eletrodo é aplicado um potencial controlado e sua resposta de corrente é proporcional à concentração do analito em solução. A construção do eletrodo de trabalho pode ser feita a partir de materiais inertes como ouro, platina, carbono ou mercúrio (BARD, 2001).

O eletrodo de referência é frequentemente confeccionado com calomelano saturado ou prata/cloreto de prata. Este eletrodo possui a função de manter o seu potencial constante durante as medidas e, por isso, a resistência elétrica do circuito que o contém é elevada de tal

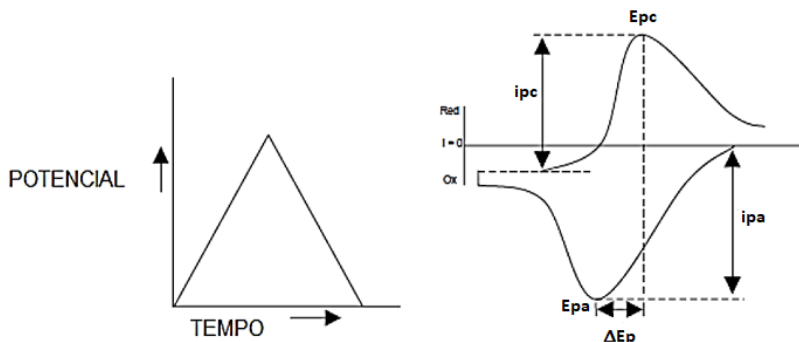
forma, que a corrente que flui por este eletrodo é desprezível. O eletrodo de referência apresenta potencial conhecido e independente da concentração do analito (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

O eletrodo auxiliar (contra-eletrodo) atua no controle da corrente necessária para sustentar a eletrólise que ocorre no eletrodo de trabalho. Devido ao fato da corrente passar apenas entre o contra-eletrodo e o eletrodo de trabalho, são evitados distúrbios tais como, a eletrólise no eletrodo de referência. Com isso, contribui-se para que as variações de potencial, no eletrodo de referência, sejam desprezíveis (BARD, 2001).

Existem diversas técnicas voltamétricas, apresentando-se dentre elas a voltametria cíclica (*cyclic voltammetry* – CV), a voltametria de onda quadrada (*square-wave voltammetry* – SWV) e a voltametria de pulso diferencial (*differential pulse voltammetry* – DPV).

A voltametria cíclica é a técnica mais frequentemente usada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos. Sua eficiência resulta da capacidade de fornecer rápidas informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos. Nesta técnica, a resposta de corrente para um pequeno eletrodo estacionário e imerso em uma solução em repouso é obtida em função de um sinal de excitação na forma triangular (Figura 18)

**Figura 18** – Representação esquemática da aplicação de potencial em função do tempo (à esquerda) e voltamograma cíclico (à direita), onde:  $E_{pa}$  – potencial de pico anódico;  $E_{pc}$  – potencial de pico catódico;  $i_{pa}$  – corrente de pico anódica;  $i_{pc}$  – corrente de pico catódica;  $\Delta E_p$  – Diferença de potencial de pico; Red – espécie reduzida e Ox – espécie oxidada.



Fonte: Bataglion (2009).

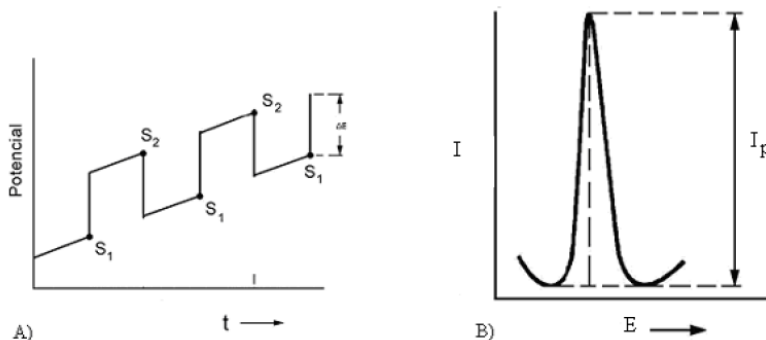


O princípio de funcionamento desta técnica está baseado na inicial aplicação de uma rampa de potencial até um valor denominado potencial de inversão, no qual há uma inversão da direção de varredura e o potencial retorna para o seu potencial inicial, resultando no voltamograma cíclico (corrente *versus* potencial) apresentado na Figura 18 (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009; BARD, 2001).

A SWV e a DPV fazem parte do conjunto de técnicas eletroanalíticas pulsadas. Inicialmente, a voltametria de pulso surgiu com o objetivo de reduzir a contribuição da corrente capacitiva nas análises. Estas técnicas são baseadas na aplicação de degraus de potencial, sendo eles fixos ou variáveis. Após a aplicação dos pulsos de potencial, a corrente capacitiva se extingue mais rapidamente que a componente faradáica, sendo o sinal analítico mensurado ao final da aplicação de cada pulso. Dessa forma, a vantagem das técnicas pulsadas consiste na possibilidade em diferenciar a corrente capacitiva da corrente faradáica (PACHECO *et al.*, 2013).

Na voltametria de pulso diferencial (DPV), pulsos de igual amplitude são aplicados sobre uma rampa linear de potencial, sendo a corrente medida antes da aplicação do pulso e no final da aplicação deste. Estas correntes são subtraídas, já que a primeira corrente lida é referente à contribuição da corrente capacitiva e a segunda é a contribuição da corrente faradáica. Como resultado, tem-se um voltamograma de pulso diferencial com a forma de uma curva gaussiana (Figura 19) (BATAGLION, 2009).

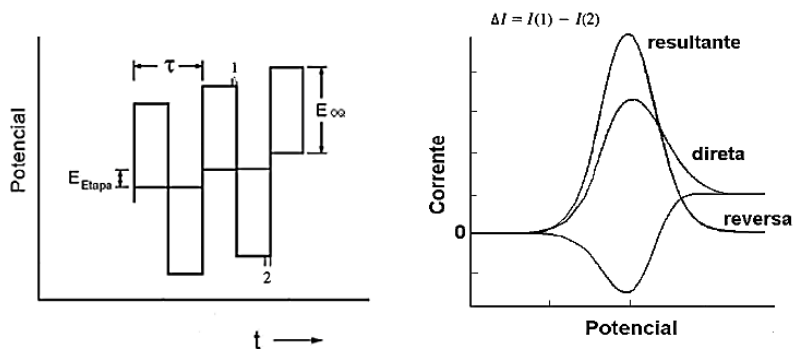
**Figura 19** – Forma de aplicação de pulsos sobre uma rampa linear de potencial (A) e voltamograma esquemático (corrente *versus* potencial) da voltametria de pulso diferencial (B).



Fonte: Bataglioni (2009).

A voltametria de onda quadrada (SWV) é uma das técnicas voltamétricas de pulso mais rápidas e sensíveis. Os limites de detecção podem ser comparados aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Na SWV, uma onda quadrada simétrica de amplitude  $2E_{\infty}$  é sobreposta sobre uma rampa de potencial na forma de escada (*staircase*), a qual é caracterizada por um degrau de potencial ( $E_{\text{etapa}}$ ) e por um período  $\tau$ , como representado na Figura 20. A corrente é amostrada duas vezes, uma ao final do pulso direto e outra ao final do pulso reverso. Assim como na voltametria de pulso diferencial, esta dupla amostragem da corrente também garante uma minimização da contribuição da corrente capacitiva sobre a corrente total medida. (SCHOLZ, 2010; PACHECO *et al.*, 2013).

**Figura 20** – Aplicação de pulsos sobre uma rampa de potencial na forma de escada (*staircase*), tendo como resultado o voltamograma de onda quadrada (à direita), onde  $E_{\infty}$  representa a altura do pulso,  $E_{\text{etapa}}$  corresponde à altura do degrau de potencial e  $\tau$  o período de aplicação do pulso.



Fonte: Adaptado de Bataglion (2009).

Atualmente, a voltametria de onda quadrada é uma das técnicas mais utilizadas para fins analíticos. A SWV combina os melhores aspectos de vários métodos de voltametria de pulso, incluindo sensibilidade ( $10^{-9}$  mol  $L^{-1}$ ) e velocidade (100 a 1000 mV  $s^{-1}$ ) (PACHECO *et al.*, 2013).

Para a obtenção de uma boa sensibilidade do método eletroquímico, a escolha adequada do eletrólito suporte também é essencial. O eletrólito suporte é um eletrólito com concentração pelo menos 100 vezes maior que a substância de interesse, também presente

em solução, o qual confere à interface eletrodo/solução propriedades que simplificam a análise de sistemas eletroquímicos (BARD, 2001).

O eletrólito suporte deve apresentar as seguintes características: alta solubilidade, alto grau de ionização e ser estável química e eletroquimicamente no solvente a ser empregado. Em meios aquosos são muito empregados, como eletrólito suporte, os percloratos, nitratos e sulfatos de sódio e de potássio. Os cloretos de metais alcalinos podem ser utilizados, porém os íons cloreto possuem a forte tendência em formar complexos com íons metálicos, em particular, os de metais de transição (AGOSTINHO *et al.*, 2004)

Em meios aquosos ácidos podem ser citados como eletrólito suporte, os ácidos perclórico, sulfúrico e nítrico, além do ácido clorídrico. Em meios aquosos alcalinos destacam-se os hidróxidos de sódio e de potássio. Alguns autores consideram eletrólito suporte um sistema tamponante como, por exemplo, citrato, fosfato, acetato e borato, quando se pretende manter constante, além da força iônica, o pH da solução aquosa (AGOSTINHO *et al.*, 2004).

Pelo fato do eletrólito suporte modificar a estrutura da interface eletrodo/solução, este eletrólito apresenta funções que são muito importantes no estudo de sistemas eletroquímicos, tais como: i) mantém constante o coeficiente de atividade das espécies, sendo possível dessa forma, determinar a concentração da espécie de interesse; ii) torna o número de transporte ( $t$ ) da espécie eletroativa praticamente igual a zero, fazendo com que o transporte de massa da espécie de interesse não ocorra por migração; iii) diminui a espessura da dupla camada elétrica; iv) mantém a viscosidade da solução constante; v) mantém o coeficiente de difusão da espécie de interesse constante e vi) altera a cinética das reações eletroquímicas (AGOSTINHO *et al.*, 2004).

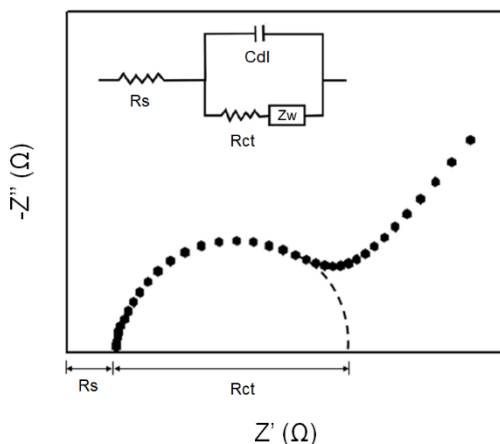
#### **2.2.14 Espectroscopia de impedância eletroquímica**

Impedância pode ser definida como a carga resistiva total de um circuito em corrente alternada, onde a carga resistiva total é representada pelo acúmulo dos efeitos de resistência e reatância. A resistência se refere a oposição à passagem de corrente, tendo como resultado o gasto de energia em forma de calor (Efeito Joule). Já a reatância, se refere ao processo em que um componente do circuito cria oposição à passagem de corrente elétrica e esta oposição gasta energia em forma de campo magnético (indutor) ou campo elétrico (capacitor) (RIBEIRO; SOUZA; ABRANTES, 2015).

Atualmente, a espectroscopia de impedância eletroquímica (*Electrochemical impedance spectroscopy* – EIS) é utilizada em uma ampla gama de estudos, abrangendo desde o transporte eletrônico em dispositivos semicondutores até o estudo de processos cinéticos eletroquímicos das mais diferentes naturezas (CARVALHO; ANDRADE, BUENO, 2006).

Na EIS, os fenômenos eletroquímicos que ocorrem na interface eletrodo/solução são representados pelo diagrama de Nyquist, o qual está baseado no circuito de *Randles-Ershler* (Figura 21). Neste circuito, os eventos capacitivos ( $C_{dl}$ ) são separados dos associados ao processo de transferência de elétrons, os quais são representados pela resistência à transferência de carga ( $R_{ct}$ ), resistência da solução ( $R_s$ ) e resistência referente ao processo de difusão linear conhecida como impedância de Warburg ( $Z_w$ ). Neste diagrama, a resistência à transferência de carga ( $R_{ct}$ ) é obtida por meio do diâmetro do semicírculo formado (RIBEIRO; SOUZA; ABRANTES, 2015).

**Figura 21** – Diagrama de Nyquist baseado no circuito de *Randles-Ershler*, onde ( $C_{dl}$ ) representa a capacitância da dupla camada elétrica; ( $R_s$ ) a resistência da solução; ( $R_{ct}$ ) a resistência à transferência de carga e ( $Z_w$ ) a impedância de Warburg. Inserido: circuito de *Randles-Ershler*.



Fonte: Autoria própria (2018).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES E MATERIAIS

Todos os reagentes utilizados neste trabalho possuíam grau analítico e foram utilizados sem qualquer purificação adicional. As soluções foram preparadas utilizando-se água ultrapura, obtida de um sistema Milli-Q (Millipore, EUA) com resistividade de  $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ .

O tampão fosfato salino PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5), utilizado como eletrólito suporte, foi preparado por dissolução de KCl (adquirido da Vetec), NaCl (obtido da Synth),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Neon) e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Synth) em água ultrapura, e o valor do pH foi ajustado com hidróxido de sódio ou HCl (Nuclear).

Para a síntese das MGNnP estabilizadas em PEI (MGNnP-PEI) e MGNnP estabilizadas em Nafion, foram utilizados  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , ácido clorídrico  $2,0 \text{ mol L}^{-1}$  e hidróxido de sódio  $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ , ambos da Sigma-Aldrich. As soluções dos agentes estabilizantes polietilenoimina (PEI,  $\text{MM} \approx 25000 \text{ g mol}^{-1}$ , Sigma-Aldrich) e Nafion<sup>®</sup> 117 ( $\text{MM} \approx 544.135 \text{ g mol}^{-1}$ , Sigma-Aldrich) foram preparadas em água ultrapura, na concentração de 40% (m/v).

A solução de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$   $5 \text{ mmol L}^{-1}$  foi preparada a partir da dissolução de hexacianoferrato (III) de potássio ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) e hexacianoferrato (II) de potássio ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) em solução aquosa de KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , sendo estes reagentes adquiridos da Sigma-Aldrich.

As soluções dos reagentes utilizados no estudo dos possíveis interferentes foram preparadas nas seguintes concentrações: NaCl ( $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ ), MC-RR ( $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ), MC-YR ( $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ) e KCl ( $9,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ). Os antígenos MC-RR e MC-YR foram adquiridos da Enzo Life Sciences.

As soluções de MC-LR com as concentrações de 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 50 e  $500 \text{ ng mL}^{-1}$ , assim como o ab-MC-LR na concentração de  $50 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ , foram preparadas em PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5) a partir dos respectivos padrões, MC-LR  $100 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  (Enzo Life Sciences) e ab-MC-LR  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  (Abcam).

A solução de hidroquinona (Sigma-Aldrich)  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  foi preparada em água ultrapura e usada como sonda redox na detecção de MC-LR.

## 3.2 INSTRUMENTAÇÃO

As medidas de voltametria cíclica (CV) e voltametria de onda quadrada (SWV), foram realizadas utilizando-se um potenciostato/galvanostato (Autolab PGSTAT 101) e o software NOVA (versão 1.10) para aquisição de dados. As medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foram realizadas em um potenciostato/galvanostato (Autolab PGSTAT 128N) com módulo de impedância FRA. Para todas as medidas eletroquímicas, empregou-se um sistema de três eletrodos: i) um GCE (diâmetro  $2,0 \pm 0,1$  mm, produzido pela Metrohm Autolab) utilizado como eletrodo de trabalho; ii) uma placa de platina (aproximadamente  $0,5 \text{ cm}^2$ ) usada como contra-eletrodo e iii) um eletrodo de referência prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) com solução interna de KCl ( $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ).

A caracterização morfológica das nanopartículas foi feita por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) utilizando o equipamento JEOL JEM-2100, operando a 100 kV. Para isso, as amostras de MGNnP-PEI e MGNnP-PEI-ab-MC-LR foram depositadas numa grade de cobre revestida com carbono, sobre a qual foram analisadas. Estas microscopias foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME – UFSC, Florianópolis, Brasil).

## 3.3 METODOLOGIA

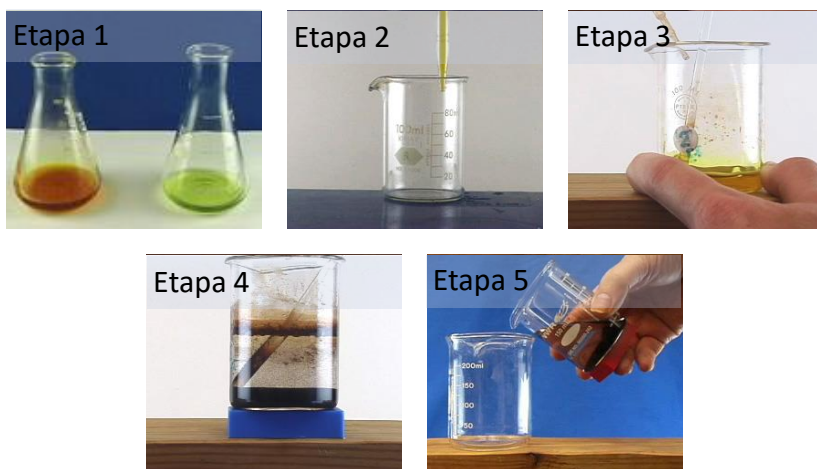
### 3.3.1 Síntese das nanopartículas de magnetita (MGNnP)

Baseado no procedimento experimental descrito por Kang e colaboradores (1996), foram preparadas duas soluções de 10 mL contendo 2,175 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e 0,816 g de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , respectivamente (Etapa 1). Posteriormente, as duas soluções foram transferidas para um béquer de 500 mL e o volume foi completado com 75 mL de água deionizada (Etapa 2). Sobre essa solução, foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de ácido clorídrico  $2,0 \text{ mol L}^{-1}$  para evitar a hidrólise dos sais de ferro.

Na etapa seguinte, foram adicionados sob agitação mecânica, 62,5 mL da solução de hidróxido de sódio  $1,5 \text{ mol L}^{-1}$  (Etapa 3). Após isso, foi formado um precipitado preto (nanopartículas de magnetita) e a solução contendo as MGNnPs foi mantida sob agitação mecânica por 15 minutos (XIANG, Y.; WANG, J., 2011) (Etapa 4). Em seguida, as MGNnPs foram lavadas com água deionizada. Na etapa de lavagem, as

MGNnPs foram separadas do sobrenadante com o auxílio de um ímã de neodímio. Após isso, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado água deionizada ao béquer contendo as MGNnPs (Etapas 5). O processo de descarte do sobrenadante e adição de água deionizada, foi repetido por 4 vezes, a qual a última água de lavagem apresentou pH 7,0. As etapas de síntese e lavagem estão representas na Figura 22.

**Figura 22** – Etapas de síntese e lavagem das nanopartículas de magnetita (MGNnPs).

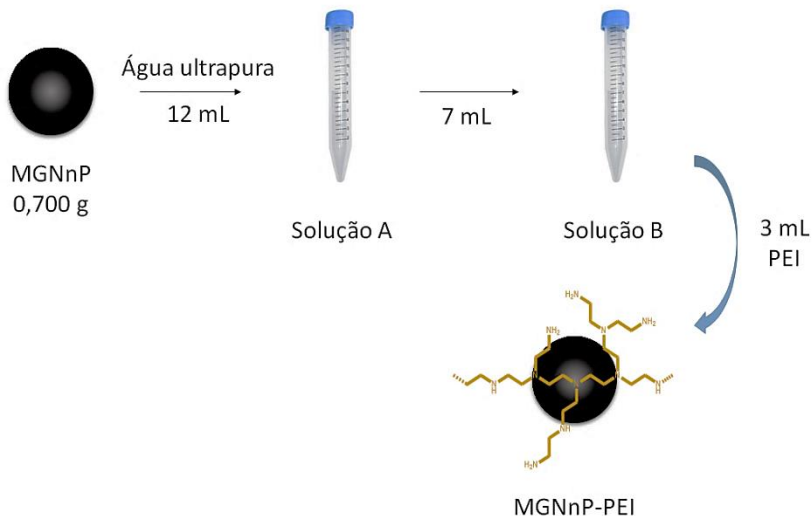


Fonte: Lisensky (2012).

### 3.3.2 Preparo da suspensão de nanopartículas de magnetita estabilizadas em PEI (MGNnPs-PEI)

Para a estabilização das MGNnPs, uma massa de 0,700 g de magnetita foi pesada em um tubo falcon com capacidade de 14 mL. Logo após a pesagem, uma alíquota de 12 mL de água ultrapura foi adicionada (solução A). Para um segundo tubo falcon, foram transferidos 7 mL da solução A, sendo esta solução resultante contendo as nanopartículas de magnetita, denominada solução B. Sobre a solução B, foram adicionados 3 mL de PEI (1,2 g / 3 mL), tendo como resultado a formação de uma monocamada de PEI sobre a superfície da nanopartícula (MGNnPs/PEI) (Figura 23).

**Figura 23** – Preparo da suspensão de nanopartículas de magnetita (MGNnP) estabilizadas em PEI.



Fonte: Autoria própria (2019).

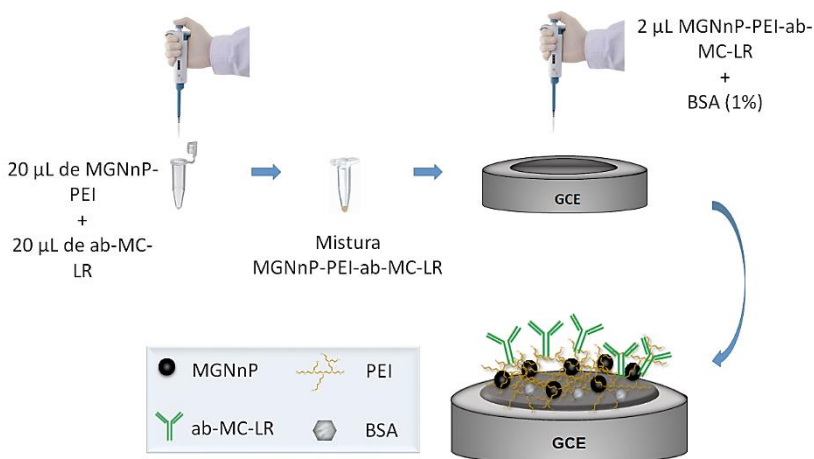
### 3.3.3 Construção do imunossensor

Inicialmente, uma suspensão aquosa de alumina (granulometria de  $0,05 \mu\text{m}$ ) foi utilizada para o polimento manual da superfície do eletrodo de GCE, sendo utilizado como base para fricção, o tecido de polimento (feltro). O polimento foi realizado fazendo-se movimentos em forma de “oito”, durante 1 min. As partículas residuais de alumina foram removidas por meio de lavagem com água ultrapura e banho de ultrassom com água ultrapura durante 10 min.

Após a limpeza da superfície do GCE, foram misturados em um eppendorf  $20,0 \mu\text{L}$  da solução de MGNnP-PEI e  $20,0 \mu\text{L}$  da solução de ab-MC-LR ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), sendo essa mistura mantida sob agitação mecânica por 1 min, para que houvesse a incorporação dos anticorpos no nanomaterial. Em seguida,  $2,0 \mu\text{L}$  da mistura (MGNnP-PEI-ab-MC-LR) foram gotejados sobre a superfície do eletrodo GCE com o auxílio de uma micropipeta, sendo o eletrodo posteriormente colocado em um dessecador sob vácuo até a evaporação do solvente (cerca de 10 min). Por último, sobre o eletrodo foi adicionado BSA 1% (m/v) para bloquear possíveis sítios ativos que possam interferir no reconhecimento do antígeno pelo anticorpo (Figura 24).



**Figura 24** – Etapas envolvidas na construção do imunossensor.



Fonte: Autoria própria (2019).

### 3.3.4 Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas (CV e SWV) foram realizadas à temperatura ambiente ( $\approx 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) em uma célula eletroquímica contendo 15 mL do eletrólito suporte PBS ( $0,01\text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5) e hidroquinona ( $0,1\text{ mmol L}^{-1}$ ), como sonda redox. As medidas da SWV foram obtidas utilizando-se o software NOVA 1.10 na faixa de potencial de  $-0,4$  a  $0,6\text{ V vs. Ag/AgCl}$  ( $\text{KCl } 3,0\text{ mol L}^{-1}$ ), frequência 60 Hz, incremento 2 mV e amplitude 100 mV. Todas as medidas empregando o imunossensor proposto, foram realizadas em duplicatas.

Os experimentos de EIS foram realizados utilizando  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  ( $5\text{ mmol L}^{-1}$ ) como sonda eletroquímica em circuito aberto com amplitude de 10 mV e faixa de frequências de 100000 a 0,1 Hz.

### 3.3.5 Precisão e estabilidade do método

A precisão da metodologia proposta foi avaliada a partir do desvio padrão relativo (RSD) entre as medidas, realizadas em duplicatas, de testes de repetibilidade intra-day e inter-day. O estudo de repetibilidade intra-day foi realizado a partir do preparo de seis imunossensores (GCE/MGNNP-PEI-ab-MC-LR), sob as mesmas condições experimentais (técnica voltamétrica SWV, tampão PBS 0,01

mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5 e solução de hidroquinona 0,1 mmol L<sup>-1</sup>, como sonda redox). Em cada imunossensor foi feita a incubação, por 40 min, de 2 µL de MC-LR 5,0 ng mL<sup>-1</sup>, sendo as medidas eletroquímicas realizadas no mesmo dia. O estudo de repetibilidade inter-day foi realizado também utilizando a concentração 5,0 ng mL<sup>-1</sup> de MC-LR, sob as mesmas condições experimentais descritas anteriormente, porém as medidas eletroquímicas dos imunossensores foram realizadas em seis dias diferentes (n = 6).

A estabilidade do imunossensor frente a resposta eletroquímica para a MC-LR, foi investigada a partir da análise de uma solução de MC-LR 50,0 ng mL<sup>-1</sup>. Este estudo foi realizado de acordo com as seguintes etapas: i) construiu-se o imunossensor (GCE/MGNnP-PEI-ab-MC-LR); ii) foi feita a incubação, por 40 min, de 2 µL do antígeno MC-LR (50,0 ng mL<sup>-1</sup>); iii) realizou-se a medida da resposta de corrente suprimida; iv) o imunossensor foi seco e armazenado na geladeira em temperatura de aproximadamente 4 °C e v) após sete dias, foi realizada novamente a incubação do imunossensor contendo MC-LR 50,0 ng mL<sup>-1</sup>, sob as mesmas condições de trabalho, e a supressão da resposta de corrente foi comparada com a resposta inicial obtida antes do armazenamento.

### 3.3.6 Exatidão do método e quantificação de MC-LR

O ensaio de recuperação foi utilizado como forma de avaliar a exatidão do método proposto. Este estudo consistiu na fortificação de alíquotas da amostra com diferentes volumes de um padrão de MC-LR (500 ng mL<sup>-1</sup>), de modo que se obtivessem soluções padrão com as seguintes concentrações: 1) 5,0 ng mL<sup>-1</sup>; 2) 10,0 ng mL<sup>-1</sup>; 3) 15,0 ng mL<sup>-1</sup> e 4) 20,0 ng mL<sup>-1</sup> de MC-LR. No preparo destas soluções padrão, inicialmente foram separados quatro eppendorfs contendo, respectivamente, os volumes de 990, 980, 970 e 960 µL da amostra de água da Lagoa do Peri. Posteriormente, os volumes destes eppendorfs foram completados, na mesma ordem, com 10, 20, 30 e 40 µL de um padrão de MC-LR (500 ng mL<sup>-1</sup>), tendo como resultado soluções padrão com o volume final de 1,0 mL.

Este procedimento pode ser melhor compreendido na Tabela 4, a qual expressa os respectivos volumes de amostra e do padrão de MC-LR (500 ng mL<sup>-1</sup>) adicionados no preparo das soluções padrão utilizadas para o ensaio de recuperação da MC-LR.

**Tabela 4** – Respetivos volumes de amostra e do padrão de MC-LR (500 ng mL<sup>-1</sup>) adicionados no preparo das soluções padrão utilizadas para o ensaio de recuperação da MC-LR.

Solução padrão de MC-LR (ng mL <sup>-1</sup> )	Volume adicionado de amostra (μL)	Volume adicionado do padrão (500 ng mL <sup>-1</sup> ) de MC-LR (μL)
5,0	990	10
10,0	980	20
15,0	970	30
20,0	960	40

Estas soluções padrão foram, posteriormente, utilizadas via técnica analítica SWV, para a construção da curva de calibração pelo método de adição de padrão. Para verificar a eficiência do método, a curva de calibração construída neste estudo, também foi utilizada para quantificação da MC-LR na amostra de água da Lagoa do Peri.



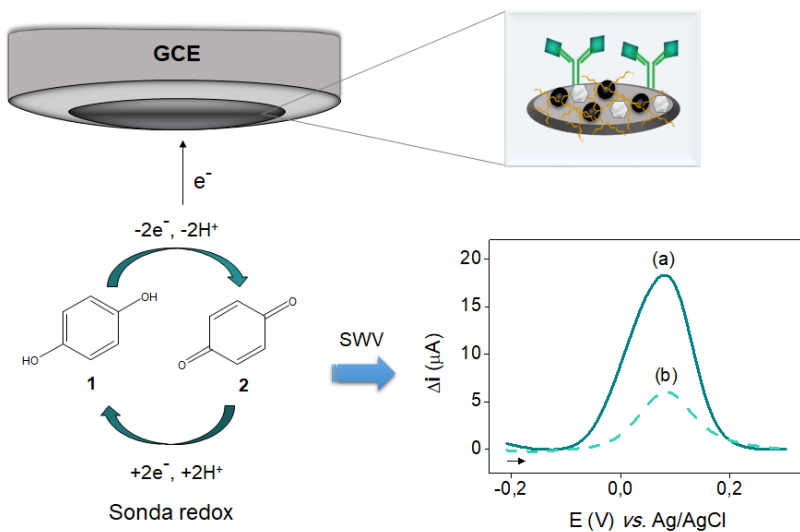
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DO IMUNOSSENSOR

O imunossensor eletroquímico utilizado neste trabalho está incluído na classe de imunossensores amperométricos, os quais se baseiam na geração de corrente como resposta do comportamento redox do analito alvo na superfície do eletrodo de trabalho. Devido ao comportamento redox inativo do analito (MC-LR), foi utilizada a molécula de hidroquinona como sonda redox, por ser eletroquimicamente ativa quando o potencial é aplicado (SILVA, 2017).

A Figura 25 demonstra a reação redox que ocorre na superfície do eletrodo GCE após a aplicação de potencial na faixa de -0,4 a 0,6 V vs. Ag/AgCl.

**Figura 25** – Representação esquemática do funcionamento do imunossensor eletroquímico baseado na oxidação da sonda redox, hidroquinona ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em solução tampão PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ; pH 7,5) por SWV: (a) resposta de corrente referente à modificação da superfície de GCE pela mistura MGNnP-PEI-ab-MC-LR-BSA; (b) medida de corrente na presença do antígeno (MC-LR).



Nesse sistema, quando o potencial é aplicado no sentido anódico, a hidroquinona (Figura 25-1) sofre oxidação, sendo posteriormente convertida na sua forma oxidada *p*-benzoquinona (Figura 25-2). Os elétrons envolvidos neste processo são transferidos da solução para a superfície do GCE sendo, portanto, gerado um sinal de corrente referente ao eletrodo GCE não modificado. Após a modificação do GCE com o filme polimérico MGNnP-PEI contendo anticorpos ab-MC-LR, realiza-se por SWV, medida de corrente do imunossensor em solução PBS, onde o sinal de corrente gerado por esta modificação é denominado pico base (Figura 25-a).

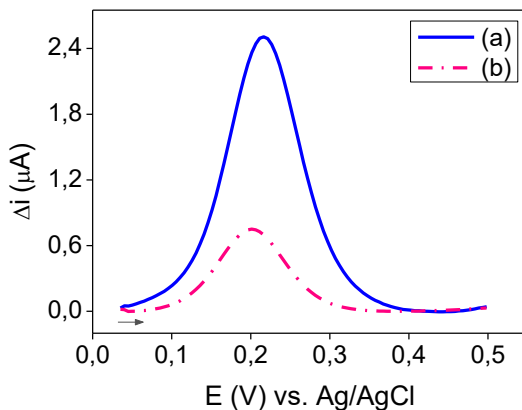
Após a medida do pico base, uma amostra contendo MC-LR é adicionada e espera-se a incubação do antígeno por um período de 40 min. À medida que as moléculas de MC-LR ligam-se especificamente à superfície do imunossensor, ocorre a formação do imunocomplexo e, conseqüentemente, um bloqueio parcial da superfície eletroativa é formado. Ao se bloquear a superfície do imunossensor, o transporte de elétrons na interface eletrodo/solução é dificultado, tendo como resultado o decaimento da corrente em relação ao pico base (Figura 25-b) sendo, este sinal de corrente, proporcional à concentração de MC-LR presente na solução analisada.

## 4.2 ESCOLHA DA TÉCNICA VOLTAMÉTRICA

Devido ao fato das técnicas de pulso apresentarem respostas mais sensíveis que as demais técnicas voltamétricas, foi escolhida para a quantificação do analito a técnica pulsada que fornecesse a melhor resposta de corrente para o imunossensor. Dessa forma, as técnicas SWV e DPV foram aplicadas ao eletrodo modificado com MGNnP, tendo como resultado uma melhor resposta de corrente para a técnica SWV.

A Figura 26 apresenta os voltamogramas obtidos neste estudo, onde observa-se um sinal de corrente resultante ( $\Delta i$ ) aproximadamente 3 vezes maior para a SWV, sendo esta, a técnica escolhida para realizar as medidas eletroquímicas das demais etapas deste trabalho.

**Figura 26** – Voltamogramas obtidos para as técnicas eletroanalíticas: (a) SWV e (b) DPV, utilizando-se o eletrodo GCE modificado com MGNnP em eletrólito suporte PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5) e sonda redox hidroquinona ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ).



#### 4.3 ESTUDO DE ESTABILIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

O emprego de nanopartículas metálicas na construção do imunossensor proposto teve como objetivo facilitar a transferência de elétrons que ocorre na interface eletrodo/solução, para que dessa forma, fosse obtida uma maior resposta eletroquímica. Com isso, buscou-se modificar a superfície do eletrodo GCE de modo que fossem criados grupos funcionais que favorecessem tanto a imobilização, como a reatividade e seletividade do par anticorpo/antígeno.

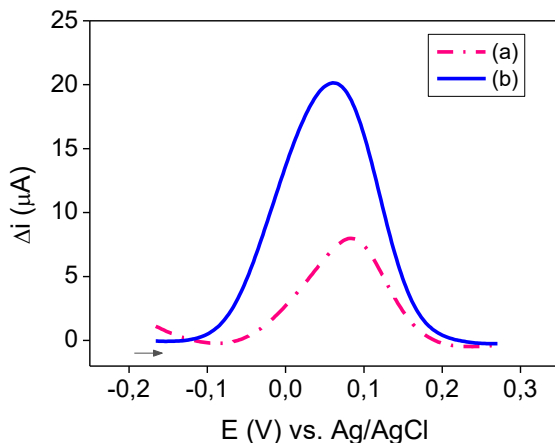
Para o desenvolvimento desse trabalho, foram selecionadas nanopartículas de magnetita (MGNnP) como modificador da superfície do GCE. Esse nanomaterial apresenta grupos funcionais (-OH) capazes de reagir com diferentes estabilizantes e, além disso, apresentam ácidos de Lewis ( $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ ) em sua estrutura, os quais facilitam o processo de transferência de elétrons que ocorre na interface eletrodo/solução (CHANTAROJSIRI; ZILLER; YANG, 2018).

O uso de estabilizantes para as MGNnPs, torna-se necessário pelo fato destes contribuírem para uma maior adesão das nanopartículas na superfície do eletrodo, bem como, por proporcionarem a formação de sistemas coloidais mais estáveis. Além disso, os efeitos indutivos e eletrostáticos do estabilizante também influenciam na cinética envolvida na transferência de carga que ocorre na superfície do eletrodo (CHANTAROJSIRI; ZILLER; YANG, 2018).

Para a escolha do estabilizante a ser utilizado para funcionalizar as nanopartículas de MGNnPs, foi realizado um estudo preliminar com a quitosana, ácido láurico, ácido oleico, Nafion e polietilenoimina (PEI), o qual teve como objetivo avaliar a resposta de corrente do imunossensor contendo os diferentes estabilizantes. Este estudo mostrou que a quitosana, o ácido láurico e o ácido oleico, apresentaram efeito isolante já que, no processo de funcionalização das MGNnPs, houve a formação de uma espessa camada destes estabilizantes sobre as nanopartículas, fazendo com que estas se agregassem e bloqueassem a superfície do eletrodo de carbono vítreo. Dessa forma, os estabilizantes escolhidos neste trabalho para a funcionalização das MGNnPs foram os polímeros Nafion e polietilenoimina (PEI).

A Figura 27 mostra os voltamogramas de SWV obtidos utilizando-se o eletrodo de carbono vítreo modificado com os filmes MGNnP-Nafion (Figura 27-a) e MGNnP-PEI (Figura 27-b). Como pode ser observado, a maior resposta de corrente resultante ( $\Delta i$ ) foi obtida para o filme MGNnP-PEI, sendo este sinal aproximadamente 2,5 vezes maior que o MGNnP-Nafion. Foi observado também, um deslocamento do potencial de pico ( $E_p$ ) para o filme MGNnP-PEI, o qual apresentou potenciais de pico mais negativos que os apresentados pelo filme MGNnP-Nafion.

**Figura 27** – Voltamogramas de onda quadrada obtidos utilizando-se o eletrodo de carbono vítreo modificado com: (a) CGE/MGNnP-Nafion e (b) CGE/MGNnP-PEI, em eletrólito suporte PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5) e sonda redox hidroquinona (0,1 mmol L<sup>-1</sup>).





Como o processo de transferência de carga ocorre na interface eletrodo/solução, a maior presença de grupos retiradores de elétrons ( $-\text{SO}_3$ ) presentes no filme MGNnP-Nafion, aumentou a resistência à transferência de carga na superfície do GCE, tendo como consequências uma menor resposta de corrente e um deslocamento do  $E_p$  para valores mais positivos. Em contrapartida, a condutividade eletrônica atribuída aos grupos amino presentes na PEI, facilitou o transporte de elétrons provenientes da oxidação da hidroquinona, fazendo com que houvesse um favorecimento cinético e um deslocamento do  $E_p$  para valores mais negativos.

A partir disso, foi escolhido o filme MGNnP-PEI para ser utilizado na construção do imunossensor como plataforma imobilizadora das biomoléculas anticorpo/antígeno. A escolha da PEI como polímero estabilizante foi feita não apenas pelo seu maior valor relativo de corrente, mas também porque o filme MGNnP-Nafion apresentou uma maior agregação das nanopartículas. Esta agregação foi observada após o processo de secagem do filme no dessecador, a qual foi possível constatar a presença de pequenos precipitados sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo. A presença destes aglomerados, levou a interferências nas medidas de corrente e, conseqüentemente, observou-se uma menor repetibilidade das análises para o imunossensor contendo o filme MGNnP-Nafion.

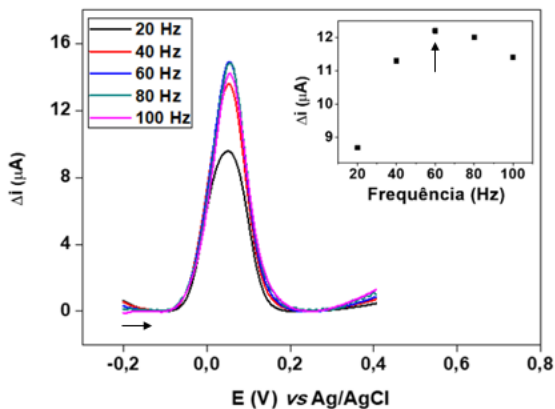
#### 4.4 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA TÉCNICA VOLTAMÉTRICA

Após a estabilização das nanopartículas de MGNnP com o polímero PEI, foram otimizados os parâmetros (frequência, incremento e amplitude) da técnica eletroanalítica SWV, onde foi feita a avaliação de cada parâmetro separadamente, sendo avaliado primeiramente a frequência, em seguida o incremento e por último a amplitude. A medida em que o estudo de um parâmetro foi feito, os outros parâmetros foram fixados em um valor médio da faixa escolhida. Este procedimento foi realizado utilizando-se o software NOVA 1.10 na faixa fixa de potencial de  $-0,4$  a  $0,6$  V vs. Ag/AgCl, tampão PBS ( $0,01$  mol  $\text{L}^{-1}$ ; pH 7,5) como eletrólito suporte e hidroquinona ( $0,1$  mmol  $\text{L}^{-1}$ ) como sonda redox. Todas as medidas foram realizadas em duplicata.

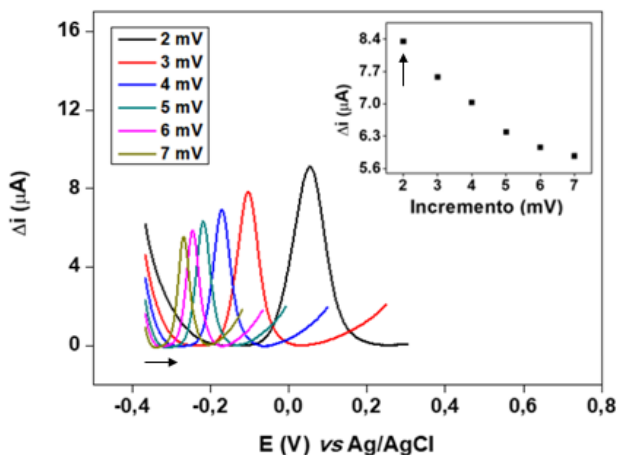
O objetivo da otimização dos parâmetros foi avaliar o melhor desempenho do imunossensor, ou seja, a maior resposta de corrente obtida para cada parâmetro. Para isso, avaliaram-se os sinais das correntes resultantes  $\Delta i$ , onde  $\Delta i$  representa a diferença entre as

correntes diretas e inversas ( $\Delta i = i_d - i_i$ ) apresentadas pela técnica SWV. O estudo do efeito dos parâmetros de SWV sobre a reposta analítica foi feito para as faixas de 20-100 Hz (frequência), 2-7 mV (incremento) e 20-100 mV (amplitude), como representado nas Figuras 28, 29 e 30, respectivamente.

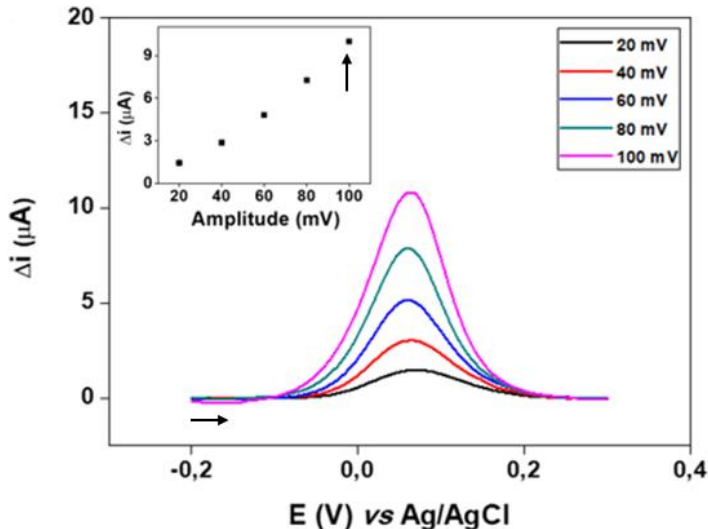
**Figura 28** – Voltamogramas obtidos a partir da técnica SWV, os quais representam os sinais de corrente resultante ( $\Delta i$ ) referentes ao estudo da frequência na faixa de 20 a 100 Hz, em eletrólito suporte PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5) e sonda redox hidroquinona (0,1 mmol L<sup>-1</sup>).



**Figura 29** – Voltamogramas obtidos a partir da técnica SWV, os quais representam os sinais de corrente resultante ( $\Delta i$ ) referentes ao estudo do incremento de potencial na faixa de 2 a 7 mV, em eletrólito suporte PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5) e sonda redox hidroquinona (0,1 mmol L<sup>-1</sup>).



**Figura 30** – Voltamogramas obtidos a partir da técnica SWV, os quais representam os sinais de corrente resultante ( $\Delta i$ ) referentes ao estudo da amplitude na faixa de 20 a 100 mV, em eletrólito suporte PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5) e sonda redox hidroquinona (0,1 mmol L<sup>-1</sup>).



A partir dos dados experimentais obtidos, pode-se observar que a maior resposta de corrente, para o eletrodo de carbono vítreo modificado com o filme MGNnP-PEI, foi obtida empregando-se os parâmetros: 60 Hz (frequência); 2 mV (incremento) e 100 mV (amplitude). Portanto, esses valores foram os selecionados e usados para a realização das medidas eletroquímicas referentes ao desenvolvimento do imunossensor proposto.

#### 4.5 ESTUDO DA PROPORÇÃO NANOPARTÍCULA/ÁGUA

Este estudo teve como objetivo escolher a proporção de nanopartícula/água que obtivesse maior resposta relativa (%) de corrente para o imunossensor proposto. Para isso, foram preparadas diferentes soluções, nas quais utilizou-se o volume de 500  $\mu L$  da suspensão MGNnP-PEI e variou-se o volume de água adicionado. As proporções preparadas foram: I) **1:1** (500  $\mu L$  MGNnP-PEI + 500  $\mu L$  água); II) **1:2** (500  $\mu L$  MGNnP-PEI + 1000  $\mu L$  água) e III) **1:3** (500  $\mu L$  MGNnP-PEI + 1500  $\mu L$  água).

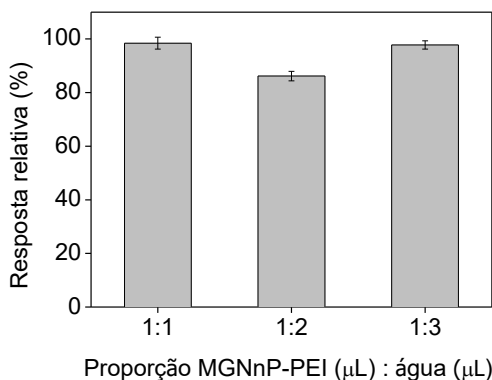
A partir de voltamogramas de onda quadrada obtidos para as

diferentes soluções (1:1, 1:2 e 1:3) de MGNnP-PEI/água, construiu-se o gráfico apresentado na Figura 31, sendo a resposta relativa de corrente (%) calculada conforme a Equação 2 abaixo.

$$Resposta\ relativa\ \% = \frac{(\Delta i) \times 100}{\Delta i_{m\acute{a}x}} \quad (2)$$

Onde  $\Delta i$  representa a resposta de corrente resultante obtida para cada solução de MGNnP-PEI/água e  $\Delta i_{m\acute{a}x}$  representa o maior valor de corrente obtido para as diferentes proporções.

**Figura 31** – Estudo da resposta relativa de corrente em função das proporções (1:1, 1:2 e 1:3) de MGNnP-PEI/água utilizadas na construção do imunossensor proposto, sendo este estudo, obtido a partir da técnica SWV, em eletrólito suporte PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5) e sonda redox hidroquinona (0,1 mmol L<sup>-1</sup>).



A Figura 31 mostra que os valores de corrente para as proporções 1:1 e 1:3, foram consideravelmente próximos, sendo escolhida para a construção do imunossensor, a solução 1:3. Isso se deve ao fato de ser possível realizar um maior número de análises, já que o volume final da solução utilizando a proporção 1:3 (2000 μL) foi maior que o volume final utilizando a 1:1 (1000 μL).

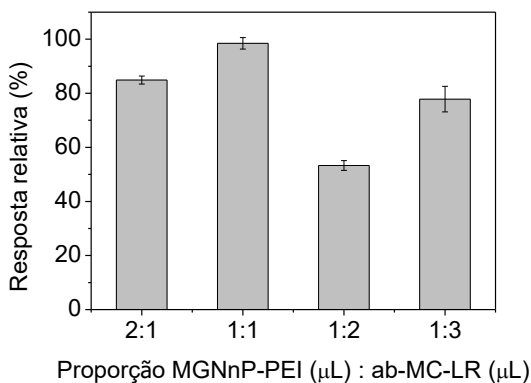
#### 4.6 ESTUDO DA PROPORÇÃO MGNnP-PEI/ANTICORPO

Este estudo teve como objetivo escolher a proporção de nanopartícula/anticorpo que obtivesse maior resposta relativa de corrente para o imunossensor proposto. Para isso, foram preparadas

quatro diferentes proporções, onde se manteve constante o volume de 20  $\mu\text{L}$  de dispersão de nanopartículas MGNnP-PEI e variou-se o volume da solução de anticorpo ab-MC-LR ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). As proporções escolhidas para a realização deste estudo foram: I) **2:1** (20  $\mu\text{L}$  MGNnP-PEI + 10  $\mu\text{L}$  ab-MC-LR); II) **1:1** (20  $\mu\text{L}$  MGNnP-PEI + 20  $\mu\text{L}$  ab-MC-LR); III) **1:2** (20  $\mu\text{L}$  MGNnP-PEI + 40  $\mu\text{L}$  ab-MC-LR) e IV) **1:3** (20  $\mu\text{L}$  MGNnP-PEI + 60  $\mu\text{L}$  ab-MC-LR).

A partir dos dados experimentais, foi possível calcular o valor da reposta relativa de corrente  $[(\Delta i/\Delta i_{\text{máx}}) \times 100]$  para as diferentes proporções de nanopartícula/anticorpo. Conforme observado no gráfico da Figura 32, o valor máximo de corrente  $\Delta i$  foi encontrado para a solução 1:1 sendo, portanto, esta a solução escolhida para utilizar na construção do imunossensor.

**Figura 32** – Estudo da resposta relativa de corrente em função das proporções (2:1, 1:1, 1:2 e 1:3) de MGNnP-PEI/ab-MC-LR utilizadas na construção do imunossensor proposto, sendo este estudo, obtido a partir da técnica SWV, em eletrólito suporte PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5) e sonda redox hidroquinona ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ).



#### 4.7 ESTUDO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO DO ANTÍGENO

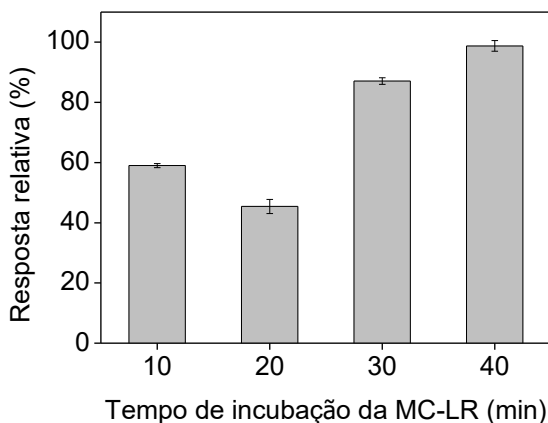
O tempo de incubação do antígeno é um parâmetro utilizado para avaliar o tempo necessário para o diagnóstico do imunossensor. No presente trabalho, este estudo foi avaliado com o objetivo de escolher o tempo de incubação onde fosse encontrada a maior supressão de resposta para o imunossensor, indicando dessa forma, uma maior interação do par antígeno-anticorpo. Para isso, foram avaliados os

valores de corrente resultante  $\Delta i$  para os tempos de incubação de 10, 20, 30 e 40 min, utilizando uma solução padrão de MC-LR ( $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ) (Figura 33).

A partir da Figura 33, pode-se observar que houve uma considerável diferença entre os valores de supressão para os tempos avaliados, indicando que o tempo de incubação do antígeno afeta consideravelmente a formação do imunocomplexo sobre a superfície do imunossensor.

O maior valor de supressão de corrente está relacionado ao maior bloqueio parcial da superfície do eletrodo de carbono vítreo. Quanto maior a interação efetiva entre o antígeno (MC-LR) e o anticorpo (ab-MC-LR), maior também será este bloqueio. Por isso, devido a maior supressão de resposta ter sido para o tempo de 40 min, este foi o tempo escolhido como sendo ideal para realizar as demais etapas deste trabalho.

**Figura 33** – Resposta relativa dos valores de supressão obtidas para o imunossensor nos tempos de incubação de 10, 20, 30 e 40 min, sendo este estudo realizado por SWV, utilizando-se uma solução padrão  $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$  do antígeno MC-LR, em eletrólito suporte PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5) e sonda redox hidroquinona ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ).



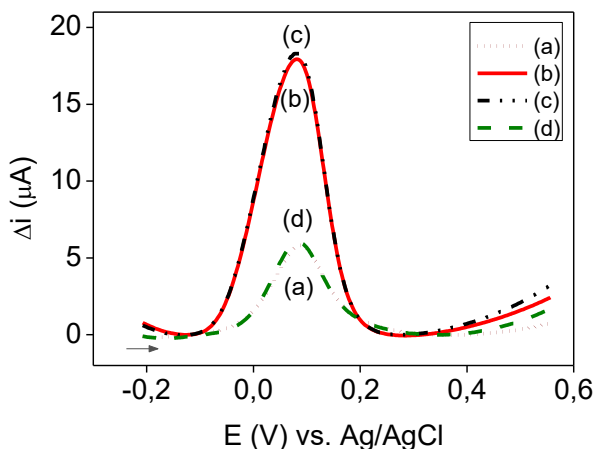
De maneira geral, os trabalhos atualmente publicados sobre imunossensores eletroquímicos para a detecção de MC-LR, apresentam tempos de incubação variando de 10 a 240 min (ZANATO *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2013; LIN *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2015; ZHANG J. *et al.*, 2016; TALAMINI *et al.*, 2018; DU *et al.*, 2014). Com relação aos

valores reportados pela literatura, o imunossensor proposto apresentou um tempo de incubação intermediário.

#### 4.8 ESTUDO DA CONTRIBUIÇÃO DO MODIFICADOR

Neste estudo, foi utilizado como modificador as nanopartículas de magnetita estabilizadas em PEI, na qual foi avaliada a alteração no sinal de corrente com relação ao valor obtido para o GCE não modificado. Para isso, mediu-se o valor de corrente  $\Delta i$  para as diferentes etapas de construção do imunossensor: (a) GCE não modificado; (b) GCE/MGNnP-PEI; (c) GCE/MGNnP-PEI-ab-MC-LR e (d) GCE/MGNnP-PEI-ab-MC-LR-(MC-LR). As medidas eletroquímicas foram realizadas por SWV, em duplicatas, na faixa de potencial -0,4 a 0,6 V vs. Ag/AgCl e utilizando hidroquinona 0,1 mmol L<sup>-1</sup> em tampão PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>; pH 7,5). A Figura 34 mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos para as diferentes etapas de construção do imunossensor.

**Figura 34** – Voltamogramas de onda quadrada obtidos para as diversas etapas na construção do imunossensor: (a) GCE não modificado; (b) GCE/MGNnP-PEI; (c) GCE/MGNnP-PEI-ab-MC-LR e (d) GCE/MGNnP-PEI-ab-MC-LR-(MC-LR), utilizando como sonda redox hidroquinona 0,1 mmol L<sup>-1</sup> em tampão PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>; pH 7,5).



Em todos os casos, pode-se observar que a presença do modificador contribuiu para a cinética da reação redox da hidroquinona,

possibilitando uma corrente resultante 3 vezes maior que a resposta do GCE não modificado. Este fato pode estar associado à presença dos ácidos de Lewis ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ) contidos nas nanopartículas MGNnP, as quais facilitam a transferência de elétrons que ocorre na interface eletrodo solução. Observa-se também que após a introdução do antígeno MC-LR, o imunossensor apresentou resposta de corrente semelhante ao eletrodo de carbono vítreo (Figura 34-d). Foi comprovado, por medidas sucessivas de corrente, que esse comportamento não está relacionado com a dessorção do filme para a solução. Esse procedimento foi feito após sucessivas imersões do imunossensor na solução de PBS, sendo posteriormente medida a corrente após cada imersão, onde se observou que o valor de corrente se manteve praticamente constante, indicando que o filme MGNnP-PEI-ab-MC-LR-(MC-LR) permaneceu sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo. Esse fato também foi comprovado visualmente.

Com isso, este estudo mostrou que por apresentar uma estrutura tridimensional, hidrofílica e altamente ramificada, a utilização do polímero PEI como modificador possibilitou o aumento da área eletroativa, além de também, melhorar a condutividade do eletrodo. A presença da PEI também pôde facilitar a imobilização dos anticorpos ab-MC-LR e do antígeno MC-LR.

#### 4.9 ESTUDO DO pH DO ELETRÓLITO SUPORTE

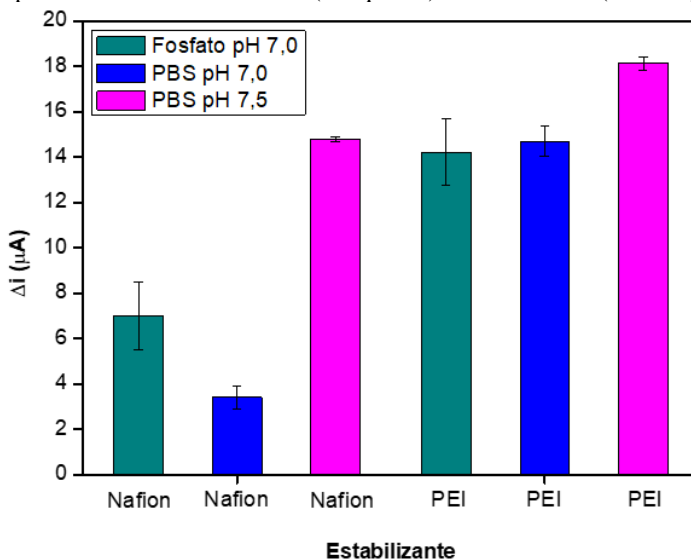
Devido ao fato do pH do eletrólito suporte influenciar diretamente no comportamento eletroquímico das espécies envolvidas na reação redox, foi realizado um estudo do eletrólito suporte e do seu respectivo pH, tendo como objetivo a otimização do desempenho analítico do imunossensor, de modo a obter uma maior resposta de corrente empregando-se a sonda redox hidroquinona. Este estudo foi realizado nos eletrólitos suporte fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0) e PBS  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0 e 7,5), sendo as medidas eletroquímicas realizadas por SWV, sonda redox hidroquinona  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  e eletrodos de carbono vítreo modificados, separadamente, pelos filmes poliméricos MGNnP-Nafion e MGNnP-PEI.

No gráfico apresentado na Figura 35, pode-se observar (a esquerda) os valores de corrente obtidos para o eletrodo de carbono vítreo contendo o filme MGNnP-Nafion no eletrólito suporte fosfato (pH 7,0) e no eletrólito suporte PBS (pH 7,0 e 7,5). A partir deste gráfico, observa-se que o maior valor de corrente, para o filme MGNnP-Nafion, foi obtido em PBS  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,5). Este estudo também



mostrou que o maior valor de corrente, para o eletrodo de carbono vítreo modificado pelo filme MGNnP-PEI, também foi obtido em PBS 0,01 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,5). Com isso, foi possível concluir que o pH do eletrólito suporte apresentou forte influência sobre o processo redox ocorrido na interface eletrodo/solução quando se utilizou o filme MGNnP-Nafion e quando comparado com o filme MGNnP-PEI, o filme MGNnP-Nafion apresentou menor resposta de corrente em todos os valores de pH testados.

**Figura 35** – Estudo da corrente resultante  $\Delta i$  obtida para os eletrólitos suporte fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0) e PBS 0,01 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0 e 7,5), sendo as medidas eletroquímicas realizadas por SWV, sonda redox hidroquinona 0,1 mmol L<sup>-1</sup> e eletrodos de carbono vítreo modificados, separadamente, pelos filmes poliméricos MGNnP-Nafion (à esquerda) e MGNnP-PEI (à direita).

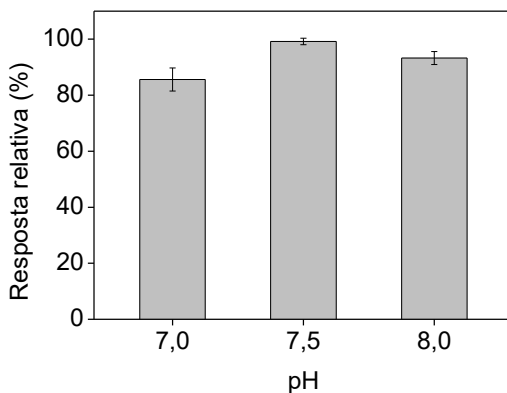


Após a escolha do PBS 0,01 mol L<sup>-1</sup> como eletrólito suporte, foi realizado outro estudo de pH, agora variando-se o pH do PBS 0,01 mol L<sup>-1</sup> na faixa de 7,0-8,0. Esta faixa de potencial foi escolhida pelo fato de que, em pH 10, a PEI é praticamente neutra e, por isso, há uma menor troca de prótons entre os grupos amino e a solução do eletrólito suporte. Essa menor troca de prótons possivelmente pode influenciar na condutividade da PEI, tendo como consequência uma menor reposta de corrente. Devido também ao fato dos anticorpos possuírem natureza

proteica, procurou-se não se utilizar valores de pH maiores que 10 ou menores que 6 para que não ocorresse a desnaturação proteica dos anticorpos.

A partir dos dados experimentais obtidos (Figura 36), nota-se que a maior corrente de pico resultante, para a hidroquinona, foi obtida para o pH 7,5, sendo este o valor de pH escolhido para todas as demais etapas deste trabalho.

**Figura 36** – Estudo da resposta relativa de corrente obtida para o eletrólito suporte PBS 0,01 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0, 7,5 e 8,0), sendo as medidas eletroquímicas realizadas por SWV, sonda redox hidroquinona 0,1 mmol L<sup>-1</sup> e eletrodo de carbono vítreo modificado pelo filme polimérico MGNnP-PEI.



#### 4.10 COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO

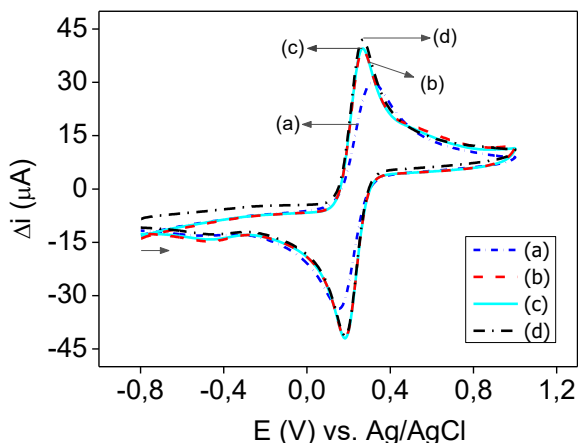
O comportamento eletroquímico referente à modificação da superfície do eletrodo foi avaliado por voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). Estes estudos permitiram avaliar, separadamente, a contribuição do modificador nas diferentes etapas de construção do imunossensor.

Para a realização das medidas de impedância eletroquímica, foram testados diferentes eletrólitos suportes e diferentes sondas redox para que fosse escolhido o sistema onde se obtivesse uma maior resposta de corrente para o imunossensor desenvolvido. Os eletrólitos suporte utilizados neste estudo foram: KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, KCl 0,01 mol L<sup>-1</sup> e PBS 0,01 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,5). Como sonda redox, foram testadas hidroquinona (0,1 mmol L<sup>-1</sup>) e o par redox [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> na concentração 5,0 mmol L<sup>-1</sup>. Para o eletrólito suporte KCl 0,01 mol L<sup>-1</sup>, não houve a formação do semicírculo resistivo no gráfico de Nyquist e para o eletrólito PBS

contendo sonda redox hidroquinona, houve a formação do semicírculo, porém os semicírculos apresentaram consideráveis deslocamentos na resistência ôhmica. Portanto, a solução utilizada para as análises de CV e EIS, foi a solução 5,0 mmol L<sup>-1</sup> do par redox [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> preparado em KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

A Figura 37 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para o sistema [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> nas seguintes etapas de construção do imunossensor: (a) GCE não modificado; (b) GCE/MGNnP-PEI; (c) GCE/MGNnP-PEI-ab-MC-LR e (d) GCE/PEI. A partir dos voltamogramas cíclicos, pôde-se observar que em todos os casos a presença do filme MGNnP-PEI contribuiu para um aumento na corrente de pico em relação ao eletrodo não modificado, indicando dessa forma, um favorecimento cinético da reação de oxirredução na superfície do eletrodo.

**Figura 37** – Voltamogramas cíclicos obtidos para as diversas etapas na construção do imunossensor: (a) GCE não modificado; (b) GCE/MGNnP-PEI; (c) GCE/MGNnP-PEI-ab-MC-LR e (d) GCE/PEI em solução de KCl (0,1 mol L<sup>-1</sup>) contendo [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> (5 mmol L<sup>-1</sup>).



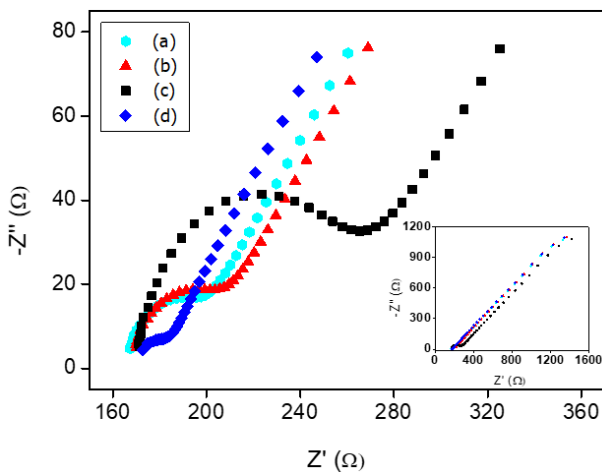
A partir dos valores do potencial de pico anódico  $E_{pa}$  (0,267 V) e potencial de pico catódico  $E_{pc}$  (0,184 V) para o GCE/PEI, foi possível observar que a reversibilidade da reação também foi melhorada, tendo como consequência um menor  $\Delta E_p$  (0,083 V) em relação ao eletrodo não modificado GCE (0,150 V). Outro parâmetro que também vale ressaltar é a razão entre as correntes de pico  $i_{pa}$  (42,7  $\mu A$ )/ $i_{pc}$  (42,2  $\mu A$ ), que para

o imunossensor foi de aproximadamente 1,0, indicando que a quantidade de espécies que se reduziram foi praticamente a mesma das que se oxidaram.

A EIS foi a técnica utilizada para investigar as alterações de impedância causadas pela presença do modificador. Esta técnica serviu para avaliar as propriedades eletroquímicas do imunossensor, principalmente no que diz respeito a resistência à transferência de carga ocorrida na interface eletrodo/solução.

A Figura 38 mostra o diagrama de Nyquist obtido para os seguintes sistemas: (a) GCE/MGNnP-PEI-ab-MC-LR; (b) GCE/MGNnP-PEI; (c) GCE não modificado e (d) GCE/PEI.

**Figura 38** – Diagrama de Nyquist obtido para os seguintes sistemas: (a) GCE/MGNnP-PEI-anti-MC-LR; (b) GCE/MGNnP-PEI; (c) GCE não modificado e (d) GCE/PEI. A amplitude aplicada foi a de 10 mV, na faixa de frequência de 100000 a 0,1 Hz, em solução de KCl (0,1 mol L<sup>-1</sup>) contendo o par redox [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> (5 mmol L<sup>-1</sup>).



A partir deste diagrama, foi possível avaliar a contribuição do modificador para o processo de transferência de carga ocorrida na superfície do eletrodo, onde o diâmetro do semicírculo representa a  $R_{ct}$  e a parte linear corresponde aos processos de difusão. Quanto menor for o diâmetro do semicírculo, menor será a resistência à transferência de carga e, conseqüentemente, melhor será o controle cinético na superfície do eletrodo. Com isso, os valores de  $R_{ct}$  obtidos, indicam que a presença do modificador PEI contribuiu consideravelmente para uma diminuição

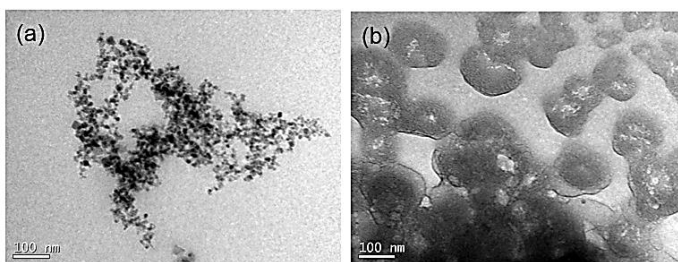
na  $R_{ct}$  (13,3  $\Omega$ ) em relação ao eletrodo não modificado GCE ( $R_{ct}$  108,3  $\Omega$ ). Isto pode ser explicado pela elevada condutividade do polímero PEI, a qual contribui cineticamente para o processo de transferência de elétrons.

Foi possível observar também que, a medida em que se incorporou as MGNnPs ( $R_{ct}$  45,2  $\Omega$ ) e o ab-MC-LR  $R_{ct}$  (44,0  $\Omega$ ) ao GCE/PEI, houve um aumento da  $R_{ct}$  na superfície do imunossensor. Este aumento já era esperado, pois as MGNnP e o ab-MC-LR bloqueiam parcialmente a superfície do eletrodo, tendo como consequência, um aumento na resistência de transferência de carga.

#### 4.11 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS MGNnP-PEI e MGNnP-PEI-ab-MC-LR

Os aspectos morfológicos das amostras foram analisados por meio de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) realizada no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME-UFSC). As amostras analisadas foram constituídas pelos seguintes sistemas: (a) MGNnP-PEI e (b) MGNnP-PEI-anti-MC-LR (Figura 39). Devido ao fato do anticorpo ser armazenado à baixas temperaturas, a mistura MGNnP-PEI-ab-MC-LR foi preparada um dia antes das análises, pois do contrário as propriedades do anticorpo poderiam ser afetadas, bem como sua interação com o filme MGNnP-PEI.

**Figura 39** – Micrografias obtidas em um microscópio de transmissão eletrônica (TEM 100 keV) para os sistemas: (a) MGNnP-PEI e (b) MGNnP-PEI-ab-MC-LR.



A partir da micrografia referente à amostra (a), pode-se observar a formação de aglomerados esféricos de MGNnP e aglomerados irregulares do sistema MGNnP-PEI. Neste caso, a aglomeração das MGNnP pode ter ocorrido antes da funcionalização com o polímero

PEI. Isso demonstra a tendência que as MGNnPs possuem de se aglomerarem como forma de diminuir suas altas energias superficiais.

A formação de agregados também está possivelmente relacionada com o fato do polieletrólito se encontrar com uma densidade de carga menor em pH fisiológico ( $\approx 20\%$  dos grupos amino protonados), onde a repulsão eletrostática não se sobrepõe às atrações hidrofóbicas e o polieletrólito adquire uma conformação compactada.

Na micrografia referente à amostra (b), pode-se observar a incorporação do anticorpo ao filme MGNnP-PEI. Essa incorporação, possivelmente está relacionada à porção C-terminal ( $-\text{COO}^-$ ) presente na estrutura proteica dos anticorpos, a qual é carregada negativamente e, provavelmente, pode ter interagido de modo eletrostático com os grupamentos amino presentes no polímero PEI, sendo dessa forma, possível a ancoragem das biomoléculas na superfície do imunossensor.

#### 4.12 ESTUDO DA SELETIVIDADE DO MÉTODO

Com o objetivo de avaliar a seletividade do método, foram testados alguns interferentes que geralmente são encontradas em locais onde existe a presença de MC-LR (Ex. águas de lagoas, mar, lagoas e torneira). Os possíveis interferentes avaliados foram: NaCl ( $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ ), MC-RR ( $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ), MC-YR ( $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ) e KCl ( $9,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ). Além disso, o imunossensor também foi testado com amostras de água da Lagoa da Conceição (pH 7,4) e da torneira (pH 6,1).

A capacidade destes interferentes de ligarem-se à superfície do eletrodo foi avaliada a partir da porcentagem de supressão de cada substância em relação ao pico base (incubação apenas em PBS). A partir dos valores de supressão para cada interferente, foi construído o gráfico da Figura 40, o qual representa a resposta do imunossensor quando não há nenhuma interferência (pico base) e a resposta do imunossensor na presença dos potenciais interferentes. Neste estudo, o pico base foi medido para cada interferente avaliado e a porcentagem de corrente suprimida foi calculada de acordo com a Equação 3 abaixo:

$$i_{rel} (\%) = \frac{(i_{pico\ base} - i_{suprimida}) \times 100}{i_{pico\ base}} \quad (3)$$

Onde:

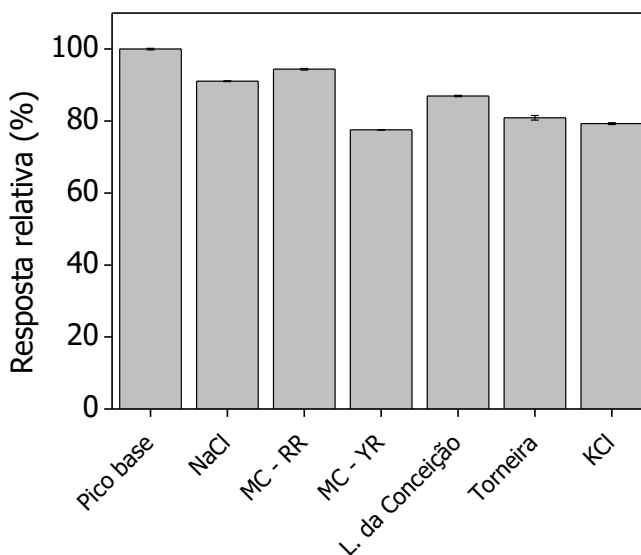
$i_{rel} (\%)$  = Porcentagem de corrente suprimida

$i_{pico\ base}$  = Corrente resultante referente ao pico base

$i_{suprimida}$  = Corrente resultante referente a supressão

A resposta relativa (%) de corrente foi calculada conforme a Equação 2 apresentada na seção 4.5  $[(\Delta i/\Delta i_{m\acute{a}x}) \times 100]$ , onde  $\Delta i$  representa o valor da supressão de corrente para cada interferente avaliado e  $\Delta i_{m\acute{a}x}$  representa o valor máximo de supressão obtido entre os interferentes.

**Figura 40** – Estudo de compostos potencialmente interferentes na reposta do imunossensor, sendo as medidas eletroquímicas realizadas por SWV, sonda redox hidroquinona  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  e eletrodo de carbono vítreo modificado pelo filme polimérico MGNnP-PEI.



A partir dos dados obtidos (Figura 40), foi possível observar um baixo nível de interferência para a maior parte dos interferentes testados, os quais se destacaram como maiores interferentes a MC-YR (22%) e o KCl (21%). A incorporação do antígeno MC-YR ao imunossensor desenvolvido, possivelmente pode ter ocorrido pelo reconhecimento deste antígeno pelos anticorpos ab-MC-LR ou por interações eletrostáticas entre a cadeia polimérica da PEI (carregada positivamente) e a cadeia proteica dos anticorpos (carregada negativamente).

Neste estudo, também se observou que houve uma considerável interferência na reposta do imunossensor para as amostras de águas da Lagoa da Conceição (13 %) e da torneira (19 %). A provável presença

de partículas em suspensão e coliformes totais nas amostras de água da Lagoa da Conceição (ACQUALIS, 2015), podem ter influenciado na resposta do imunossensor. Esses fatores possivelmente também contribuíram para uma diminuição na repetibilidade e na estabilidade do imunossensor, já que este apresentou uma grande instabilidade para a amostra de água da Lagoa da Conceição.

Com base nisso, este estudo tornou-se importante para avaliar a possibilidade de determinar MC-LR em amostras de água do mar, lagoas, lagunas e água da torneira, demonstrando que o imunossensor proposto neste trabalho, possui melhor desempenho analítico em águas com baixas concentrações de partículas em suspensão e de coliformes totais.

#### 4.13 ESTUDO DA PRECISÃO E ESTABILIDADE DO MÉTODO

A precisão da metodologia foi avaliada a partir do desvio padrão relativo (RSD) entre as medidas, realizadas em duplicatas, de testes de repetibilidade intra-day (medidas sucessivas realizadas no mesmo dia) e inter-day (medidas realizadas em diferentes dias), utilizando as mesmas condições experimentais. Os estudos intra-day foram realizados a partir de seis medidas consecutivas ( $n = 6$ ) utilizando-se uma solução de MC-LR na concentração de  $5,0 \text{ ng mL}^{-1}$ . O RSD obtido neste teste foi de 1,09%. Os estudos inter-day foram realizados também utilizando a concentração  $5,0 \text{ ng mL}^{-1}$  de MC-LR, em seis dias diferentes. Neste caso, o RSD obtido foi de 2,44%. Com isso, pode-se concluir que os valores de RSD determinados nestes estudos, demonstraram uma boa precisão para o método proposto.

Além disso, também foi investigada a repetibilidade entre eletrodos. Neste teste, foram comparadas as respostas de três imunossensores preparados de forma independente, utilizando o mesmo procedimento e realizando as medidas em duplicatas. Este estudo teve como objetivo, avaliar o processo de construção do imunossensor sendo, para isso, utilizada uma solução de MC-LR na concentração de  $5,0 \text{ ng mL}^{-1}$ . O RSD encontrado para esse estudo foi de 2,21%. Normalmente, métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um RSD de 1 a 2%. Já métodos de análise de traços ou impurezas na ordem de  $10^{-9}$  (ppb), são aceitos RSD de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2016). Com isso, o método foi considerado preciso e dentro da faixa aceitável para a validação de métodos analíticos.



A estabilidade do imunossensor frente a resposta eletroquímica para a MC-LR, foi investigada a partir da análise de uma solução de MC-LR 50,0 ng mL<sup>-1</sup>. Neste estudo, foi realizada a medida da resposta de supressão de corrente para a incubação de 2 µL de MC-LR 50,0 ng mL<sup>-1</sup>, sendo, posteriormente, o imunossensor seco e armazenado na geladeira em uma temperatura de aproximadamente 4 °C. Após o período de armazenamento (7 dias), o nível de inibição obtido (28,7%) foi de aproximadamente 51% da inibição obtida inicialmente para a mesma concentração (56,5%), indicando que o imunossensor proposto possui uma estabilidade mediana frente a resposta eletroquímica para a MC-LR. Esse fenômeno pode ser explicado pelo fato do filme polimérico de MGNnP-PEI está apenas adsorvido na superfície do eletrodo GCE. Como a adsorção é um processo de equilíbrio, é de se esperar que ocorra dessorção do modificador na solução (PBS), diminuindo dessa forma, o tempo de vida útil do eletrodo modificado.

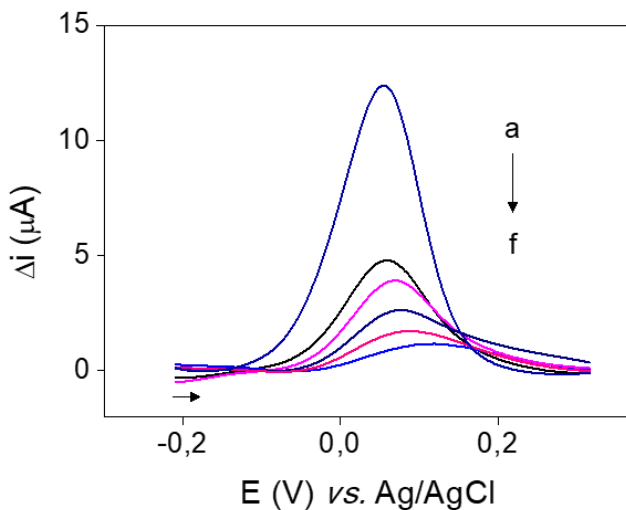
#### 4.14 CURVA DE CALIBRAÇÃO, INTERVALO DE TRABALHO, LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Para este estudo, foi construída uma curva de calibração externa com o objetivo de obter uma relação linear entre a porcentagem de corrente suprimida ( $i_{rel}$  %) e a concentração de MC-LR em solução. Para isso, a faixa linear de trabalho utilizada foi escolhida baseada no trabalho de Talamini *et al.* (2018), a qual utilizou-se como soluções padrão, as seguintes concentrações de MC-LR: (a) 0,1; (b) 0,5; (c) 5,0; (d) 50,0 e (e) 500,0 ng mL<sup>-1</sup>.

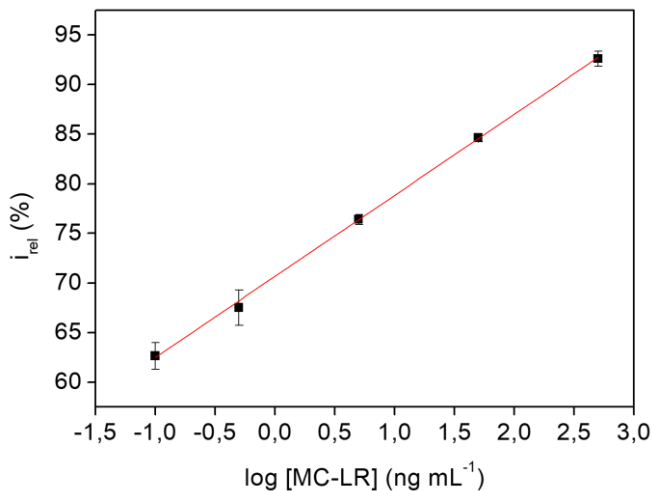
A partir dessas soluções padrão, aplicadas sobre o imunossensor sob condições otimizadas em PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>; pH 7,5), foi possível obter os voltamogramas (Figura 41) que expressam a supressão de corrente para as diferentes concentrações de MC-LR, onde ‘a’ representa o pico base (0,0 ng mL<sup>-1</sup> MC-LR) e ‘b a f’ representam as concentrações de 0,1 a 500,0 ng mL<sup>-1</sup>.

Por meio dos voltamogramas obtidos, foi feito o cálculo da porcentagem de corrente suprimida ( $i_{rel}$  %) conforme a Equação 3 apresentada na seção 4.12. A partir disso, construiu-se a curva de calibração externa para a MC-LR (Figura 42), a qual expressa uma relação linear entre a porcentagem de corrente suprimida ( $i_{rel}$  %) e o log da concentração de MC-LR em ng mL<sup>-1</sup>. Neste estudo, a incubação das diferentes concentrações de MC-LR foi realizada utilizando-se o mesmo imunossensor. Isto indica que é possível fazer, no mínimo, 6 medidas consecutivas utilizando-se o mesmo imunossensor desenvolvido.

**Figura 41** – Voltamogramas obtidos, por SWV, em PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5), com soluções padrão nas seguintes concentrações: (a) 0,0; (b) 0,1; (c) 0,5; (d) 5,0 e (e) 50,0 e (f) 500,0 ng mL<sup>-1</sup> de MC-LR.



**Figura 42** – Curva de calibração para a MC-LR, obtida em PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5), com soluções padrão nas seguintes concentrações: (i) 0,1; (ii) 0,5; (iii) 5,0; (iv) 50,0 e (v) 500,0 ng mL<sup>-1</sup> de MC-LR.



A partir dos dados apresentados pela curva de calibração externa para MC-LR, pode-se julgar satisfatória a linearidade do método cujo o coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,99952$ ) apresentou uma correlação fortíssima ( $0,91 < R^2 < 0,99$ ) (BRITO *et al.*, 2003).

A equação de regressão linear, apresentada pela curva, foi a seguinte:  $i_{rel} = 70,7 (\pm 0,144) + 8,18 (\pm 0,089)$  [MC-LR], onde  $i_{rel}$  é a porcentagem de corrente suprimida relativa ao pico voltamétrico (%) e [MC-LR] é a concentração de microcistina-LR ( $ng\ mL^{-1}$ ). O limite de detecção calculado (LD = três vezes o desvio padrão do intercepto/coeficiente angular da curva de calibração) para esse método foi  $0,053\ ng\ mL^{-1}$ . O limite de quantificação calculado (LQ = dez vezes o desvio padrão do intercepto/coeficiente angular da curva de calibração) para esse método foi  $0,176\ ng\ mL^{-1}$ .

#### 4.15 ESTUDO DE RECUPERAÇÃO E APLICAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO

O imunossensor proposto foi aplicado na determinação de MC-LR em uma amostra de água da Lagoa do Peri (pH 6,8), localizada em Florianópolis – SC. Os estudos de recuperação e determinação foram realizados por SWV, em duplicata, utilizando o método de adição de padrão.

O ensaio de recuperação consiste em um dos métodos mais utilizados para avaliar a exatidão de processos analíticos. Este método reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. A exatidão é expressa como erro sistemático percentual, o qual está relacionado à perda da substância devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra (entre outros) (BRITO *et al.*, 2003).

Neste trabalho, o ensaio de recuperação foi realizado a partir da adição de diferentes concentrações de MC-LR (5, 10, 15 e  $20\ ng\ mL^{-1}$ ) sobre alíquotas da amostra de água da Lagoa do Peri. A curva analítica construída apresentou equação de regressão linear:  $i_{rel} = 74,017 (\pm 0,038) + 0,24801 (\pm 0,00199)$  [MC-LR], com um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9997, onde  $i_{rel}$  é a porcentagem de corrente suprimida relativa ao pico voltamétrico (%) e [MC-LR] é a concentração de microcistina-LR ( $ng\ mL^{-1}$ ). Os percentuais de recuperação foram calculados a partir da relação entre os valores das concentrações adicionadas e recuperadas das soluções padrão de MC-LR (Tabela 5).

**Tabela 5** – Estudo de recuperação para a MC-LR em amostra de água da Lagoa do Peri, utilizando o imunossensor proposto.

MC-LR (ng mL <sup>-1</sup> )			
Adicionado	Recuperado <sup>a</sup>	Recuperação (%) <sup>b</sup>	RSD (%) <sup>c</sup>
5,0	4,91 ± 0,42	98,3 (92,2 – 104,3)	8,7
10,0	9,87 ± 1,29	98,5 (107,8 – 89,2)	13,4
15,0	15,25 ± 2,11	101,8 (92,0 – 111,6)	13,6
20,0	20,00 ± 0,11	100,0 (100,4 – 99,6)	0,57

<sup>a</sup>Média ± desvio padrão das recuperações; <sup>b</sup>Recuperação = (valor encontrado/valor adicionado) x 100%; <sup>c</sup>RSD = (desvio padrão das recuperações/média das recuperações) x 100%.

Analisando-se a Tabela 5, observa-se que houve uma boa recuperação para o analito, indicando que o método empregado é apropriado para a análise de MC-LR na água da Lagoa do Peri, já que a faixa de recuperação está dentro dos limites aceitáveis (40 a 120%) para a análise de analitos com concentração na ordem de 10<sup>-9</sup> (ppb) (BRASIL, 2003; SANCHES *et al.*, 2007; BRASIL, 2016).

As porcentagens de recuperação obtidas demonstraram que o método pode ser considerado exato e preciso. A precisão foi avaliada através do desvio padrão relativo (RSD %) dos resultados obtidos, apresentando valores de 0,57 a 13,6%, valores esses, inferiores a 20% para este método sendo, portanto, considerado preciso.

#### 4.16 DETERMINAÇÃO DE MC-LR

Para o cálculo da concentração de MC-LR presente na amostra da água da Lagoa do Peri, utilizou-se a equação de regressão linear ( $i_{rel} = 74,017 (\pm 0,038) + 0,24801 (\pm 0,00199) [MC-LR]$ ) obtida no ensaio de recuperação. Neste cálculo, empregou-se na equação acima, o valor de supressão  $i_{rel}$  (74,14%) referente a análise em duplicata da amostra, tendo como resultado o valor médio de 0,496 ( $\pm 0,273$ ) ng mL<sup>-1</sup> de MC-LR. Os valores obtidos, também indicam que a concentração de MC-LR, encontrada na amostra, está dentro do limite estabelecido pela legislação vigente – Portaria MS/GM n° 2.914, a qual define que o valor máximo de microcistina permitido na água de abastecimento público é 1,0 µg L<sup>-1</sup> (BRASIL 2011; BRASIL 2016).

#### 4.17 COMPARAÇÃO COM A LITERATURA

Há descrito na literatura, diversos trabalhos com imunossensores eletroquímicos para detecção de microcistina-LR. A Tabela 6 mostra uma breve comparação da faixa linear, limite de detecção e tempo de incubação destes trabalhos. Pode-se observar que o imunossensor (MGNnP-PEI-ab-MC-LR/GCE) obteve um LD próximo a maioria dos artigos publicados, apresentando também, menor tempo de incubação quando comparado aos imunossensores desenvolvidos por Du e colaboradores (2014) e Zhang e colaboradores (2016). Com isso, a apresentação de dados compatíveis com os reportados pela literatura, o emprego em uma ampla faixa de trabalho e a facilidade de construção, utilizando reagentes baratos e de fácil obtenção, destacam a relevância do imunossensor desenvolvido.

**Tabela 6** – Dados comparativos de diferentes imunossensores eletroquímicos para detecção de microcistina-LR.

Sensor	Faixa linear (ng mL <sup>-1</sup> )	LD (ng mL <sup>-1</sup> )	Tempo de incubação (min)	Referência
Grafeno/ab-MC-LR/GCE	0,05–1,0	0,017	60	DU <i>et al.</i> , 2014
ab-MC-LR/AuNP-BSA/Br-Py/GCE	0,05 – 500	0,05	15	TALAMINI <i>et al.</i> , 2018
Au/ab-MC-LR/MC-LR/PEG/CNPs/GCE	0,0025–5	0,0017	60	ZHANG J. <i>et al.</i> , 2016
HRP-CNs-Ab/MC-LR/GSs-CS/GCE	0,05–15	0,016	30	ZHAO; TIAN; QUAN, 2013
HRP-anti-MC-LR/MC-LR-SWNHs/GCE	0,05–20	0,03	30	ZHANG <i>et al.</i> , 2010
HRP-MC-LR/anti-MC-LR/Au/CNx-MWNTs/GCE	0,005–1	0,002	20	ZHANG <i>et al.</i> , 2011
MC-LR/BSA/anti-MC-LR/GNP/l-cysteine	0,05–15	0,02	20	TONG <i>et al.</i> , 2011
MC-LR-HRP/anti-MC-LR/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Au/SPE	0,79–12,9	0,38	20	ZHANG <i>et al.</i> , 2013
AgNP-Nafion-xGnP-ab-MC-LR	0,5 – 5000	0,017	10	ZANATO <i>et al.</i> , 2017
MGNnP-PEI-ab-MC-LR/GCE	0,1 – 500	0,053	40	Este trabalho

AgNP-Nafion-xGnP: nanopartículas de prata estabilizadas em Nafion com nanoplaquetas de grafite. Au: nanopartículas de ouro. BSA: soro de albumina bovina. PEG: polietilenoglicol. CN:nanoesfera de carbono. CNPs: nanofibras de carbono. CNx-MWNTs: nanotubos de carbono de parede múltipla dopada com nitrogênio. CS: quitosana. GNP: nanopartículas de ouro. GS: folha de grafeno. HRP: peroxidase de raiz forte (horseradish peroxidase). MGNnP-PEI: nanopartículas de magnetita estabilizadas em PEI. MSN: sílica mesoporosa. SPE: eletrodo impresso. SWNHs: nanohorns de carbono de parede simples,

Fonte: Adaptado de Talamini *et al.* (2018).

## 5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, apresentou-se o desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico do tipo *label-free* contendo nanopartículas de magnetita (MGNnP) estabilizadas em PEI, as quais foram utilizadas como plataforma imobilizadora para a detecção de MC-LR em água da Lagoa do Peri. Além da importância do dispositivo desenvolvido para a área ambiental, também foi possível obter informações eletroquímicas a respeito dos modificadores, bem como a influência destes, na interação entre o antígeno (MC-LR) e o anticorpo (ab-MC-LR).

A partir dos dados experimentais obtidos, foi possível concluir que o recobrimento da superfície de GCE com o filme polimérico MGNnP-PEI, aumentou consideravelmente a resposta do imunossensor contendo ab-MC-LR, sendo este fato possivelmente associado a capacidade que os nitrogênios da PEI possuem de trocar prótons com a solução tampão PBS, a qual provavelmente facilitou no transporte de elétrons na interface eletrodo/solução.

O dispositivo desenvolvido, também apresentou: simplicidade de construção; linearidade na faixa de trabalho empregada (0,1-500 ng mL<sup>-1</sup>); alta sensibilidade, já que pequenas alterações na concentração do analito provocaram grandes alterações no sinal de corrente; seletividade mediana e baixo limite de detecção (0,053 ng mL<sup>-1</sup>). Além disso, o método proposto apresentou boa repetibilidade intra-day (RSD% = 1,09%) e inter-day (RSD% = 2,44%) e boas porcentagens de recuperação (98,3 a 101,8%), apresentando valores de RSD% entre 0,57 e 13,6% sendo, portanto, o método considerado exato e preciso.

Portanto, pode-se afirmar que o imunossensor desenvolvido é capaz de trabalhar em uma ampla faixa de concentrações do analito MC-LR, indicando a possibilidade futura de aplicação do mesmo não apenas em águas de lagoa, mas também em diversos ambientes aquáticos nos quais encontram-se baixas concentrações de matéria orgânica em suspensão.





## 6 REFERÊNCIAS

ACQUALIS ENGENHARIA HÍDRICA. **Influência do projeto da nova Ponte nas características naturais da Lagoa da Conceição**. 2015. Disponível em: <<https://acqualisengenharia.com.br/acqualis-lagoa-da-conceicao/>>. Acesso em: 17 dez. 2018.

ALIEXPRESS (China). **K1000 photoelectric chemical pool quartz chemical pool 50\*50\*50mm electrolytic cell Teflon lid**. 2019. Disponível em: <<https://pt.aliexpress.com/>>. Acesso em: 22 mar. 2019.

ANACLETO, S. M. M. **Implementação e validação de um método de ensaio para análise de cianotoxinas em águas por HPLC-DAD e UPLC-MS/MS**. 2016. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química Tecnológica, Departamento de Química e Bioquímica, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2016.

AGOSTINHO, S. M. L.; VILLAMIL, R. F. V.; NETO, A. A.; ARANHA, H. O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p.813-817, 2004.

AZEVEDO, S. M.F.O.; CARMICHAEL, W. W.; JOCHIMSEN, E. M.; LAU, S.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. **Toxicology**, v. 181-182, p.441-446, 2002.

BALKENHOHL, T.; LISDAT F. Screen-printed electrodes as impedimetric immunosensors for the detection of anti transglutaminase antibodies in human sera. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, p. 50–57. 2007.

BARD, A. J. **Electrochemical methods: Fundamentals and Applications**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 2001. 850 p.

BARRETO, L. V; BARROS, F. M.; BONOMO, P.; ROCHA, F. A; AMORIM, J. S. Eutrofização em rios brasileiros. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 16, p. 2165–2179, 2013.

BARROSO, M. F.; DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ, N.; DELERUE-MATOSA, C.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Towards a reliable technology for antioxidant capacity and oxidative damage evaluation:

Electrochemical (bio)sensors. **Biosensors And Bioelectronics**, v. 30, n. 1, p.1-12, 2011.

BATAGLION, G. A. **Desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para determinação de penicilinas utilizando eletrodo de cobre**. 2009. 39 f. TCC (Graduação) - Curso de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

BENJAMIN, D. C.; BERZOFSKY, J. A.; EAST, I. J.; GURD, F. R. N.; HANNUM, C.; LEACH, S. J.; MARGOLIASH, E.; MICHAEL, J. G.; MILLER, A.; PRAGER, E. M.; REICHLIN, M.; SERCARZ, E. E.; SMITH-GILL, S. J.; TODD, P. E.; WILSON, A. C. The Antigenic Structure of Proteins: A Reappraisal. **Annual Review Of Immunology**, v. 2, n. 1, p.67-101,1984. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.iy.02.040184.000435>> . Acesso em: 07 set. 2018.

BENJAMINI, E.; COICO, R.; SUNSHINE, G. A Short Course, Fourth Edition. **Immunology**, John Wiley & Sons, Inc., 500 p., 2000.

BILLAH, M. M.; HAYS, H. C. W.; HODGESB, C. S.; PONNAMBALAM, S.; VOHRA, R.; MILLNER, P. A. Mixed self-assembled monolayer (mSAM) based impedimetric immunosensorsfor cardiac troponin I (cTnI) and soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (sLOX-1). **Sensors and Actuators B**, v. 173, p. 361-366, 2012.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, M. C.; BOLCH, C. J. S. Genetic variability of brazilian strains of the microcystis aeruginosa complex (cyanobacteria/cyanophyceae) using the phycocyanin intergenic spacer and flanking regions (cpcBA). **Journal Of Phycology: An international journal of algal research**. Charleston, p. 810-818, 2002.

BOGDANOV, A.A.; KLIBANOV, A.L.; TORCHILIN, V.P. Protein immobilization on the surface of liposomes via carbodiimide activation in the presence of N-hydroxysulfosuccinimide. **Febs Letters**, v. 231, n. 2, p. 381-384, 1988.

BÖNNEMANN, H.; BRIJOUX, W.; BRINKMANN, R.; FRETZEN, R.; JOUSSEN, T.; KÖPPLER, R.; NEITELER, P.; RICHTER, J.

Preparation, characterization, and application of fine metal particles and metal colloids using hydrotriorganoborates. **Journal Of Molecular Catalysis**, v. 86, n. 1-3, p.129-177, 1994.

BÖNNEMANN, H.; RICHARDS, R. Nanoscopic Metal Particles – Synthetic Methods and Potential Applications. **European Journal Of Inorganic Chemistry**, v. 2001, n. 10, p.2455-2480, 2001.

BORTOLI, S.; PINTO, E. Cianotoxinas: Características gerais, histórico, legislação e métodos de análises. In: POMPÊO *et al.* (Org.). **Ecologia de reservatórios e interfaces**. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, cap. 21, p. 321-339, 2015.

BOTANA, L. M. (Ed.). **Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection**. Boca Raton: CRC Press, 2008.

BOUÇAS, R.I.; TRINDADE, E.S.; TERSARIOL, I.L.S.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. Development of an Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA)-like Fluorescence Assay to Investigate the Interactions of Glycosaminoglycans to Cells. **Analytica Chimica Acta**, v. 618, n. 2, p.218-226, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 15 jan. 2019.

BRASIL. Instituto Nacional de Meteorologia (INMETRO). **Orientação sobre validação de métodos analíticos: DOQ-CGCRE-008**. 2016. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/>>. Acesso em: 15 jan. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Orientações técnicas para o monitoramento de cianobactérias/cianotoxinas nos mananciais de abastecimento de água para consumo humano**. Brasília: Ministério da Saúde, 22 p., 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p.129-146, 2003.

BUTLER, N., CARLISLE, J. C., LINVILLE R.D.V.M.; WASHBURN, B. Microcystins: A brief overview of their toxicity and effects, with special reference to fish, wildlife, and livestock. **OEHA Ecotoxicology**, p. 6-7, 2009.

CALIL, S. S.; SILVA, P. R. Q. **Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade**. 2011. Disponível em: <<http://www.cpgls.pucgoias.edu.br/6mostra/artigos/SAUDE/SIMONE%20SAAD%20CALIL%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2018.

CAMPANELLA, L.; ATTOLI, R.; COLAPICCHIONI, C.; TOMASSETTI, M. New amperometric and potentiometric immunosensors for anti-human immunoglobulin G determinations. **Sensors and Actuators B**, v. 55, p. 23-32, 1999.

CARTURAN, S.; QUARANTA, A.; BONAFINI, M.; VOMIERO, A.; MAGGIONI, G.; MATTEI, G.; FERNÁNDEZ, C.J.; BERSANI, M.; MAZZOLDI, P.; MEA, G.D. Formation of Silver Nanoclusters in Transparent Polyimides by Ag-K Ion-Exchange Process. **The European Physical Journal D**, v.42, p.243–251, 2007.

CARVALHO, L. A.; ANDRADE, A. R.; BUENO, P. R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p.796-804, 2006.

CASSINI, S. T.; ANTUNES, P. W. P. **Sistema de Avaliação Qualitativa (P/A) de microcistina em amostras de águas**. Vitória: Link Editoração, 63 p., 2018.

CAVALCANTI, I.T.; SILVA, B.V.M.; PERES, N.G.; MOURA, P.; SOTOMAYOR, M.D.P.T.; GUEDES, M.I.F.; DUTRA, R.F.A. Disposable Chitosan-modified Carbon Fiber Electrode for Dengue Virus Envelope Protein Detection. **Talanta**, v. 91, p.41-46, 2012.

CHANTAROJSIRI, Teera; ZILLER, Joseph W.; YANG, Jenny Y. Incorporation of redox-inactive cations promotes iron catalyzed aerobic

C–H oxidation at mild potentials. **Chemical Science**, Royal Society of Chemistry, v. 9, n. 9, p.2567-2574, 2018.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. 2. ed. London: E & FN Spon on behalf of WHO, 400 p., 1999.

CRUZ, P. S.; VIANA, L. G.; CHAVES, T. L. D.; SILVA, D. L.; BARBOSA, J. E. L. Cianobactérias e cianotoxinas em mananciais de abastecimento: implicações no tratamento da água. In: CARNIATTO, I.; SCHINEIDER, M. J.; GONZALES, A. C. (Org.). **Engenharia Sanitária e Ambiental: Tecnologias para a sustentabilidade**. Curitiba: Atena, Cap. 3, p. 37-46, 2016.

CUI, Z.; WU, D.; ZHANG, Y.; MA, H.; LI, H.; DUA, B.; WEIA, Q.; JU, H. Ultrasensitive electrochemical immunosensors for multiplexed determination using mesoporous platinum nanoparticles as nonenzymatic labels. **Analytica Chimica Acta**, v. 807, p. 44–50, 2014.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas. **Química Nova**, v. 27, p. 623–630, 2004.

DANTAS, A. '**Tragédia da Hemodiálise' que deixou quase 60 mortos completa 20 anos**. 2016. Disponível em: <<http://g1.globo.com/pe/caruaru-regiao/noticia/2016/02/tragedia-da-hemodialise-que-deixou-quase-60-mortos-completa-20-anos.html>>. Acesso em: 20 ago. 2018.

DU, D. HUA-LI, F. XUE-WEN, W. YONG-PING, Q. ZE-JUN, X. LI-MEI, H. NIAN- ZHANG, Y. YUN-HUI. A Label-free Immunosensor for Microcystins-LR Based on Graphene and Gold Nanocage. **Chinese Journal Of Analytical Chemistry**, v. 42, n. 5, p.660-665, 2014

DUARTE, C. M. G. **Caracterização químico-física de novos polímeros estabilizantes para formulações da indústria de cosméticos**. 2011. 124 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Departamento de Química, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2011.

EL-SAYED, I. H.; HUANG, X.; EL-SAYED, M.A. Surface Plasmon Resonance Scattering and Absorption of anti-EGFR Antibody

Conjugated Gold Nanoparticles in Câncer Diagnostics: Applications in Oral Cancer. **Nano Lett.**, v.5, n.5, p.829-834. 2005.

FALCONER, I. R. Cylindrospermopsis Toxicity. In: FALCONER, I. R. (Ed.). **Cyanobacterial toxins of drinking water supplies**. Boca Raton: CRC Press, 2005.

FATIBELLO FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Química Nova**, v. 1, n. 15, p.28-39, 1992.

FUREY, A.; ALLIS, O.; ORTEA, P. M.; LEHANE, M.; JAMES, K. J. Hepatotoxins: context and chemical determination. In: BOTANA, L. M. (Ed.). **Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection**. Boca Raton: CRC Press, 2008.

GENTRY, S.T., FREDERICKS, S.J.; KRCHNAVEK, R. Controlled Particle Growth of Silver Sols Through the Use of Hydroquinone as a Selective Reducing Agent. **Langmuir**, v.25, n.5, p. 2613-2621, 2009.

GIL, E. S.; KUBOTA, L. T.; YAMAMOTO, Y. I. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica. **Química Nova**, v. 22, n. 6, p.874-881, 1999.

GONG, J. L.; LIANG, Y.; HUANG, Y.; CHEN, J. W.; JIANG, J. H.; SHEN, G. L.; YU, R. Q. Ag/SiO<sub>2</sub> core-shell nanoparticle-based surface-enhanced Raman probes for immunoassay of cancer marker using silica-coated magnetic nanoparticles as separation tools. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p.1501–1507. 2007.

GÓRECKA, E.; JASTRZEBSKA, M. Immobilization Techniques and Biopolymer Carriers. **Biotechnology and Food Science**, v. 75, n. 1, p. 65–86, 2011.

GRONEWOLD, T. M. A.; BAUMGARTNER, A.; QUANDT, E.; FAMULOK, M. Discrimination of Single Mutations in Cancer-Related Gene Fragments with a Surface Acoustic Wave Sensor. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 14, p.4865-4871, 2006.

GUERRA, J. P. T. A. **Associação entre xantana, polietilenoimina, dodecil sulfato de sódio e derivados anfífilos dos polímeros em soluções aquosas diluídas**. 2011. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso

de Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

GUILBAULT, G.G. **Analytical uses of immobilized enzymes**. New York: M. Dekker, 453 p., 1984.

HAH, H.J.; KOO, S.M. Preparation of Silver Nanoparticles Through Alcohol Reduction with Organoalkoxysilanes. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v.26, p. 467–471, 2003.

HARADA, K.; FUJII, K.; SHIMADA, T.; SUZUKI, M.; SANO, H.; ADACHI, K.; CARMICHAEL, W.W. Two cyclic peptides, anabaenopeptins, a third group of bioactive compounds from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. **Tetrahedron Letters**, v. 36, n. 9, p.1511-1514, 1995.

HAYAT, A.; BARTHELMEBS, L.; MARTY, J. Electrochemical impedimetric immunosensor for the detection of okadaic acid in mussel sample. **Sensors And Actuators B: Chemical**, v. 171-172, p.810-815, 2012.

HAYWORTH, D. Protein Methods Library. Thermo Scientific. Disponível em: <<http://www.piercenet.com/method/protein-methods-library>>. Acesso em: 20 mar. 2019.

HIRAI, H.; NAKAO, Y.; TOSHIMA, N.; ADACHI, K. Colloidal rhodium in polyvinyl alcohol as hydrogenation catalyst of olefins. **Chemistry Letters**, The Chemical Society of Japan, v. 5, n. 9, p.905-910, 1976.

IKAWA, M., PHILLIPS, N., HANEY, J.F., SASNER, J.J. Interference by plastics additives in the HPLC determination of microcystin-LR and -YR. **Toxicol**, v. 37, p. 923–929, 1999

JACOB, E.; UNGER, R.; HOROVITZ, A. N-Terminal Domains in Two-domain Proteins Are Biased to Be Shorter and Predicted to Fold faster than their C-terminal counterparts. **Cell Reports**, v.3, n.4, p.1051–1056, 2013.

JAMES, K. J.; DAUPHARD, J.; CROWLEY, J.; AMBROSE, F. **Cyanobacterial neurotoxins, anatoxin-a and analogues: Detection**

and analysis. 2008. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/>>. Acesso em: 13 jan. 2019.

KANG, Y. S.; RISBUD, S.; RABOLT, J. F.; STROEVE, P. Synthesis and characterization of nanometer-size  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  particles. **Chemistry of Materials**, v. 8, n. 9, p. 2209-2211, 1996.

KFIR, R.; JOHANNSEN, E.; BOTES, D. Monoclonal antibody specific for cyanoginosin-LA: Preparation and characterization. **Toxicon**, v. 24, n. 6, p.543-552, jan. 1986.

KIWI, J.; GRAETZEL, M. Projection, size factors, and reaction dynamics of colloidal redox catalysts mediating light induced hydrogen evolution from water. **Journal Of The American Chemical Society**, v. 101, n. 24, p.7214-7217, 1979.

LEAL, A. C.; SOARES, M. C. P. Hepatotoxicidade da cianotoxina microcistina. **Hepatologia Tropical**, n. 37, p.84-89, 2004.

LEE, T. Ming-Hung. Over-the-Counter Biosensors: Past, Present, and Future. **Sensors**, v.8, p.5535-5559, 2008.

LI, P. C.; HU, S.; LAM, P. K. Development of a Capillary Zone Electrophoretic Method for the Rapid Separation and Detection of Hepatotoxic Microcystins. **Marine Pollution Bulletin**, v. 39, n. 1-12, p.250-254, 1999.

LIANG, R.; FAN, L.; HUANG, D.; QIU, J. A Label-free Amperometric Immunosensor Based on Redox-active Ferrocene-branched Chitosan/multiwalled Carbon Nanotubes Conductive Composite and Gold Nanoparticles. **Electroanalysis**, 23, 719–727, 2011.

LIN, Z.; HUANG, H.; XU, Y.; GAO, X.; QIU, B.; CHEN, X.; CHEN, G. Determination of microcystin-LR in water by a label-free aptamer based electrochemical impedance biosensor. **Talanta**, v. 103, p.371-374, 2013.

LISENSKY, G. **Synthesis of Aqueous Ferrofluid**. University of Wisconsin, USA, 2012. . Disponível em: <<https://archive.education.mrsec.wisc.edu/nanolab/ffexp2/index.html> >. Acesso em: 07 jan. 2019.



LU, W.; LING M.; JIA, M.; HUANG, P.; LI, G.; YAN B. Facile synthesis and characterization of polyethylenimine-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> superparamagnetic nanoparticles for cancer cell separation. **Molecular Medicine Reports**, v. 9, n. 3, p.1080-1084, 2014.

LUZ, L. M.; SANTANA, R. M. C.; OLIVEIRA, C. Viscosidade em polieletrólito catiônico. In: **22º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS**, Natal, v. 1, p. 8435 – 8444, 2016.

MANDAL, A. **Função do anticorpo**. 2018. Reviewed by April Cashin Garbutt. Disponível em: <[https://www.news-medical.net/health/Antibody-Function-\(Portuguese\).aspx](https://www.news-medical.net/health/Antibody-Function-(Portuguese).aspx)>. Acesso em: 11 nov. 2018.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of Enzyme Activity, Stability and Selectivity Via Immobilization Techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451–1463, 2007.

MAYER, G. Imunoglobulinas: estrutura e função. In: MAYER, G. **Imunologia**. Escola de Medicina da Universidade da Carolina do Sul: Microbiologia e Imunologia Online, 2000. Cap. 4. Tradução de: Myres Hopkins. Disponível em: <<http://www.microbiologybook.org>>. Acesso em: 07 set. 2018.

MEHRVAR, M.; ABDI, M. Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors. **Analytical Sciences**, v. 20, p.1113-1126, 2004.

MEI, H. NIAN- ZHANG, Y. YUN-HUI. A Label-free Immunosensor for Microcystins-LR Based on Graphene and Gold Nanocage. **Chinese Journal Of Analytical Chemistry**, v. 42, n. 5, p.660-665, 2014.

MOREIRA, C. S., LIMA, A. M. N., NEFF, H., NETO, A. G. B., LOUREIRO, F. C. C. L., FILHO, C. A. S., JUNIOR, L. H. C. L. Biossensores: Tecnologia e Aplicações. In: **V Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação**, 2010.

MORENO-GUZMÁN, M.; OJEDA, I.; VILLALONGA, R.; GONZÁLEZ-CORTÉS, A.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J.

M. Ultrasensitive detection of adrenocorticotropin hormone (ACTH) using disposable phenylboronic-modified electrochemical immunosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 35, p. 82–86, 2012.

MSAGATI, T. A. M.; SIAME, B. A.; SHUSHU, D. D. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. **Aquatic Toxicology**, v.78, n.4, p.382-397, 2006.

MURRAY, R. W.; EWING, A. G.; DURST, R. A. Chemically modified electrodes. Molecular design for electroanalysis. **Analytical Chemistry**, v. 59, n. 5, p.379-390, 1987.

NASCIMENTO, P. B. **Cianobactérias como indicadoras de poluição nos mananciais abastecedores do Sistema Cantareira**. 2010. 116 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

NAVRÁTILOVÁ, I.; SKLÁDAL, P.; VIKLICKÝ, V. Development of piezoelectric immunosensors for measurement of albuminuria. **Talanta**, v. 55, p. 831-839, 2001.

NICHOLSON, B. C.; BURCH, M. D. **Evaluation of Analytical Methods for Detection and Quantification of Cyanotoxins in Relation to Australian Drinking Water Guidelines**. 2001. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/profile/Michael\\_Burch/publication/237780613](https://www.researchgate.net/profile/Michael_Burch/publication/237780613)>. Acesso em: 21 jan. 2019

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K. DE; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

PATEL, N.; DAVIES, M.C.; HARTSHORNE, M.; HEATON, J.R.; C.J.; TENDLER, S.J.B.; WILLIAMS, P.M. Immobilization of Protein Molecules onto Homogeneous and Mixed Carboxylate-Terminated Self-Assembled Monolayers. **Langmuir**, v. 13, p. 6485–6490, 1997.

PATHAK, P.; KATIYAR, V. K.; GIRI, S. Cancer Research - Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer Research. **Azono Journal of Nanotechnology Online**, v.3, 2007. Disponível em: <<https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=1977>>. Acesso em: 12 jan. 2019.

PEGRAM, R.; RUNNEGAR, M.; PFLUGMACHER, S.; HUMPAGE, A. R.; NICHOLS, T.; ETHERIDGE, S.; NEILAN, B.; THACKER, R.; LOVE, A. Cyanotoxins workgroup report. In: HUDNELL, H. K. (Ed.). **Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs**. New York: United States Environmental Protection Agency Papers and Springer, 2008.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendência em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p.1012-1021, 2002.

RAITERI, R.; GRATTAROLA, M.; BERGER, R. Micromechanics Senses Biomolecules. **Materials Today**, v.5, n.1 p.22-29, 2002.

REBOUÇAS, A. C. Água e desenvolvimento rural. **Estudos Avançados**, v. 15, n. 43, p. 327-344, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, D.V.; SOUZA, C.A.C.; ABRANTES, J.C.C. Uso da Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) para monitoramento da corrosão em concreto armado. **Revista Ibracon de Estruturas e Materiais**, v. 8, n. 4, p.529-546, 2015.

RICCARDI, C. S.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. Imunossensor amperométrico. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p.316-320, 2002.

ROBILLOT, C., VINH, J., PUISEUX-DAO, S., HENNION, M.C. Hepatotoxin Production Kinetics of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, as Determined by HPLC–Mass Spectrometry and Protein Phosphatase Bioassay. **Environmental Science & Technology**, v. 34, n. 16, p.3372-3378, 2000.

ROCHFORT, D.; KOUISNI, L.; GENDRON, K. Physical immobilization of laccase on an electrode by means of poly(ethyleneimine) microcapsules. **Journal Of Electroanalytical Chemistry**, v. 617, n. 1, p.53-63, 2008.

RUSMINI, F.; ZHONG, Z.; FEIJEN, J. Protein Immobilization Strategies for Protein Biochips. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p.1775-1789, 2007.

SANCHES, S. M.; PADRO, E. L.; BENETTI, F.; TAKAYANAGUI, A. M. M. Estudo da presença da toxina microcistina-LR em água utilizada em clínica de hemodiálise e validação de um método analítico. **Eclética Química**, v. 32, n. 4, p.43-48, 2007.

SANTANA, L. K. L.; RICARDO, P. C.; SERUDO, R. L.; Lasmar, M. L.; SANTOS, M. C. **Imunossensores eletroquímicos e suas aplicações**. 2017. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/309677436>>. Acesso em: 22 jan. 2019.

SANTOS, M. C. **Nanopartículas funcionalizadas com ácido láurico: associação de moléculas bioativas e estudo de interação com BSA**. 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

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.

SCHOLZ, F. **Electroanalytical methods: Electroanalytical Methods Guide to Experiments and Applications**, Springer-Verlag: Berlin, 2010.

SEGNINI, A. **Uso de pirrolidinoditiocarbamatos de manganês(II) e vanadila na preparação e aplicação de eletrodos de pasta de carbono modificados**. 2003. 29 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, Cap. 4, 2003.

SIGNORI, A. M. **Desenvolvimento de uma nova metodologia para preparação de nanopartículas de prata estabilizadas pela polietilenoimina funcionalizada e aplicação em catálise**. 2010. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

SILVA, L. V. **Desenvolvimento de sensores eletroquímicos baseados em nanotubos de carbono e polímeros de ácido ferúlico e capsaicina**

**para detecção e quantificação de 3-nitro-L-tirosina, epinefrina e dopamina.** 2017. 145 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química e Biotecnologia, Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2017.

SILVA, M. F. **Engenharia de superfície de nanopartículas magnéticas para biomedicina:** recobrimentos com macromoléculas visando estabilização e compatibilidade em meio fisiológico. 2013. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

SILVA, T. A. R. **Imobilização e detecção de biomoléculas em matrizes de poli(ácido 4-hidroxifenilacético):** aplicações no desenvolvimento de genossensores. 2008. 47 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

SILVA, T. R. **Sensor eletroquímico constituído por filme orgânico iônico para a detecção de compostos fenólicos.** 2014. 56 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica.** 8.ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008.

SOKOLOV, K. FOLLEN, M.; AARON, J.; PAVLOVA, I.; MALPICA, A.; LOTAN, R.; RICHARDS-KORTUM, R. Real Time Vital Optical Imaging of Pre cancer Using Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Antibodies Conjugated to Gold Nanoparticles. **Cancer Research**, v. 63, p. 1999-2004. 2003.

SONG, S.; XU, H.; FAN, C. Potential Diagnostic Applications of Biosensors: Current and Future Directions. **International Journal of Nanomedicine**, v.1, n.4, p.433-440, 2006.

SOUZA, M. F. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Química Nova**, v. 20, n. 2, p.191-195, 1997.

SOUZA, P. H. M. **Estudos eletroquímicos de complexos de Cu (II) de antibióticos da classe das fluorquinolonas.** 2011. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

SYLVÉUS, A. **Diagnóstico das cianobactérias na Lagoa do Peri, Florianópolis, SC e a legislação sobre água para consumo humano.** 2012. 26 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

TALAMINI, L.; ZANATO, N.; ZAPP, E.; BRONDANI, D.; VIEIRA, I. C. Direct Electrochemical Nano-immunosensor for Microcystin-LR in Seawater. **Electroanalysis**, v. 30, n. 5, p.819–827, 2018.

TIMBRELL, J. A. Biochemical Mechanisms of Toxicity: Specific Examples. In: TIMBRELL, Jonh A. **Principles of biochemical toxicology.** 4. ed. New York: Informa Healthcare, cap. 7. p. 327-328, 2009.

TONG, P.; TANG S.; HE, Y.; SHAO, Y.; ZHANG, L.; CHEN, G. Label-free immunosensing of microcystin-LR using a gold electrode modified with gold nanoparticles. **Microchimica Acta**, v. 173, n. 3-4, p.299-305, 2011.

TOSHIMA, N. (Ed). Metal nanoparticles for catalysis. In: Liz-Marzán, et al. **Nanoscale Materials.** USA, p.70-9,. 2007.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Cyanobacteria and Cyanotoxins: Information for Drinking Water Systems Fact Sheet.** EPA-810F11001, 2014. Disponível em: <<https://www.epa.gov/nutrient-policy-data/cyanobacteria-andcyanotoxins-information-drinking-water-systems-fact-sheet>>. Acesso em: 07 jan. 2019.

VAN APELDOORN, M. E.; VAN EGMOND, H. P.; SPEIJERS, G. J.; BAKKER, G. J. Toxins of cyanobacteria. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, n. 1, p. 7-60, 2007.

XIANG, Y.; WANG, J. Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: current status of clinical application. **Quantitative Imaging in Medicine and Surgery**, v.1, n.1, p.35-40, 2011.

YOO, R. S.; CARMICHAEL, W. W.; HOENH, R. C.; HRUDEY, S. E. Cyanobacterial (blue-green algal) toxins: A resource guide. Denver, Colorado, American Waters Works, **Association Research Foundation**, 229 p., 1995.

ZANATO, Nicole. **Desenvolvimento de um imunossensor para detecção de troponina cardíaca utilizando nanopartículas de ouro e nanoplaquetas de grafite**. 2016. 33 f. TCC (Graduação) - Curso de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

ZAPP, E. **Desenvolvimento de imunossensores à base de cristais líquidos e nanopartículas de ouro para a detecção de biomarcadores cardíacos**. 2014. 120 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

ZHANG, J.; LEI, J.; PAN, R.; LENG, C.; HU, Z.; JU, H. In situ assembly of gold nanoparticles on nitrogen-doped carbon nanotubes for sensitive immunosensing of microcystin-LR. **Chemical Communications**, v. 47, n. 2, p.668-670, 2011.

ZHANG, J.; LEI, J.; XU, C.; DING, L.; JU, H. Carbon Nanohorn Sensitized Electrochemical Immunosensor for Rapid Detection of Microcystin-LR. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 3, p.1117-1122, 2010.

ZHANG, J.; LEI, J.; XU, C.; DING, L.; JU, H. Immunosensor for Rapid Detection of Microcystin-LR. **Analytical chemistry**, v. 82, n. 3, p. 1117-1122, 2010.

ZHANG, J.; TIAN, F.; RUI, X.; XUE, S. An Immunosensor for Microcystins Based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> @Au Magnetic Nanoparticle Modified Screen-Printed Electrode. **Chinese Journal Of Analytical Chemistry**, v. 41, n. 9, p.1353-1358, 2013.

ZHANG, Z.; ZHANG, X. X.; WU, B.; YIN, J.; YU, Y.; YANG, L. Comprehensive insights into microcystin-LR effects on hepatic lipid

metabolism using cross-omics technologies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 315, p. 126–134, 2016.

ZHAO, H.; TIAN, J.; QUAN, X. A graphene and multienzyme functionalized carbon nanosphere-based electrochemical immunosensor for microcystin-LR detection. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, v. 103, p.38-44, 2013.

ZHAO, L.; SUN, L.; CHU, X. Chemiluminescence immunoassay. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, v. 28, n. 4, p.404-415, 2009.