



BÁRBARA SANTOS DE MIRANDA

**SÍNTESE E MODIFICAÇÃO DE NANOMATERIAIS VISANDO O
DESENVOLVIMENTO DE SENSORES**

**CAMPINAS
2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

BÁRBARA SANTOS DE MIRANDA

**SÍNTESE E MODIFICAÇÃO DE NANOMATERIAIS VISANDO O
DESENVOLVIMENTO DE SENSORES**

ORIENTADOR: PROF. DR. LAURO TATSUO KUBOTA

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM CIÊNCIAS.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
POR BÁRBARA SANTOS DE MIRANDA, E ORIENTADA PELO PROF.DR. LAURO TATSUO
KUBOTA.**

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
ANO**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

M672p	Miranda, Bárbara Santos de (1984-). Síntese e modificação de nanomateriais visando o desenvolvimento de sensores / Bárbara Santos de Miranda. – Campinas, SP: [s.n.], 2013. Orientador: Lauro Tatsuo Kubota. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. 1. Nanomateriais. 2. Biosensor. 3. Hidróxido de níquel. 4. <i>Point-of-care</i>. 5. Bioanalítica. I. Kubota, Lauro Tatsuo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Synthesis and modification of nanomaterials for sensors development

Palavras-chave em inglês:

Nanomaterials
Biosensor
Nickel hydroxide
Point-of-care
Bioanalytics

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Lauro Tatsuo Kubota [Orientador]
Ana Flávia Nogueira
René Alfonso Nome Silva
Luiz Henrique Dall'Antonia
Wendel Andrade Alves

Data de defesa: 10/06/2013

Programa de pós-graduação: Química

*Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.*
Fernando Pessoa

Para meus Pais e Dario.

Agradecimentos

Ao Professor Lauro pela oportunidade de participar do seu grupo, pela paciência com as minhas dificuldades, pela persistência em me ensinar, pelo compromisso com a minha formação, pela orientação e liberdade científica para desenvolver este trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida para realização da tese.

Ao Dr. Stefan Thalhammer por ter me aceito em seu grupo, pela confiança e pela oportunidade de me tornar uma profissional melhor.

À CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche do programa PROBREAL.

Aos funcionários do IQ pelo profissionalismo e eficiência. Em especial a Bel, Claudia Martinelli, Daniel Razzo e Renata Mangueta pela ajuda e valiosas contribuições a esse trabalho.

Aos colegas do Grupo LEEDS pela convivência e contribuições profissionais. A Rúbia pela disposição e ajuda em vários momentos. Em especial aos queridos: Cecília pela sua doçura, Fernando pelo seu companheirismo, Ananda pela sua alegria, Emília pela sua força, Lu pelo seu bom humor, Cátia por fazer nossas vidas mais movimentadas e Thiaguinho pela sua musicalidade. Também a todos eles agradeço pela amizade, risadas gostosas e lágrimas divididas. Às amigas que mantivemos: Rafaela e Marta.

Ao Flávio pela amizade e companheirismo desde o Mestrado. Ao Ernesto pela gentileza e contribuições a esta tese com as imagens de TEM. À Elis pela orientação em todos os momentos, pelas inestimáveis contribuições a esta tese, pelo apoio em terras alemãs e brasileiras e por esta amizade incondicional mesmo com a distância.

Aos meus familiares pelo amor, carinho e apoio contínuo, em especial aos meus irmãos mais que amados. Aos meus Pais pela vigilância constante mesmo com a distância, pelo exemplo dado todos os dias, pelo apoio e pelo maior amor desse mundo. À minha nova família que me incorporou, em especial a Carmo e ao Fermino pelo apoio e carinho imensos. Ao Dario, pelo seu amor, pelo apoio incondicional à profissional que quero ser, por me escolher para dividir a sua vida e formar a sua família comigo.

Currículo

Formação Acadêmica:

03/2009 – 06/2013

Doutorado em Química

Título: Síntese e modificação de nanomateriais visando o desenvolvimento de sensores.

Orientador: Lauro Tatsuo Kubota.

Bolsista CNPq e bolsista CAPES: Doutorado Sanduíche no HelmholtzZentrum, Munique, Alemanha.

Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.

03/2007 – 02/2009

Mestrado em Química

Título: Preparação e caracterização de eletrodos de titanatos para aplicação em conversão de energia solar.

Orientadora: Claudia Longo.

Bolsista CNPq.

Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.

03/2002 – 06/2006

Graduação em Química Bacharelado.

Universidade de Brasília, UNB, Brasil.

Bolsista CNPq. (Iniciação Científica)

Produção científica:

Artigos completos publicados em periódicos:

MIRANDA, BARBARA S.; LINARES, ELISÂNGELA M.; THALHAMMER, STEFAN; KUBOTA, LAURO T.; Development of a disposable and highly sensitive paper-based immunosensor for early diagnosis of Asian soybean rust. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 45, p. 123-128, 2013.

Citações: Web of Science: 1| Scopus: 2

PRADO, Alexandre Gustavo Soares Do; MIRANDA, B. S.; ZARA, Luiz Fabricio. Adsorption and thermochemical data of divalent cations onto silica gel surface modified with humic acid at solid/liquid interface. *Journal of Hazardous Materials (Print)*, v. 120, p. 243-247, 2005.

Citações: Web of Science: 14| Scopus: 16

PRADO, Alexandre Gustavo Soares Do; MIRANDA, B. S.; DIAS, J. A. Attachment of two distinct humic acids onto silica gel surface. *Colloids and Surfaces. A, Physicochemical and Engineering Aspects* (Print), v. 242, p. 137-143, 2004.

Citações: Web of Science: 20| Scopus: 21

PRADO, Alexandre Gustavo Soares Do; MIRANDA, B. S.; JACINTHO, Guilherme Vianna de Melo. Interaction of indigo carmine dye with silica modified with humic acids at solid/liquid interface. *Surface Science*, v. 542, p. 276-282, 2003.

Citações: Web of Science:34| Scopus:35

Resumos publicados em anais de congressos

MIRANDA, B. S.; LINARES, E. M.; THALHAMMER, S.; KUBOTA, L. T. Desenvolvimento de imunoensaio para detecção da ferrugem asiática da soja. In: Encontro Nacional de Química Analítica, 2011, Campos do Jordao. Encontro Nacional de Química Analítica, 2011.

MIRANDA, B. S.; KUBOTA, L. T. Gold Nanoparticles inserted into NiOOH as a strategy to enhance the sensitivity and stability. In: Center for Nanoscience Workshop, 2010, Venice. Center for Nanoscience Workshop, 2010.

MIRANDA, B. S.; Oliveira, Haroldo Gregório; Longo, Claudia. Propriedades Morfológico-estruturais e eletroquímicas de Eletrodos de Titanatos. In: Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2009, Fortaleza. Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2009.

MIRANDA, B. S.; VIDOTTI, M.; KUBOTA, L. T. Inserção de AuNP: estratégia de aumento de sensibilidade e estabilidade do eletrodo modificado com NiOOH. In: Encontro Nacional de Química Analítica, 2009, Salvador. Encontro Nacional de Química Analítica, 2009.

MIRANDA, B. S.; Oliveira, Haroldo Gregório; Longo, Claudia. Preparation and characterization of titanate electrode for application in solar energy conversion. In: 6th Spring Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2008, Foz do Iguaçu. Book of Abstracts - Electrochemistry for a Healthy Planet, 2008.

MIRANDA, B. S.; SOUZA, Jurandir Rodrigues; LONGHIN, Sandra Regina. Otimização da degradação da amoxicilina por Fenton. In: III Encontro Nacional de Química Ambiental, 2006, Cabo Frio, 2006.

MIRANDA, B. S.; SOUZA, Jurandir Rodrigues; LONGHIN, Sandra Regina. Estudo comparativo da degradação da amoxicilina por POA's. In: 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas, 2005.

MIRANDA, B. S.; LONGHIN, Sandra Regina; SOUZA, Jurandir Rodrigues. Degradação de amoxicilina (AMX) e ampicilina (AMP) utilizando processos oxidativos avançados (POA). In: III Encontro sobre Aplicações Ambientais de Processos Oxidativos Avançados, 2005, Campinas, 2005.

MIRANDA, B. S.; SOUZA, Jurandir Rodrigues; LONGHIN, Sandra Regina. Degradação de substâncias recalcitrantes: aplicação à amoxicilina e ampicilina presentes em efluentes industriais. In: XI Congresso de Iniciação Científica da UnB, 2005, Brasília. XI- Congresso de Iniciação Científica da UnB, 2005.

MIRANDA, B. S.; PRADO, Alexandre Gustavo Soares Do; REZENDE, Maria Olímpia de Oliveira. Comportamento da interação de ácidos húmicos com cátions divalentes. In: XII-Encontro nacional de Química Analítica, 2003, São Luis, 2003.

MIRANDA, B. S.; PRADO, Alexandre Gustavo Soares Do; JACINTHO, Guilherme Vianna de Melo. Interaction of indigo carmine dye with silica modified with humic acids at solid/liquid interface... In: 11th International Conference on Surface and Colloid Science, 2003, Foz do Iguaçu. 11th International Conference on Surface and Colloid Science, 2003.

MIRANDA, B. S.; JACINTHO, Guilherme Vianna de Melo; PRADO, Alexandre Gustavo Soares Do. Ancoramento de ácidos húmicos na superfície da sílica gel. In: II Encontro Nacional de Química Ambiental, 2003, Brasília. ENQAmb - Encontro Nacional de Química Ambiental, 2003.

MIRANDA, B. S.; JACINTHO, Guilherme Vianna de Melo; PRADO, Alexandre Gustavo Soares Do; ZARA, Luiz Fabricio. Estudo da adsorção de metais divalentes imobilizados na superfície da sílica gel. In: 12º Encontro Nacional de Química Analítica, 2003, São Luis. XII-Encontro nacional de Química Analítica, 2003.

MIRANDA, B. S.; JACINTHO, Guilherme Vianna de Melo; PRADO, Alexandre Gustavo Soares Do. Interação do corante índigo de carmina com sílica gel modificada com ácidos húmicos. In: 12º Encontro Nacional de Química Analítica, 2003, São Luís. XII-Encontro nacional de Química Analítica, 2003.

MIRANDA, B. S.; JACINTHO, Guilherme Vianna de Melo; PRADO, Alexandre Gustavo Soares Do. Adsorção do corante índigo de carmina por sílicas modificadas com ácidos húmicos. In: II Encontro Nacional de Química Ambiental, 2003, Brasília. Encontro Nacional de Química Ambiental, 2003.

Resumo

Este trabalho apresenta o desenvolvimento de dois sensores distintos que através da aplicação de nanomateriais em seus sistemas apresentam uma melhora no desempenho. Com o objetivo de estabilizar a fase alfa do hidróxido de níquel, foi proposta uma nova síntese que resultou em um novo material de hidróxido de níquel e nanopartículas de ouro. O do hidróxido de níquel se apresentou com a estrutura alfa desejada, a estrutura e morfologia das nanopartículas de ouro foram preservadas. O material híbrido se apresenta nanoestruturado e sem separação de fases. Sugere-se que este novo material seja formado como um nanocompósito onde as nanopartículas de ouro formam a matriz e o hidróxido de níquel recobre a superfície. A estabilidade do novo material é bem superior que a do hidróxido de níquel puro, quedas de corrente após 50 ciclos consecutivos de 6% contra 50% respectivamente. A atividade eletrocatalítica deste novo nanomaterial foi investigada frente à glicose e a constante eletrocatalítica obtida para o nanocompósito foi cerca de 7 vezes maior que para o hidróxido de níquel puro. A sensibilidade do eletrodo modificado com α -Ni(OH)₂/AuNP se manteve similar aos da literatura. O segundo sensor estudado foi a aplicação de nanopartículas fluorescentes como marcadores do imunossensor para a detecção precoce do esporo do fungo da ferrugem asiática da soja. As nanopartículas fluorescentes permitiram alcançar um baixo limite de detecção, 2.2 ng/mL, o menor encontrado na literatura. Além disso, foi investigado outros parâmetros para o desenvolvimento de um dispositivo point-of-care, como o melhor substrato para reter o analito, a membrana de nitrocelulose, se apresentou com as melhores propriedades frente às alternativas. Ainda mais, o dispositivo foi construído para que possa ser utilizado por pessoas não treinadas no campo, em um tempo de análise menor que ELISA e PCR, sem o uso de equipamento caros e complicados, usando somente uma lâmpada de UV simples como fonte de excitação e a visualização do sinal a olho nu com um limite de detecção de apenas 300 esporos, o que é ainda dez vezes mais baixo que o atual teste comercial.

Abstract

This work presents the development of two distinct sensors that have shown great improvements in their performance through nanoparticle application in their systems. The first study aims to stabilize the nickel hydroxide alpha structure for future carbohydrate detection. We proposed a new synthesis, which resulted in a nickel hydroxide and gold nanoparticle hybrid material. The new material has the expected nickel hydroxide alpha structure, maintains gold nanoparticle's structure and morphology and allows a simple electrode modification. We suggest that the new material is a nanocomposite where gold nanoparticles are the matrix while the nickel hydroxide cover the surface. The new material has higher stability properties than the pure nickel hydroxide, after 50 cycles the current decreased 6 and 50% respectively. In addition, an improvement was observed in the catalytic constant, approximately 7 times bigger than plain nickel hydroxide. Although the new material showed these good improvements, the electrode sensitivity did not differ from other studies in the literature. The second study presented comprehends the application of fluorescent nanoparticles as markers of an immunosensor for early diagnosis of Asian soybean rust spore. The use of these nanoparticles resulted in a very low limit detection sensor, 2.2 ng/mL, the lowest ever found in the literature. Moreover, others parameters were investigated in order to develop a point-of-care device, as the substrate to retain the analyte for the assay. Furthermore, the device was built in order to be used by the farmer himself, in loco, fast, without expensive equipment, a UV lamp as an excitation source and the signal is visible to naked eye. The visual detection limit is around 300 spores, which is tenfold lower than the available commercial kit.

Sumário

Lista de Abreviatura	xxi
Lista de Tabelas	xxiii
Lista de Figuras.....	xxiv
Prólogo	xxx
Introdução Geral	1
1. Introdução Geral	3
Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH) ₂ e ouro para aplicação em sensores.	7
2.1. Introdução.....	9
2.1.1. Estrutura do hidróxido de níquel	9
3.1.2. Síntese e estabilização de α -Ni(OH) ₂	12
2.2. Objetivos	16
2.3. Materiais e Métodos	17
2.3.1. Materiais e Reagentes.....	17
2.3.2. Síntese do hidróxido de níquel com nanopartículas de ouro.	17
2.3.3. Síntese do hidróxido de níquel puro	17
2.3.4. Caracterização estrutural e morfológica.....	17
2.3.5. Construção do sensor.....	18
2.3.6. Experimentos eletroquímicos	18
2.4. Resultados e Discussão	19
2.4.1. Instabilidade do hidróxido de níquel.....	19
2.4.2. Síntese do hidróxido de níquel com nanopartículas de ouro	20
2.4.3. Caracterização estrutural e morfológica	24
2.4.4. Caracterização eletroquímica e estabilidade	39
2.4.5. Eletrocatalise da glicose	46
2.4.6. Curva analítica e determinação de glicose.....	59
2.5. Conclusões Parciais	62
Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor <i>point-of-care</i>	65
3.1. Introdução.....	67
3.1.1. Nanopartículas em biossensores	67

3.1.2. Imunossensores	71
3.1.3. Ferrugem Asiática da soja	72
3.1.4. Dispositivos <i>point-of-care</i>	77
3.2. Objetivos	79
3.3. Materiais e Métodos	80
3.3.1 Materiais e Reagentes.....	80
3.3.2. Produção do antígeno e anticorpos contra o fungo <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	80
3.3.3. Microscopia óptica e fluorescência.....	80
3.3.4. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV).....	81
3.3.5. Conjugado anticorpo-nanopartícula fluorescente	81
3.3.6. <i>Spot test</i>	82
3.3.7 Microscopia confocal	82
3.3.8 Medidas de fluorescência	82
3.3.9. Construção do dispositivo e ensaio em campo.....	82
3.4. Resultados e Discussão	84
3.4.1. O analito: esporo do fungo <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	84
3.4.2. Conjugado anticorpo–nanopartícula de ouro.....	86
3.4.2. Conjugado anticorpo-nanopartícula fluorescente	87
3.4.3. Ensaio em microscopia confocal	93
3.4.4. Dispositivo imunossensor para a detecção precoce da ferrugem asiática da soja.....	95
3.5. Conclusões Parciais	106
Considerações Finais e Perspectivas Futuras	109
4. Considerações Finais e Perspectivas Futuras	111
Referências Bibliográficas	115
5. Referências Bibliográficas	117

Lista de Abreviatura

NPs	Nanopartículas
POC	Point-of-care
TEM	Transmissão Eletrônica de Varredura
AuNP	Nanopartícula de ouro
BV	Banda de Valência
BC	Banda de Condução
Ebg	Energia de bandgap
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Γ	Recobrimento do eletrodo
Q	Carga
F	Constante de Faraday
A	Área do eletrodo
GCE	Eletrodo de Carbono Vítreo
k_{obs}	Constante de velocidade catalítica
S/V	Razão Superfície/ Volume
SPR	Superfície de Plásmon de Superfície
LFIA	Imunoensaio de Fluxo Lateral
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
BSA	Albumina de soro bovino
EDC	Etilcarbodiimida
FNP	Nanopartícula Fluorescente
UV	Ultravioleta
LD	Limite de Detecção

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Tabela com as proporções entre níquel e nanopartículas de ouro das sínteses.	21
Tabela 2.2. Comparação de estudos da literatura entre materiais, potencial, constante catalítica e faixa estudada com este trabalho.	55
Tabela 2.3. Comparação entre parâmetros da curva analítica para a detecção de glicose entre trabalhos da literatura e este estudo.	61
Tabela 3.1: Comprimentos de onda de absorção e emissão das nanopartículas fluorescentes.	88
Tabela 3.2: Comparação entre sensores encontrados na literatura e o kit comercial para a detecção da ferrugem asiática da soja.	101
Tabela 3.3: Custo dos materiais e do dispositivo em escala laboratorial e em grande escala.	104

Lista de Figuras

Figura 1.1: Quantum dots (Fonte: Wikimedia Commons).	3
Figura 1.2: Ilustração do aumento da energia superficial com a diminuição da dimensão da partícula (da esquerda para a direita: 1mm; 1µm e 1nm)	4
Figura 2.1: A) estrutura cristalina do hidróxido de níquel. B) Ilustração dos planos ocupados pelos íons Ni^{2+} e OH^- na formação das lamelas do hidróxido de níquel	9
Figura 2.2: Ilustração da posição das lamelas do hidróxido de níquel na estrutura β (lamelas empilhadas ao longo do eixo c) e na estrutura α turbostrática (lamelas desorganizadas ao longo do eixo c).	10
Figurar 2.3: Diagrama de Bode ilustrando as transformações de fase do hidróxido de níquel por processos de oxidação/redução, envelhecimento e sobrecarga do material.	11
Figura 2.4: Gráficos obtidos pela procura do termo “synthesis AND nickel hydroxide” na plataforma Web of Science A) Número de publicações por ano; B) número de citações por ano.	13
Figura 2.5: Voltamogramas cíclicos de um eletrodo modificado com hidróxido de níquel em 0,1 mol/L de KOH/KCl, $v = 10\text{mV/s}$.	19
Figura 2.6: Voltamogramas cíclicos dos eletrodos modificados com os materiais NP1 (-), NP5 (-) e NP7 (-) em 0,1 mol/L KOH/KCl, $v = 10\text{ mV/s}$.	21
Figura 2.7: Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado com o material de hidróxido de níquel e nanopartículas de ouro NP7 em 0,1 mol/L KOH/KCl, $v = 10\text{mV/s}$	22
Figura 2.8: Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado com o material de hidróxido de níquel e nanopartículas de ouro NP6 em 0,1 mol/L KOH/KCl, $v = 10\text{mV/s}$	23
Figura 2.9: Difratoograma de Raios-X das amostras sintetizadas como a) hidróxido de níquel puro e b) do hidróxido de níquel com nanopartículas de ouro (NP6). Marcações dos picos correspondem a: (■) $\beta\text{-Ni(OH)}_2$ (06-0141); (●) $\alpha\text{-Ni(OH)}_2$ (JCPDS 22-0444) e (*) ouro metálico (JCPDS 04-0784).	25
Figura 2.10: Aproximação do difratograma do hidróxido de níquel com nanopartículas de ouro na região do plano (001).	27
Figura 2.11: Espectro de absorção na região do ultravioleta e visível da dispersão de hidróxido de níquel sintetizado (branco: álcool isopropílico).	28

Figura 2.12: Espectros de absorção na região do ultravioleta visível das dispersões de NP5 (-), NP6 (-), NP7 (-), AuNP (-) e Ni(OH) ₂ (-), (branco: álcool isopropílico).	29
Figura 2.13: Espectros de absorção da região ultravioleta visível das dispersões NP5 (-), NP6 (-), NP7 (-), AuNP (-) e Ni(OH) ₂ (-) com maior resolução na região de 200-300 nm.	30
Figura 2.14: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura do hidróxido de níquel com nanopartículas de ouro, e B) detector de backscattering.	32
Figura 2.15: Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão do hidróxido de níquel puro em diferentes resoluções.	34
Figura 2.16: Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão do hidróxido de níquel com nanopartículas de ouro em diferentes regiões da amostra. E e F com maior resolução para a observação dos planos cristalinos (111) e (200) da fase alfa do hidróxido de níquel, círculos azul e vermelho respectivamente.	35
Figura 2.17: Histograma do diâmetro da partícula obtido a partir de imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão do hidróxido de níquel puro.	37
Figura 2.18: Histograma do diâmetro da partícula de hidróxido de níquel obtido a partir de imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão para o material de hidróxido de níquel com nanopartículas de ouro.	37
Figura 2.19: Gráfico da corrente pelo número de adições de 2µL da dispersão para a otimização da modificação do eletrodo. As porcentagens correspondem à corrente de pico após 50 ciclos em relação à corrente inicial.	39
Figura 2.20: Voltamogramas cíclicos do eletrodo com o nanocompósito nas condições otimizadas de modificação; 2º ciclo (-), 5º ciclo (-) e 50º ciclo (-).	40
Figura 2.21: Voltamogramas cíclicos do eletrodo nanocompósito em diferentes velocidades de varredura (5 a 900 mV/s). Inset: Gráfico da corrente de pico versus a velocidade de varredura.	42
Figura 2.22: Gráficos de Nyquist dos experimentos impedimétricos com os eletrodos modificados com hidróxido de níquel puro a) e nanocompósito b).	43
Figura 2.23: Representação do circuito equivalente resultante do ajuste dos experimentos impedimétricos.	44

Figura 2.24: a) Voltamogramas cíclicos do eletrodo com o nanocompósito em diferentes valores de pH do eletrólito suporte, KOH/KCl, $v = 10 \text{ mV/s}$, pH 12 (-), 12,5 (-); 13 (-); 13,5 (-) e 14 (-). b) Relação do potencial de pico (dir.) e da corrente de pico anódica (esq.) com o pH do eletrólito suporte.	45
Figura 2.25: Voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono vítreo limpo (-) e do eletrodo modificado com o nanocompósito (-) em eletrólito suporte 0,1 KOH/KCl na presença de 100 ppm de glicose e eletrodo modificado com o nanocompósito em eletrólito suporte na ausência de glicose (-), $v = 10 \text{ mV/s}$.	47
Figura 2.26: Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado com hidróxido de níquel puro em eletrólito suporte 0,1 KOH/KCl na presença de 100 ppm de glicose em diferentes velocidades de varredura (5-50 mV/s).	48
Figura 2.27: Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado com nanocompósito em eletrólito suporte 0,1 KOH/KCl na presença de 100 ppm de glicose em diferentes velocidades de varredura (5-50 mV/s).	49
Figura 2.27: Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado com nanocompósito em eletrólito suporte 0,1 KOH/KCl na presença de 100 ppm de glicose em diferentes velocidades de varredura (5-50 mV/s).	50
Figura 2.29: Corrente de pico anódica versus o quadrado da velocidade de varredura para o eletrodo modificado com nanocompósito.	50
Figura 2.30: Corrente de pico anódica normalizada pela raiz quadrada da velocidade de varredura versus a velocidade de varredura para o eletrodo modificado com hidróxido de níquel (-) e para o nanocompósito (-).	51
Figura 2.31: (A) Cronoamperogramas do eletrodo modificado com hidróxido de níquel puro na ausência (a) e na presença de 0,75 (b); 1,0 (c); 1,5 (d); 2,0 (e); 4,0 mmol/L de glicose(f) em eletrólito suporte 0,1 KOH/KCl. (B) Dependência de I_{cat}/I_0 vs $t_{1/2}$ derivado dos cronoamperogramas.	52
Figura 2.32: (A) Cronoamperogramas do eletrodo modificado com nanocompósito na ausência (a) e na presença de 0,75 (b); 1,0 (c); 1,5 (d); 2,0 (e); 4,0 mmol/L de glicose(f) em eletrólito suporte 0,1 KOH/KCl. (B) Dependência de I_{cat}/I_0 vs $t_{1/2}$ derivado dos cronoamperogramas.	53
Figura 2.33. Voltamograma cíclico (50º) do eletrodo modificado com hidróxido de níquel puro após 50 ciclos consecutivos em eletrólito suporte 0,1M KOH/KCl na presença de 100 ppm de glicose.	56

Figura 2.34: Voltamograma cíclico (50 ^º) do eletrodo modificado com nanocompósito após 50 ciclos consecutivos em eletrólito suporte 0,1M KOH/KCl na presença de 100 ppm de glicose.	57
Figura 3.35: Porcentagens da corrente de pico anódica em relação à inicial após ciclagens consecutivas do eletrodo modificado com hidróxido de níquel puro (-) e modificado com nanopartículas de ouro (-) na presença de 100ppm de glicose.	57
Figura 2.36: Curvas analíticas obtidas a partir de cronoamperogramas para o hidróxido níquel modificado com nanopartículas de ouro o (•) em consecutivas adições de glicose, potencial aplicado de 0,41V.	59
Figura 3.1: Dispositivo point-of-care para a detecção do hormônio hCG para confirmação de gravidez. As linhas vermelhas são sinais colorimétricos emitidos pelas nanopartículas de ouro.	68
Figura 3.2: Dispersão de nanopartículas poliméricas fluorescentes da marca Invitrogen que emitem em diferentes comprimentos de onda.	68
Figura 3.3: O estado fundamental E0 e o estado excitado E1 possuem estados vibracionais excitados. Ao absorver a radiação, os elétrons podem passar pra qualquer um dos níveis vibracionais do estado excitado E1. A radiação absorvida pode ter perdas vibracionais e depois gerar uma emissão fluorescente voltando a qualquer um dos níveis do estado fundamental.	69
Figura 3.4: Esquema ilustrativo descrevendo as etapas de um ensaio ELISA tipo indireto.	70
Figura 3.5: Esquema ilustrativo do imunoensaio ao se usar o conjugado de nanopartícula com o anticorpo primário.	71
Figura 3.6: Infográfico da disseminação da ferrugem asiática da soja pelo mundo. Fonte: Consórcio Antiferrugem.	72
Figura 3.7: Prejuízo causado pela ferrugem asiática da soja no Brasil em cada safra. Perda em grãos (verde claro) e custo total da ferrugem: produtos e aplicação do fungicida mais a perda dos grãos (verde escuro). Fonte: Consórcio antiferrugem .	73
Figura 3.8: Foto para ilustrar os danos às plantações de soja causados pela ferrugem asiática da soja. Fonte: Consórcio Antiferrugem.	74

Figura 3.9: Folha de soja contaminada com a ferrugem asiática da soja analisada contra o sol. Observam-se as urédias marrons já acompanhadas de amarelamento. Fonte: Consórcio AntiFerrugem.	75
Figura 3.10: Imagens de diferentes técnicas microscópicas para investigar as características dos esporos com a) imagem ótica de campo claro (43x) b) e c) imagem de microscopia eletrônica de varredura; d) Imagem digital de espectro de fluorescência, 32µg/mL, λ_{exc} : 530nm.	84
Figura 3.11: Espectro de absorção das quatro nanopartículas fluorescentes estudadas.	86
Figura 3.12: Espectros de emissão das nanopartículas fluorescentes estudadas. A) Amarela (λ_{exc} =505 nm); B) Laranja (λ_{exc} =540 nm); C) Rosa (λ_{exc} =575 nm) e D) Azul (λ_{exc} =655 nm)	87
Figura 3.13: Espectros do extrato das folhas sadias de soja: A) absorção e B) emissão.	89
Figura 3.15: Espectros de emissão da dispersão de esporos da ferrugem asiática da soja (λ_{exc} =530 nm)	90
Figura 3.16: Ilustração da síntese do conjugado anticorpo da ferrugem asiática da soja com nanopartícula de ouro.	91
Figura 3.17: Imagens de microscopia confocal em campo claro (A) e fluorescência (B) de esporos da ferrugem asiática da soja marcados com o conjugado anticorpo-nanopartícula fluorescente. As setas brancas indicam material vegetal não específico que não foi marcado e as setas amarelas regiões de esporo marcados pelo conjugado.	93
Figura 3.18: Etapas do imunoensaio tanto em substrato de lâmina de vidro para leitura do sinal em microscópio quanto em substrato de papel para leitura em fluorímetro.	95
Figura 3.19: Imagens óticas de quatro membranas diferentes testadas para a retenção dos esporos: A) membrana de celulose (z286591), B) membrana de celulose (z270814) C) acetato de celulose e D) nitrocelulose. Círculos azuis em A) e B) marcam os esporos nas fibras. (43x)	96
Figura 3.20: Estrutura da membrana de nitrocelulose (A) e o dipolo em anticorpos (B).	97
Figura 3.21: Sinal de fluorescência proveniente de interações não específicas versus o tempo de reação para bloqueio.	98
Figura 3.22: Espectros de emissão dos papéis após realização da análise (λ_{exc} =560 nm).	99
Figura 3.23: (A) Curva analítica para a detecção da ferrugem asiática da soja em papel. (B) Inset com a linearização da curva analítica (Fluorescência vs log da Concentração do esporo).	100

Figura 3.24: Esquema ilustrativo da análise realizada em campo.	102
Figura 3.25: Fotos do dispositivo para aplicação em campo	103

Prólogo

Esta tese apresenta o desenvolvimento de dois sensores distintos a partir da aplicação de nanomateriais visando o melhoramento dos seus desempenhos.

Para uma melhor compreensão e fluidez a tese está dividida em:

- Introdução Geral: será abordada uma introdução sobre a nanotecnologia, nanomateriais e aplicações gerais em sensores que compreendem ambos os trabalhos.
- Trabalho: Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores. Para melhor contextualização, será apresentado uma introdução do tema, objetivos específicos do trabalho, materiais e métodos envolvidos, resultados e discussão e uma conclusão parcial desse estudo.
- Trabalho: Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor point-of-care. Serão apresentados: introdução do tema, objetivos específicos do trabalho, materiais e métodos envolvidos, resultados e discussão e uma conclusão parcial.
- Considerações Finais e Perspectivas Futuras do tema da tese e dos dois trabalhos.
- Referências.

Introdução Geral

1. Introdução Geral

Atualmente a ciência de materiais atingiu um alto nível de sofisticação. Isso é resultado de um progresso contínuo da síntese, funcionalização e manipulação em escalas micro e nano. Quando se diminui a dimensão dos materiais para a escala nanométrica, a maioria dos materiais exibe propriedades diferenciadas que não podem ser extrapoladas como comportamento do material *bulk*. São considerados materiais nanométricos, aqueles em que ao menos uma de suas dimensões esteja abaixo de 100 nm, no entanto, a nanotecnologia não é somente a miniaturização das escalas. Em geral, nanotecnologia pode ser entendida como o *design*, a fabricação e aplicação de nanoestruturas e nanomateriais. Engloba materiais e sistemas cujas estruturas e componentes exibem novas e grandes melhorias nas propriedades físicas, químicas e biológicas devidas ao seu tamanho (Smart and Moore, 2005).

Apesar de materiais na faixa micrométrica possuírem propriedades similares com o do material *bulk*, é dentro da escala nanométrica que os materiais podem exibir propriedades distintas do sólido estendido, como estabilidade térmica, propriedades magnéticas, condutoras e catalíticas (West, 1999; Cao, 2004; Wang, 2005). Por exemplo, o confinamento quântico sofrido por nanopartículas de semicondutores é exibido na larga faixa de cores que varia com o tamanho da nanopartícula e a banda *plásmon* observada nas nanopartículas de ouro devido à oscilação coletiva de seus elétrons de condução.

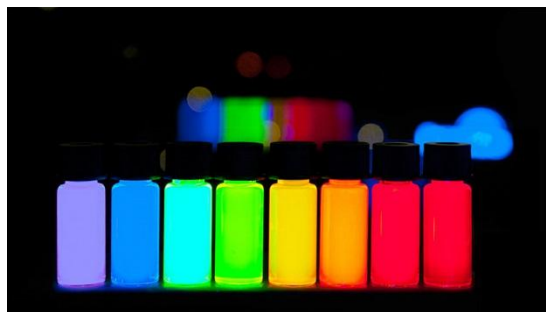


Figura 1.1: Quantum dots (Fonte: Wikimedia Commons).

Apesar desses efeitos citados serem marcantes, todas as nanoestruturas possuem uma grande fração de seus átomos localizados na superfície em relação ao volume total. Uma vez que a energia total de superfície aumenta com a área superficial, devido à grande área superficial dos nanomateriais, estes possuem, por sua vez, uma enorme energia de superfície e portanto são termodinamicamente mais instáveis. Por exemplo no caso ilustrado pela Figura 1.2, um cristal de NaCl com 1 mm de lado possui uma energia superficial de 0,00056 J/g ao diminuir a dimensão da partícula para 1 nm obtém-se um aumento de seis ordens de grandeza na energia superficial (Cao, 2004).

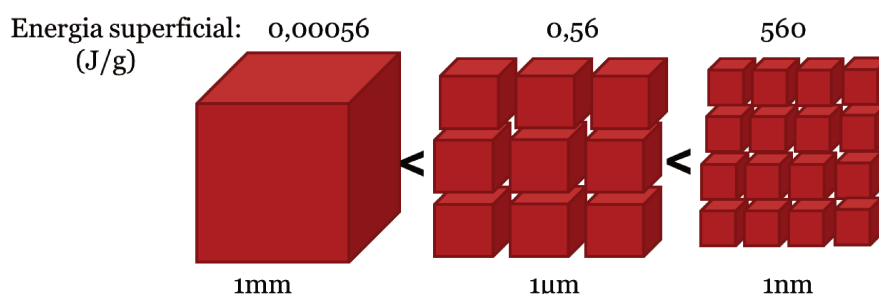


Figura 1.2: Ilustração do aumento da energia superficial com a diminuição da dimensão da partícula (da esquerda para a direita: 1mm; 1µm e 1nm)

Materiais nanoestruturados podem ter diferentes morfologias e incluem nanopartículas esféricas, nanobastões, nanofios, filmes finos e materiais *bulk* constituídos de nanoestruturas (Wang, 2005). Dentre estes, as nanopartículas esféricas (NPs) tem sido as mais investigadas quanto às suas propriedades e as mais aplicadas em sensores. O tamanho, composição e as novas propriedades das NPs são muito atrativas para a sua aplicação em sensores tanto ópticos quanto eletroquímicos. As propriedades das NPs podem ser controladas durante a síntese (tamanho e qualidade) ou após, com funcionalizações químicas e/ou biológicas. Estas últimas aumentam ainda mais as aplicações deste material, como exemplo, nanopartículas de ouro passam a servir de sítio de reconhecimento biológico do sensor (DNA, imunossensor) já que fornecem um microambiente biocompatível para a adsorção de biomoléculas (Merkoçi, 2010).

De modo geral, tanto sensores ópticos quanto eletroquímicos, magnéticos e de massa são beneficiados com a aplicação de nanopartículas em seus sistemas, resultam em sistemas mais sensíveis, com limites de detecção menores e também mais seletivos devido às possíveis funcionalizações. Dentre esses, os sensores eletroquímicos e ópticos são os que preenchem mais facilmente os requisitos para serem utilizados em análises descentralizadas, sem a necessidade de utilizar equipamentos caros e grandes laboratórios (Parolo *et al.*, 2013). São sensores que podem ser facilmente miniaturizáveis, possuem um custo mais baixo, requerem pequenos volumes de amostras e reagentes, não necessitam de pessoas treinadas para executarem a análise e pouca ou nenhuma fonte de energia externa para seu funcionamento. Sensores e dispositivos que preenchem os requisitos citados acima e possibilitam análises no local de interesse, *in loco*, são chamados de *point-of-care* (POC) (Chin *et al.*, 2012)

Este trabalho, portanto, apresenta o desenvolvimento de dois sensores que melhoraram seu desempenho devido a aplicação de nanomateriais em seus sistemas e que também podem ser usados em dispositivos POC. O objetivo geral deste trabalho é a aplicação de nanomateriais em dois sensores distintos visando a obtenção de dispositivos de alto desempenho com propriedades diferenciadas provenientes desta estratégia. Espera-se obter sistemas mais eficientes em termos de sensibilidade e portabilidade e que possam ser aplicados futuramente como dispositivos *point-of-care*.

**Modificação de eletrodos com
nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para
aplicação em sensores.**

Modificação de eletrodos com nanopartículas de α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores - Introdução

2.1. Introdução

2.1.1. Estrutura do hidróxido de níquel

O hidróxido de níquel, Ni(OH)₂ pode se apresentar sob dois polimorfos diferentes, α e β . Este último, β , é uma fase de estrutura cristalina hexagonal compacta, do sistema $P\bar{3}m1$, onde os átomos de níquel ocupam os sítios octaédricos e os grupos hidroxila ocupam os sítios tetraédricos (Bloss, 1994). A Figura 2.1a abaixo representa a estrutura cristalina do β -Ni(OH)₂. O níquel ocupa sítios em um mesmo plano que está entre dois planos formados pelo ânion. A intercalação entre planos de íons hidroxila e de níquel formam uma estrutura sanduíche de sequência ACBACB..., como mostrado na Figura 2.1b. Apesar de que entre as camadas de íons hidroxila **B** e **A** (em vermelho) estarem presentes sítios octaédricos também, estes, por sua vez, estão vazios, como ilustrado também na Figura 2.1a pelo círculo pontilhado na estrutura cristalina.

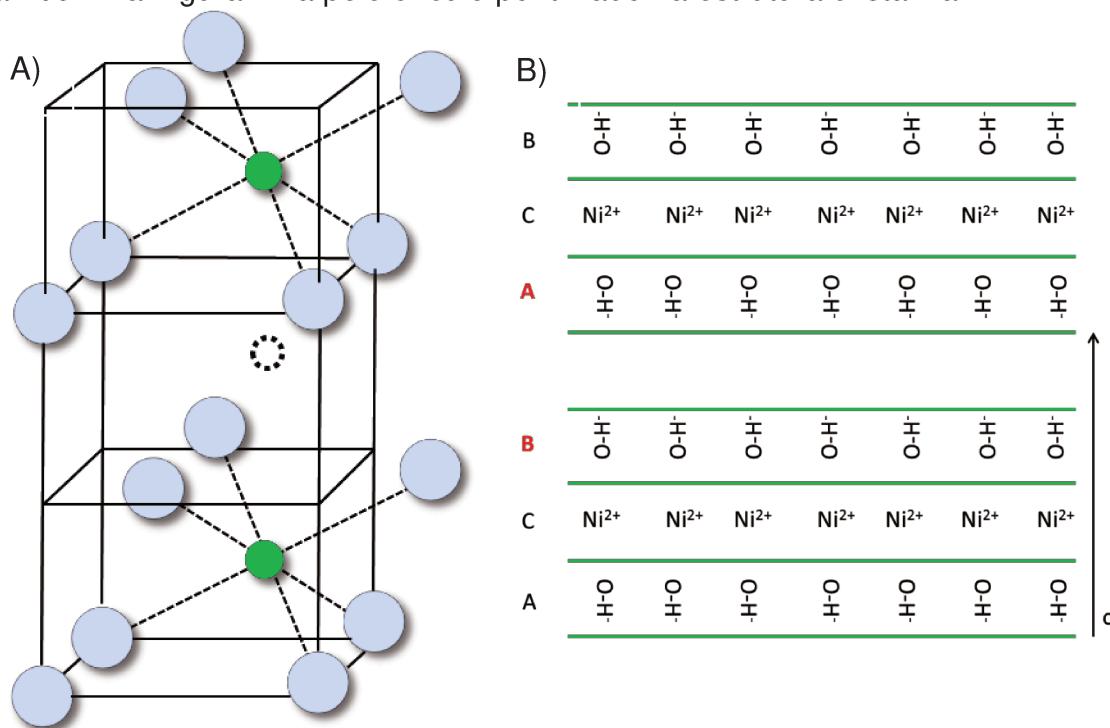


Figura 2.1: A) estrutura cristalina do hidróxido de níquel. B) Ilustração dos planos ocupados pelos íons Ni²⁺ e OH⁻ na formação das lamelas do hidróxido de níquel

Modificação de eletrodos com nanopartículas de α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores - Introdução

O não-preenchimento desses sítios por átomos de níquel gera a estrutura lamelar do hidróxido de níquel com um espaçamento interlamelar que depende da fase cristalina. Por analogia à outras moléculas que também são lamelares e de estrutura similar, como Mg(OH)₂ e Ca(OH)₂, imagina-se que a ligação O-H esteja paralela ao eixo cristalográfico c.

Segundo Bode (1966 *apud* Oliva *et al.*, 1982) a estrutura cristalina da fase α seria muito similar à β . As lamelas ainda estariam empilhadas ao longo do eixo c, com moléculas de água intercaladas e portanto, uma distância interlamelar maior. Contudo, essa proposta foi rejeitada mais recentemente por Le Bihan e McEwen (1971 e 1973 *apud* Oliva *et al.*, 1982) que propuseram uma estrutura turbostrática similar ao negro de fumo. Onde as camadas ainda estariam paralelas e equidistantes ao longo do eixo c, como na fase β , mas randomicamente dispostas e separadas por moléculas de água ligadas aos grupos hidroxila do hidróxido de níquel através de ligações de hidrogênio com um espaçamento entre as lamelas de aproximadamente 8,0 Å. A Figura 2.2 ilustra a diferença entre as disposições das lamelas empacotadas ao longo do eixo c no hidróxido de níquel na forma β e α . As lamelas se dispõem organizadamente para a fase β e de modo randômico e com maior espaço entre elas na fase α .

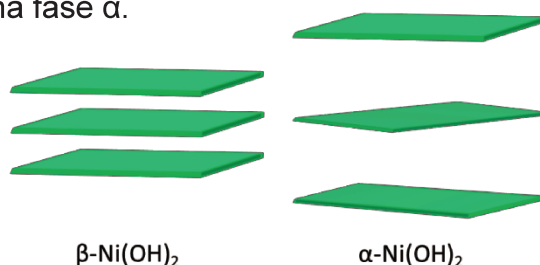
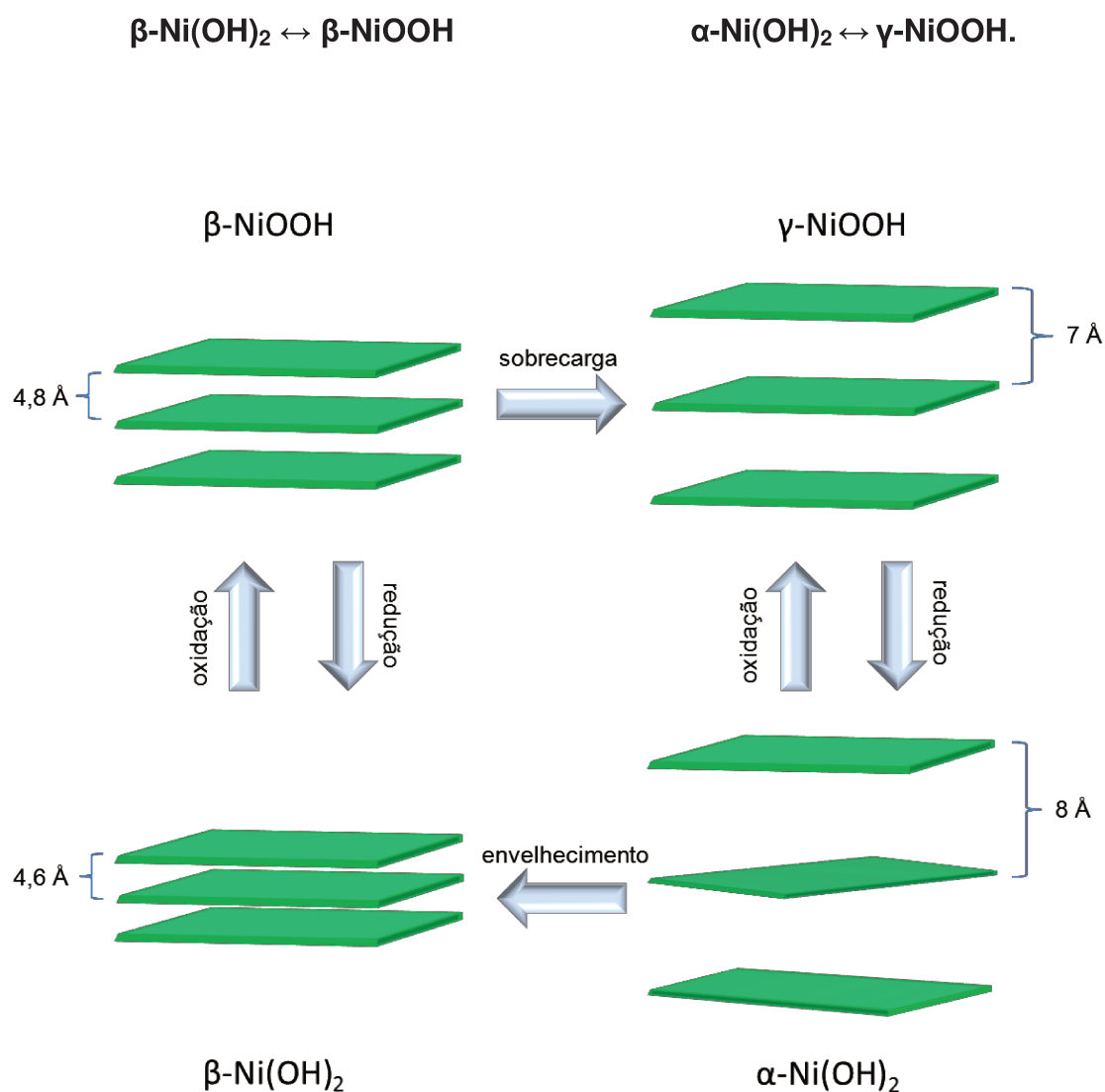


Figura 2.2: Ilustração da posição das lamelas do hidróxido de níquel na estrutura β (lamelas empilhadas ao longo do eixo c) e na estrutura α turbostrática (lamelas desorganizadas ao longo do eixo c).

O diagrama de Bode, Figura 2.3, ilustra as transformações que ocorrem entre as diversas variedades estruturais dos hidróxidos e oxi-hidróxidos de níquel. O hidróxido de níquel ao ser oxidado passa à oxi-hidróxido (NiOOH), que também

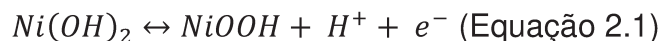
Modificação de eletrodos com nanopartículas de α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores - Introdução

possui duas variedades estruturais: β -NiOOH e γ -NiOOH. As reações de oxidação e redução ocorrem entre os seguintes pares estruturais:



Figurar 2.3: Diagrama de Bode ilustrando as transformações de fase do hidróxido de níquel por processos de oxidação/redução, envelhecimento e sobrecarga do material.

Ao oxidar $\alpha\text{-Ni(OH)}_2$, as lamelas são reorganizadas para formar $\gamma\text{-NiOOH}$ de espaço interlamelar igual a 7 Å. Este valor um pouco menor que o da sua forma reduzida ($\alpha\text{-Ni(OH)}_2 = 8$ Å) é devido a saída de um próton, H^+ .



Modificação de eletrodos com nanopartículas de α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores - Introdução

O γ -NiOOH possui estrutura semelhante à β -NiOOH. Esta última, a forma oxidada de β -Ni(OH)₂, as camadas são mantidas organizadas ao longo do eixo c mas com uma distância interlamelar maior devido à repulsão entre as lamelas. Já a grande distância interlamelar apresentada pela forma γ -NiOOH é justificada pela grande quantidade de moléculas de água e íons intercalados em sua estrutura. A estrutura γ também pode ser alcançada através de uma sobrecarga da estrutura β , mas esse processo é irreversível devido ao aumento brusco do espaço interlamelar. A forma α -Ni(OH)₂ possui propriedades eletroquímicas superiores à β -Ni(OH)₂, maior capacidade de carga e também maior atividade eletrocatalítica devido a uma maior exposição dos sítios ativos e por sua estrutura facilitar a difusão iônica. Por isso, a forma β é a mais utilizada para aplicações comerciais e baterias uma vez que α é mais instável e passa à β tanto pela ciclagem e uso contínuo quanto pelo envelhecimento natural. Pode-se observar a mudança de fase de α para β durante a ciclagem contínua de um eletrodo. O potencial de pico de oxidação é deslocado em torno de 50mV para valores mais positivos, segundo Bode e outros autores que investigaram esse processo utilizando KOH como eletrólito (Bode, 1966 *apud* Oliva 1982; Delahaye-Vidal *et al.*, 1986; Oliva *et al.*, 1982)

3.1.2. Síntese e estabilização de α -Ni(OH)₂

A procura de novos métodos para a obtenção de hidróxido de níquel tem sido de grande interesse para os pesquisadores até os dias de hoje, como pode ser observado na Figura 2.4 abaixo obtido através do site Web of Science a partir da pesquisa pelo seguinte termo “synthesis AND nickel hydroxide” dia 25/03/2013.

Modificação de eletrodos com nanopartículas de α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores - Introdução

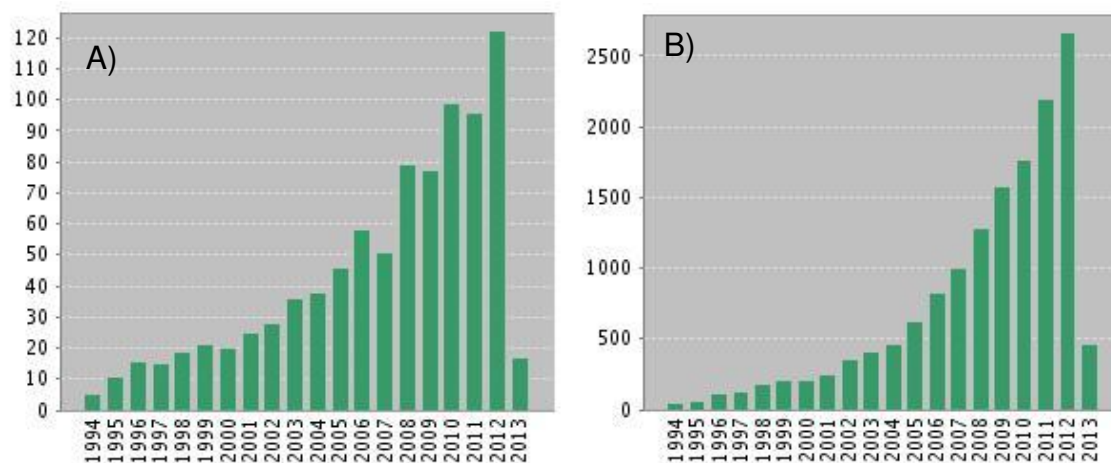


Figura 2.4: Gráficos obtidos pela procura do termo “synthesis AND nickel hydroxide” na plataforma Web of Science A) Número de publicações por ano; B) número de citações por ano.

Observa-se um aumento progressivo de artigos publicados a partir de 2000, provavelmente devido a busca de um material com melhores propriedades para diversas aplicações principalmente em baterias. O Gráfico da Figura 2.3 b), obtido na mesma pesquisa que o gráfico anterior, reflete o número de citações acumuladas ao longo dos anos desses mesmos artigos. Esse segundo, mostra, portanto, que o tópico ainda tem muito espaço para inovações, desenvolvimento e obtenção de um material com qualidades superiores.

A grande motivação para esses estudos é a obtenção de um material de hidróxido de níquel com propriedades diferenciadas do material original, como descritas na seção anterior. Ainda mais importante, seu desempenho eletroquímico depende fortemente de sua estrutura, morfologia, tamanho, condutividade e estabilidade. O hidróxido de níquel já foi sintetizado em diversas morfologias como: fios, folhas, bastões, flores e partículas esféricas, em tamanhos que variam nas escalas micro e nanométrica. (Yu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010; Ida *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2004; Salvati-Niasari *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2005)

Modificação de eletrodos com nanopartículas de α -Ni(OH)₂ e ouro

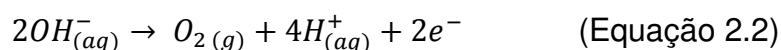
para aplicação em sensores - Introdução

De modo geral, todas as sínteses, estão baseadas na precipitação do hidróxido de níquel a partir de soluções alcalinas e algumas rotas necessitam de *template*. Diferentes estratégias foram utilizadas para a obtenção do hidróxido de níquel, sendo a reação hidrotérmica, a mais utilizada devido a um maior controle da

estrutura do produto (Salvati-Niasari *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2007). Muitos parâmetros devem ser controlados para a obtenção de uma nanoestrutura que favoreça as reações de oxirredução e ainda mais, que a fase alfa seja preferida. Já que altas temperaturas, concentração de reagentes, e altos valores de pH induzem a formação da fase β do hidróxido de níquel. O tempo de reação também deve ser controlado, pois favorece o crescimento das partículas o que pode prejudicar o desempenho eletroquímico do material.

Apesar de grandes esforços serem projetados na direção das reações hidrotérmicas, é interessante explorar a obtenção do hidróxido de níquel a partir de métodos mais simples, de baixo custo para produção em larga escala.

Muitos esforços são feitos no sentido de estabilizar a fase α do hidróxido de níquel para sua aplicação em baterias e em sensores como eletrocatalisador de diversas moléculas. Uma das estratégias para a estabilização da fase alfa do hidróxido de níquel é a incorporação de aditivos (Vidotti *et al.* 2010). Os mais utilizados são cobalto, alumínio, magnésio, ferro e cádmio (Corrigan and Bendert 1988) (Qi *et al.* 2008; Vidotti *et al.* 2009b). Esses íons podem ser inseridos por co-precipitação, co-deposição ou *layer-by-layer*. O cobalto é um dos metais mais usados por substituir o níquel na rede cristalina. Como efeito, observa-se um deslocamento catódico dos picos de oxidação/redução e um aumento da condutividade do material. O deslocamento do potencial para valores menos positivos é um atrativo para separar o processo de oxidação do hidróxido de níquel com a reação de produção de O₂, segundo a equação 2.2.



Modificação de eletrodos com nanopartículas de α -Ni(OH)₂ e ouro

para aplicação em sensores - Introdução

Apesar do α -Ni(OH)₂ dopado apresentar maior estabilidade durante a ciclagem, observa-se uma diminuição da sua capacidade de carga. Provavelmente, o aumento da estabilidade do material é justificada pela diminuição da repulsão entre lamelas o que também justificaria a observação da diminuição da capacidade de carga nesses materiais dopados.

Encontram-se trabalhos na literatura que investigam o hidróxido de níquel nanoparticulado e também com outros nanomateriais que poderiam melhorar a condutividade do material, como nanotubos de carbono e grafeno, e portanto melhorar a estabilidade. Contudo, nenhum trabalho foi reportado na literatura investigando o hidróxido de níquel com a nanopartícula de ouro, o nanomaterial mais aplicado a sensores.

2.2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo obter um material novo formado de hidróxido de níquel em sua estrutura alfa com nanopartículas de ouro. A inserção de nanopartículas de ouro é a estratégia para aumentar a condutividade e por consequência, a estabilidade do processo de oxidação/redução do hidróxido de níquel. O aumento da condutividade desse compósito frente ao hidróxido puro poderia levar também a uma maior sensibilidade à carboidratos também. Ainda mais, a estabilidade do fase alfa do hidróxido de níquel possibilitaria a aplicação de um material com excelentes propriedades eletroquímicas, tanto em baterias como em sensores.

2.3. Materiais e Métodos

2.3.1. Materiais e Reagentes

O acetato de níquel foi comprado da Ecibra (São Paulo, Brasil). A suspensão de nanopartículas de ouro de tamanhos 5, 10 e 20 nm, hidróxido de potássio em pastilhas, cloreto de potássio, D-glicose e 2-propanol 99,5% foram comprados da Sigma-Aldrich (EUA e Canadá). Todas as soluções aquosas foram preparadas com água Milli-Q Millipore.

2.3.2. Síntese do hidróxido de níquel com nanopartículas de ouro.

O acetato de níquel foi dissolvido em álcool isopropílico em uma concentração de $1,8 \times 10^{-6}$ mol/L. Uma alíquota de 1,5 mL da dispersão de nanopartícula de ouro foi centrifugada em uma Centrífuga Eppendorf 5418R a 14000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos. As nanopartículas de ouro depositadas foram separadas do solvente e redispersas em diferentes volumes de soluções alcoólicas de acetato de níquel sob agitação. O volume total da dispersão foi acertado para 1 mL. Após 30 minutos de agitação, 100 μ L de uma solução de 0,1 mol/L de KOH foram adicionados à dispersão. Após 5 minutos de agitação, a dispersão foi centrifugada por 10 minutos a 14000 rpm. O material depositado foi lavado duas vezes com álcool isopropílico e disperso em 100 μ L de água. As dispersões foram sintetizadas em diferentes proporções de níquel: nanopartícula de ouro, como será discutido mais adiante.

2.3.3. Síntese do hidróxido de níquel puro

A precipitação do hidróxido de níquel foi realizada nas mesmas condições que as anteriores só que na ausência das nanopartículas de ouro. A concentração final de hidróxido de níquel na dispersão aquosa é a mesma para o hidróxido de níquel puro e para o hidróxido de níquel com nanopartículas de ouro.

2.3.4. Caracterização estrutural e morfológica

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Materiais e Métodos

As análises de raios-X foram realizadas em um Difratorômetro de Raios X Shimadzu XDR7000. Um volume total de 200 μ L da dispersão de nanopartículas ainda em álcool isopropílico foi depositado no lado de trás do porta amostra de vidro em alíquotas de 5 μ L. As amostras de hidróxido de níquel puro foram analisadas em forma de pó.

Os experimentos de espectroscopia de absorbância ultravioleta-visível foram realizados em um Espectrofotômetro de Absorção UV-Visível Agilent Carry 50. As amostras foram dispersões alcoólicas diluídas em 10 vezes e os espectros foram subtraídos do branco de álcool isopropílico.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura e transmissão foram feitas em um microscópio JEOL/EO JSM-3630 e TEM em um microscópio JEOL 2100 respectivamente. Uma alíquota de 5 μ L das dispersões aquosas foram depositadas nos respectivos porta amostras. A estimativa de tamanho de cristalito foi feita a partir do perfil de linha no Software Image J.

2.3.5. Construção do sensor

Alíquotas de 2 μ L das dispersões aquosas foram depositadas na superfície de um eletrodo de carbono vítreo limpo de área de 0,071 cm². As deposições foram feitas com intervalo de 15 minutos entre elas a temperatura ambiente.

2.3.6. Experimentos eletroquímicos

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato Metrohm Autolab PGSTAT 10. Os dados foram obtidos através do Software GPES. A célula eletroquímica é composta pelo sensor como eletrodo de trabalho, um eletrodo de platina como contraeletrodo e um eletrodo de calomelano saturado como eletrodo de referência. Somente os experimentos de impedância foram realizados em um potenciostato Metrohm Autolab PGSTAT12 e os dados foram tratados e ajustados pelo Software Nova 9.1.

2.4. Resultados e Discussão

2.4.1. Instabilidade do hidróxido de níquel

Como discutido anteriormente, apesar de o hidróxido de níquel em sua forma α possuir propriedades superiores às outras estruturas, o mesmo é termodinamicamente instável e passa à forma β com o uso ou até mesmo com o envelhecimento do material (Bode *et al.* 1969; Oliva *et al.* 1982). A Figura 2.5 apresenta voltamogramas cíclicos consecutivos de um eletrodo modificado com hidróxido de níquel. É possível observar que a corrente de pico diminui já a partir do segundo ciclo. Além disso, o potencial de oxidação desloca-se ao decorrer das varreduras para valores mais positivos que são mais próximos do valor esperado para a estrutura β do hidróxido de níquel (aproximadamente 0,5V).

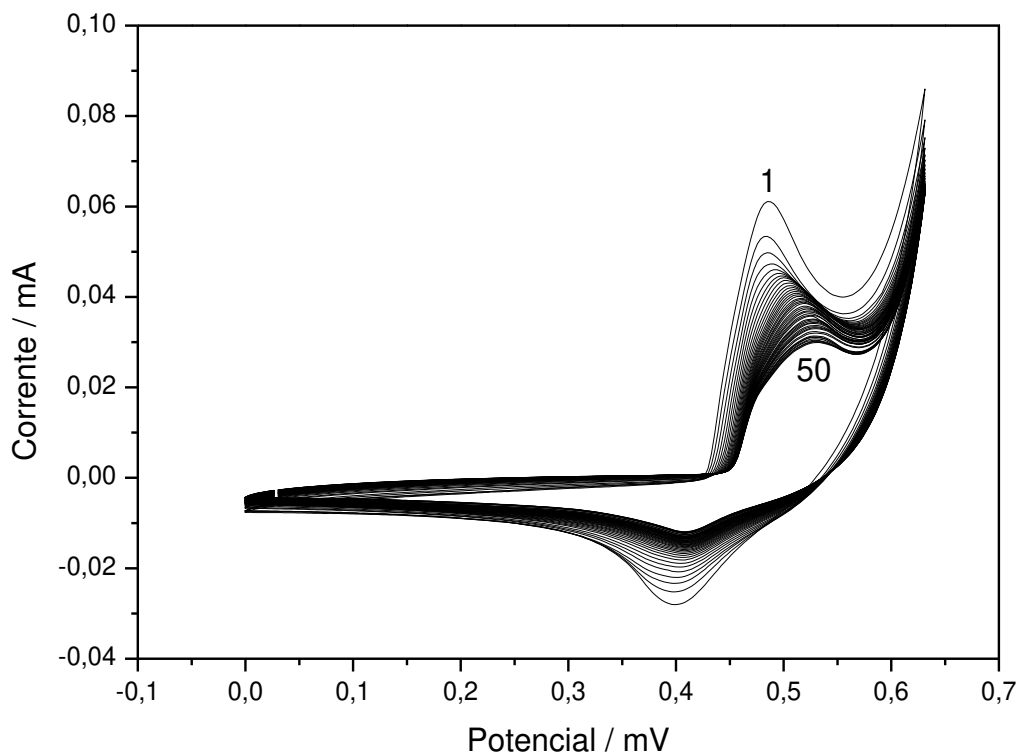


Figura 2.5: Voltamogramas cíclicos de um eletrodo modificado com hidróxido de níquel em 0,1 mol/L de KOH/KCl, $v= 10\text{mV/s}$.

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

Através da Figura 2.5 ainda pôde-se observar que a capacidade de carga do material diminui ao decorrer das varreduras cíclicas. Isso diminui as possibilidades de aplicação uma vez que o material não é estável e sua atividade não pode ser prevista.

2.4.2. Síntese do hidróxido de níquel com nanopartículas de ouro

Bao *et al.* 2008 desenvolveram um material *core-shell* formado por nanopartículas de ouro cobertas por níquel metálico. Esta síntese consiste na adição de um sal de níquel a uma suspensão de nanopartículas de ouro de 60 nm e após 30 min de agitação uma certa quantidade de hidrazina é adicionada para reduzir Ni²⁺ para Ni⁰ na superfície das nanopartículas de ouro. O design de nanopartículas *core-shell* de (Bao *et al.* 2008) serviu como inspiração para a obtenção de um material de hidróxido de níquel estabilizado com nanopartículas de ouro. A hipótese traçada é que as nanopartículas de ouro poderiam estabilizar e aumentar a condutividade do hidróxido de níquel, enquanto este recobriria toda a superfície das nanopartículas e conferiria ao novo material suas propriedades eletrocatalíticas. Para isso, experimentos exploratórios foram realizados com 3 diferentes tamanhos de nanopartículas de ouro, 5, 10 e 20 nm, sendo o último, 20 nm, o único que apresentou melhoria nas propriedades eletrocatalíticas e portanto o único que será apresentado e discutido daqui em diante. Com o objetivo de se obter a melhor relação entre hidróxido de níquel e nanopartículas de ouro, dispersões com diferentes razões Ni: AuNP foram sintetizadas de acordo com a Tabela 2.1.

A síntese do material descrita (2.3.2) consiste basicamente na precipitação do hidróxido de níquel em uma suspensão alcoólica de nanopartículas de ouro. Álcool isopropílico foi escolhido como solvente, uma vez que permite formar partículas muito pequenas ou camadas muito finas (3-10 nm) (Bao *et al.* 2008; Yang *et al.* 2007). Após a precipitação do hidróxido de níquel, as nanopartículas foram lavadas com água para retirar o excesso de reagentes que poderiam provocar um envelhecimento precoce do material. Suspensões aquosas dos

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

materiais obtidos nas diferentes sínteses foram utilizadas para a modificação dos eletrodos de carbono vítreo.

Tabela 2.1: Tabela com as proporções entre níquel e nanopartículas de ouro das sínteses.

	Ni ²⁺ (mol)	AuNP (mol) [*]
NP 1	0	1x 10 ⁻¹⁰
NP 2	2,25 x 10 ⁻⁸	1x 10 ⁻¹⁰
NP 3	6,75 x 10 ⁻⁸	1x 10 ⁻¹⁰
NP 4	9 x 10 ⁻⁸	1x 10 ⁻¹⁰
NP 5	1,1 x 10 ⁻⁷	1x 10 ⁻¹⁰
NP 6	1,8 x 10 ⁻⁷	1x 10 ⁻¹⁰
NP 7	1,8 x 10 ⁻⁶	1x 10 ⁻¹⁰
Ni(OH)₂	1,8 x 10 ⁻⁷	0

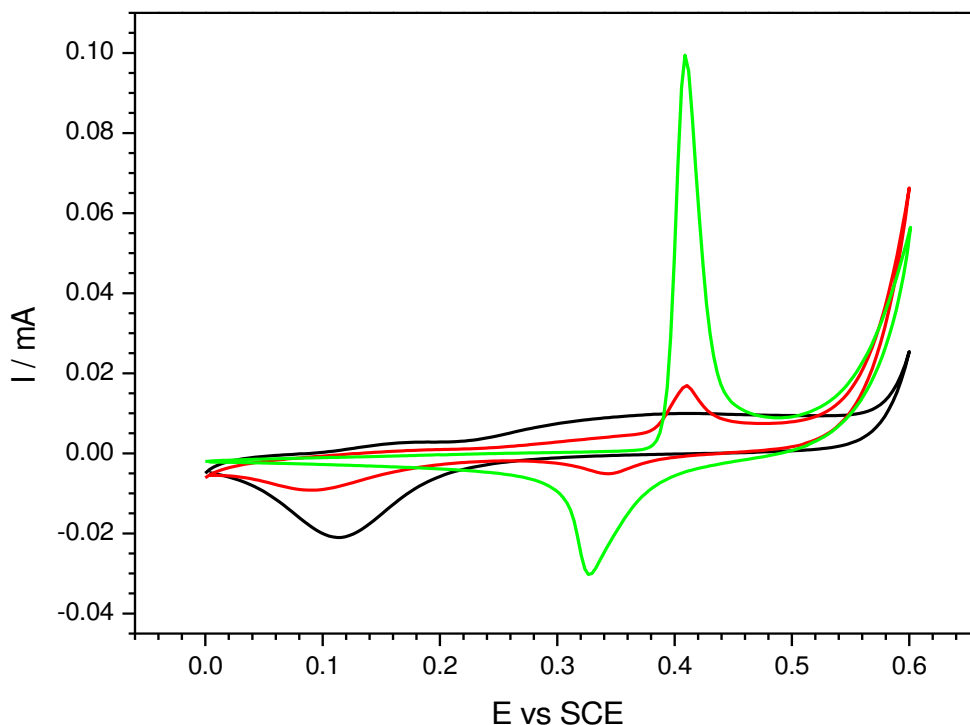


Figura 2.6: Voltamogramas cíclicos dos eletrodos modificados com os materiais NP1 (—), NP5 (—) e NP7 (—) em 0,1 mol/L KOH/KCl, $\nu = 10$ mV/s.

^{*} Nota-se aqui que a unidade não é a de átomos de ouro, mas sim de mol de nanopartículas.

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

Os eletrodos modificados foram caracterizados eletroquimicamente através de medidas de voltametria cíclica, como apresentado na Figura 2.6. É possível observar que o eletrodo modificado somente com nanopartículas de ouro apresenta em seu voltamograma somente um pico de redução por volta de 0,1 V, o que está de acordo com a literatura (Bao *et al.* 2008). Este pico é atribuído a um processo de redução da superfície das nanopartículas de ouro que diminuiu progressivamente à medida que se aumenta a proporção de níquel nas suspensões, sugerindo que o hidróxido de níquel recobre a superfície das nanopartículas de ouro.

A partir do voltamograma para o eletrodo modificado com a dispersão NP3, observa-se o aparecimento dos picos de oxidação/redução do hidróxido de níquel. E nas suspensões seguintes mais concentradas de hidróxido de níquel, uma crescente definição desses picos com maiores valores de corrente e capacidade de carga. Quanto maior a área superficial coberta pelo hidróxido de níquel, maior o número de sítios disponíveis para catálise e, portanto, melhor desempenho eletrocatalítico do material. Por isso, a amostra NP7, que tem a maior concentração de hidróxido de níquel, foi avaliada quanto sua estabilidade, onde observou-se após 50 ciclos consecutivos que não havia melhora da estabilidade desse material quando comparado ao hidróxido de níquel puro, como pode ser observado na Figura 2.7.

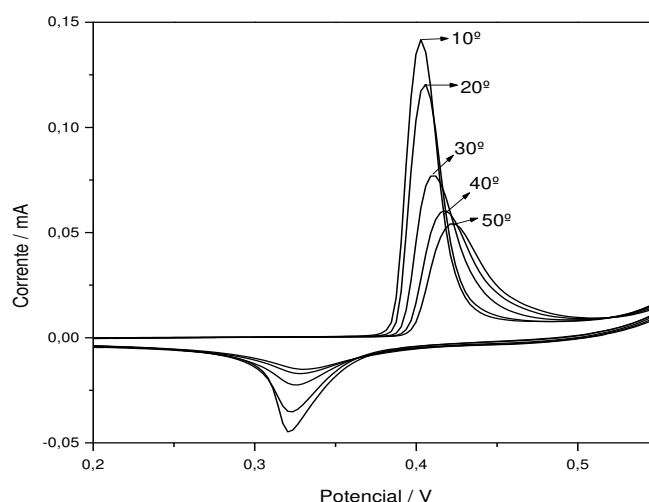


Figura 2.7: Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado com o material de hidróxido de níquel e nanopartículas de ouro NP7 em 0,1 mol/L KOH/KCl, $v = 10\text{mV/s}$

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

A variação de corrente entre o 20º e o 50º ciclos foi de 55% para a modificação com o material NP7 que é próximo ao valor obtido para o hidróxido de níquel puro. Isto indica que a inserção das nanopartículas de ouro nessa proporção não contribuiu para a estabilidade do material como se esperava. Portanto, partiu-se para a investigação da estabilidade da seguinte amostra mais concentrada em níquel, a NP6. A estabilidade do material foi avaliada da mesma maneira, por 50 ciclos voltamétricos consecutivos, que estão apresentados na Figura 2.8. Inicialmente, NP6 apresenta baixas capacidades de carga que aumentam ao longo das varreduras cíclicas seguintes até atingir uma estabilidade que se mantém até o 50º ciclo. Entre o 20º e o 50º ciclo a corrente apresentou uma variação de apenas 6%. Além da baixa variação da corrente, os potenciais de oxidação e redução permaneceram os mesmos, portanto não foi observada a formação da estrutura β -Ni(OH)₂. Após a observação que a inserção da nanopartícula de ouro provocou uma melhora na estabilidade do α -Ni(OH)₂, este material foi caracterizado e o sensor otimizado.

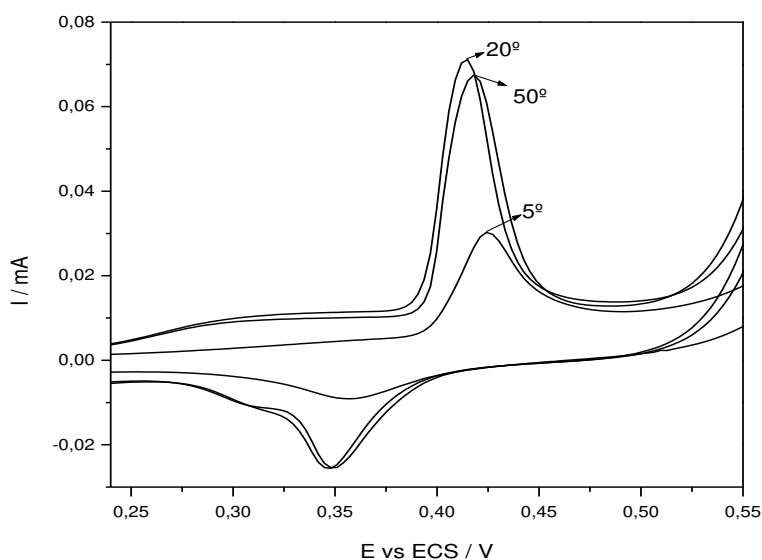


Figura 2.8: Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado com o material de hidróxido de níquel e nanopartículas de ouro NP6 em 0,1 mol/L KOH/KCl, $v = 10\text{mV/s}$

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

2.4.3. Caracterização estrutural e morfológica

Os voltamogramas apresentados anteriormente sugeriam uma estrutura do hidróxido de níquel corresponde à fase alfa, com picos de oxidação e redução em 0,4 e 0,37 V, respectivamente. Medidas de difração de raios-X podem confirmar a estrutura cristalina obtida por essa síntese e também fornecer outros parâmetros interessantes como tamanho de cristalito, espaço interlamelar e ainda verificar se as nanopartículas de ouro provocaram alguma alteração na estrutura do hidróxido de níquel e vice-versa. O hidróxido de níquel sintetizado na ausência das nanopartículas de ouro (daqui em diante chamado de “hidróxido de níquel puro”) também foi submetido à essa análise para comparação.

Os difratogramas obtidos estão apresentados na Figura 2.9, onde a) hidróxido de níquel puro e b) hidróxido de níquel modificado com nanopartículas de ouro. A dificuldade de sintetizar o novo material em grandes quantidades, devido à baixa concentração das nanopartículas de ouro na dispersão de partida, dificultou a amostragem para realizar a difração de raios-X. A quantidade de amostra sintetizada em forma de pó não era suficiente para preencher o porta amostra e um desnível grande entre eles (amostra-porta-amostra) não atenderia as exigências da Lei de Bragg, Equação 2.1. Para superar isso, a amostra foi depositada no lado contrário do porta amostra a partir da suspensão e a acumulação de dados foi aumentada através da diminuição da velocidade de varredura para intensificar o sinal.

$$2d\sin\theta = n\lambda \quad (\text{Equação 2.1})$$

Onde d é a distância entre os planos, θ é o ângulo de Bragg, n é uma constante de multiplicidade e λ é o comprimento de onda da fonte utilizada. O difratograma obtido para o material de hidróxido de níquel e nanopartículas de ouro NP6 (Fig. 2.9 (b)) apresenta características de um material fracamente cristalino e com características turbostráticas (Liu and Li 2009).

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

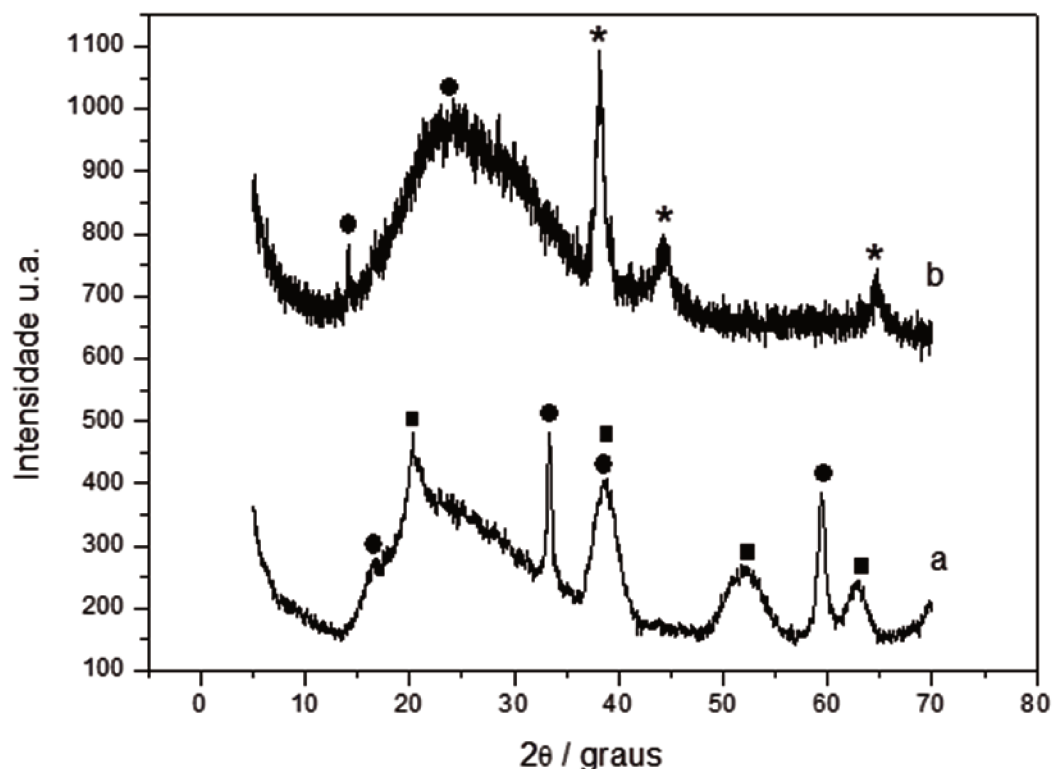


Figura 2.9: Difratoograma de Raios-X das amostras sintetizadas como a) hidróxido de níquel puro e b) do hidróxido de níquel com nanopartículas de ouro (NP6). Marcações dos picos correspondem a: (■) β -Ni(OH)₂ (06-0141); (●) α -Ni(OH)₂ (JCPDS 22-0444) e (*) ouro metálico (JCPDS 04-0784).

A banda larga observada entre $2\theta = 20 - 30^\circ$ é característica da desordem do material e é apresentada no difratograma dos dois materiais. É possível que haja também uma contribuição do sinal do porta amostra nessa mesma região. A análise do hidróxido de níquel puro apresenta ainda picos das duas estruturas, α e β , sugerindo uma mistura das fases. O difratograma do hidróxido de níquel com nanopartícula de ouro não apresentou nenhum pico relativo à estrutura β . Supõe-se, portanto, que esta fase não está presente, pois os picos poderiam ser facilmente observados devido à sua natureza mais cristalina. Sugere-se que a presença das nanopartículas de ouro durante a síntese induz à formação da fase

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

alfa do hidróxido de níquel. A partir dos difratogramas, é possível obter uma estimativa do tamanho do cristalito formado utilizando a equação simplificada de Scherrer a seguir:

$$\tau = \frac{0,9\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (\text{Equação 2.3})$$

Onde τ é o tamanho do cristalito em nm, λ é comprimento de onda da fonte, que para o Cu é 0,154184 nm, β é a largura a meia altura do pico em radianos e θ é o ângulo de Bragg. Para o hidróxido de níquel puro, foi usado o valor de $2\theta = 59,38$, $\beta = 0,01169$ m. O tamanho estimado do cristalito é $\tau \approx 13$ nm. A Equação de Scherrer é aplicada somente para cristalitos pequenos e deve ser usada como uma estimativa, uma vez que admite-se que o alargamento dos picos na difração é causado pelo tamanho reduzido do cristalito. No entanto, a baixa cristalinidade do material obtido neste trabalho também pode contribuir para este alargamento.

Para a amostra com nanopartículas de ouro, NP6, o difratograma (b) apresenta uma baixa relação sinal ruído. Isso deve-se a dois fatores: 1) α -Ni(OH)₂ é pouco cristalino e portanto os picos são pouco definidos e 2) a amostra está em baixa quantidade. Por causa da baixa resolução, não foi possível estimar o tamanho do cristalito por esta técnica. Nesta amostra há três picos bem definidos em $2\theta = 38,2$; $44,4$; $64,6$, todos correspondentes ao ouro metálico (JCPDS 04-0784), sugerindo alta cristalinidade das nanopartículas e a manutenção de sua estrutura após a síntese.

Ainda, é possível observar um pico em aproximadamente $2\theta = 14^\circ$, plano (001) do hidróxido de níquel correspondente à lamela. O deslocamento observado entre o pico obtido experimentalmente e o padrão da ficha cristalográfica (JCPDS 22-0444) pode ser atribuído às condições de síntese, como solvente, contra íon do sal de níquel utilizado como reagente e a própria adição de nanopartículas de ouro. A partir da Equação 1, foi possível obter uma estimativa da distância interlamelar, $d \approx 6$ Å. O valor encontrado foi menor que o esperado para a estrutura alfa do hidróxido de níquel (8 Å). Provavelmente, após a síntese as lamelas ainda estejam

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

um pouco compactadas, o que justifica o aumento da capacidade de carga do material durante os primeiros ciclos voltamétricos até atingir uma estabilidade. Isso foi observado na Figura 5.4. Uma aproximação do pico em $2\theta = 14^\circ$ está apresentada na Figura 2.10, onde a intensidade foi elevada ao quadrado para definir o pico contra o ruído.

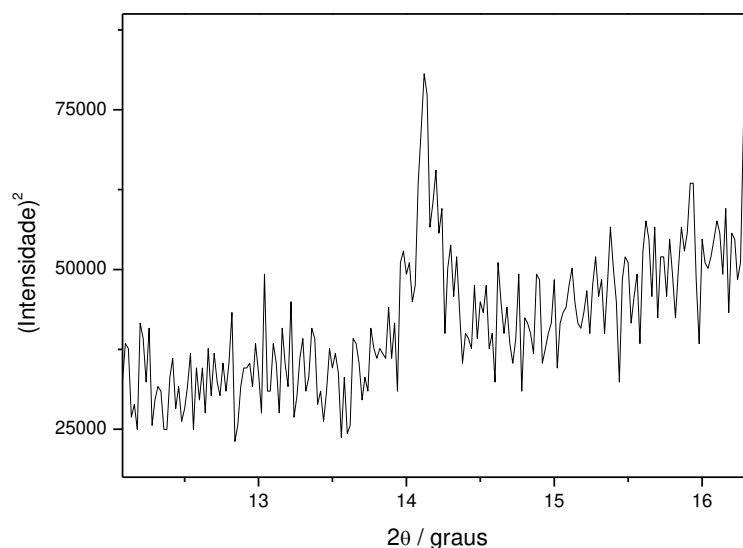


Figura 2.10: Aproximação do difratograma do hidróxido de níquel com nanopartículas de ouro na região do plano (001).

Delahaye e colaboradores REF encontrou uma relação entre a distância interlamelar do hidróxido de níquel com o número de átomos de carbono do ânion utilizado na síntese. É possível que o uso do ânion acetato na síntese influencie na fase do hidróxido de níquel produzido. De forma geral, a comparação entre os difratogramas dos dois materiais (sem e com nanopartículas de ouro) sugere que a inserção de nanopartículas de ouro na síntese favorece a formação da fase α do hidróxido de níquel uma vez que nenhum pico da fase β foi identificado.

Como discutido anteriormente, quando as dimensões dos materiais são reduzidas à escala nanométrica, dois efeitos podem ser observados. Primeiro, o aumento da área superficial, fenômeno importante quando se estuda processos catalíticos. Segundo é o efeito de confinamento quântico, que ocorre quando as dimensões das partículas estão próximas ao comprimento da função de onda do elétron o que pode alterar radicalmente as propriedades dos materiais, como a

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

Energia de bandgap. A partir da absorção da radiação eletromagnética, os elétrons passam do estado fundamental para o estado excitado que no caso de materiais no estado sólido, corresponde à transição entre a banda de valência e banda de

condução. A diferença energética entre a BV e a BC do material é denominado de energia de bandgap (E_{bg}) e pode ser determinada por espectroscopia na região do ultravioleta/visível. A Figura 2.11 apresenta o espectro de absorção obtidos da dispersão alcoólica de Ni(OH)₂ sem nanopartículas de ouro.

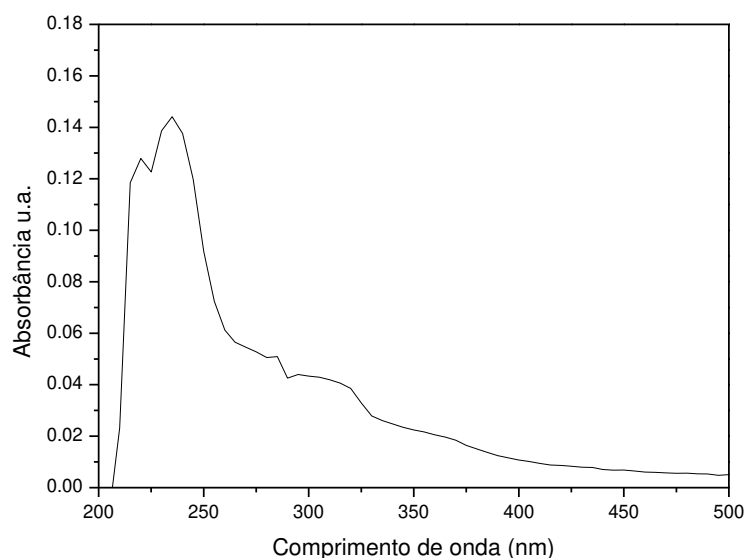


Figura 2.11: Espectro de absorção na região do ultravioleta e visível da dispersão de hidróxido de níquel sintetizado (branco: álcool isopropílico).

A energia de bandgap do hidróxido de níquel puro bulk varia entre 3,6 a 3,9 eV, o que corresponde à uma absorção na região de 318-344 nm (Carpenter and Corrigan 1988). Para o hidróxido de níquel sintetizado neste trabalho, foi observada uma absorção que começa em 330 nm, valor obtido a partir do cálculo da derivada do espectro de absorção. A banda larga observada sugere uma ampla faixa de tamanho das partículas. No entanto, o pico tem seu máximo em 230nm o que representa as transições de maior frequência que ocorrem no material. Portanto, a energia de bandgap obtida para o hidróxido de níquel puro foi de 4,5 eV, valor este maior que o material na sua forma bulk. A determinação da E_{bg} foi feita a partir da

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

prolongação por uma reta do pico de absorção. Se o material está em regime de confinamento quântico, a energia de bandgap se desloca para valores maiores que do bulk. No espectro é observado deslocamento do pico para valores menores de comprimento de onda, chamado de *blueshift*. Sendo assim, o deslocamento do pico de absorção para menores comprimentos de onda sugere a formação de partículas muito pequenas e em regime de confinamento quântico.

Dispersões dos novos materiais NP5, NP6 e NP7 e uma dispersão das nanopartículas de ouro também foram analisadas por espectroscopia UV-vis. Os espectros de absorção estão apresentados na Figura 2.12.

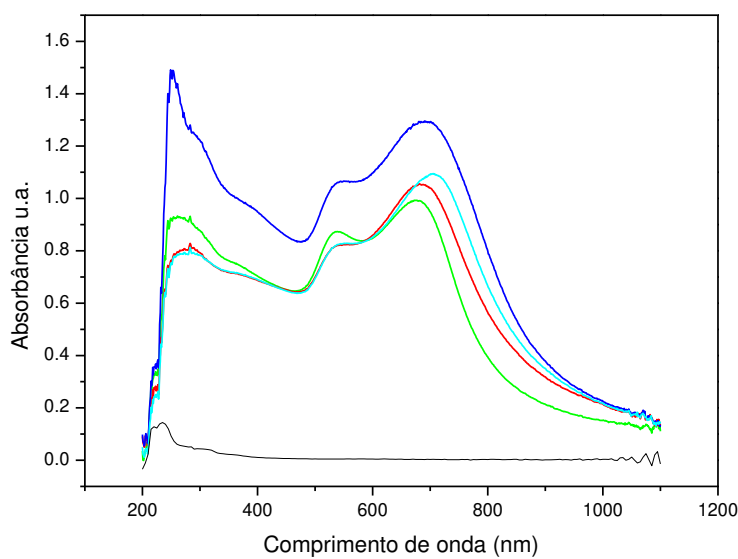


Figura 2.12: Espectros de absorção na região do ultravioleta visível das dispersões de NP5 (—), NP6 (—), NP7 (—), AuNP (—) e Ni(OH)₂ (—), (branco: álcool isopropílico).

A região de 500 a 700 nm é característica dos picos da banda plásmon das nanopartículas de ouro, mas as dispersões apresentam grande absorvidade por toda a região de 200 a 900nm. No entanto, um destaque pode ser dado na região entre 230 a 280 nm, onde observa-se uma relação entre o hidróxido de níquel e as AuNPs. Uma aproximação dessa região é apresentada na Figura 2.13.

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

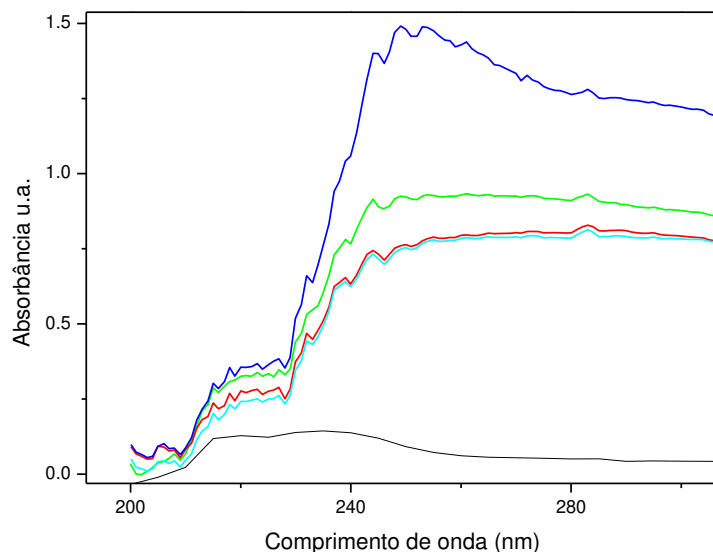


Figura 2.13: Espectros de absorção da região ultravioleta visível das dispersões NP5 (—), NP6 (—), NP7 (—), AuNP (—) e Ni(OH)₂ (—) com maior resolução na região de 200-300 nm.

Observa-se, para a dispersão com somente AuNP, uma larga banda com máximo em 280nm. Ao comparar esta com os máximos das bandas das dispersões dos materiais de hidróxido de níquel com nanopartículas de ouro, nota-se um aumento proporcional da absorção nesta região com a concentração de hidróxido de níquel. Ainda mais, um deslocamento do máximo do pico para comprimentos de ondas menores, 280, 260 e 249 nm para NP5, NP6 e NP7, respectivamente.

Enquanto que o aumento da absorção corresponde ao aumento da quantidade de hidróxido de níquel na dispersão, o deslocamento da banda sugere que há uma interação entre a nanopartícula de ouro e o hidróxido de níquel na sua superfície. Possivelmente, o hidróxido de níquel não precipita somente entra as nanopartículas de ouro, mas cresce na sua superfície e interage, alterando sua banda plásmon. A partir destas observações, juntamente com o perfil voltamétrico do material, sugere-se que o hidróxido de níquel recobre as nanopartículas de ouro (Zhang *et al.* 2011).

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

O voltamograma da dispersão de NP5 apresentado na Figura 2.6 sugeriu que o hidróxido de níquel nesta concentração não recobriu a superfície da nanopartícula e a espectroscopia corroborou para esta proposição, pois a dispersão apresentou máximo de absorção no mesmo comprimento de onda que a AuNP. Já as dispersões com maior concentração de hidróxido de níquel apresentam 20 e 30 nm de deslocamento além do aumento da absorção quando comparados com AuNP. Todas essas observações experimentais, portanto, sugerem que a superfície das nanopartículas de ouro está recoberta por hidróxido de níquel, isto levanta a possibilidade da formação de um material core-shell na proximidade das nanopartículas de ouro.

A morfologia dos materiais nanoestruturados é um fator importante que atua diretamente no desempenho eletroquímico destes e, por este motivo, as amostras obtidas foram investigadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A Figura 2.14 abaixo mostra imagens obtidas para a NP6.

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

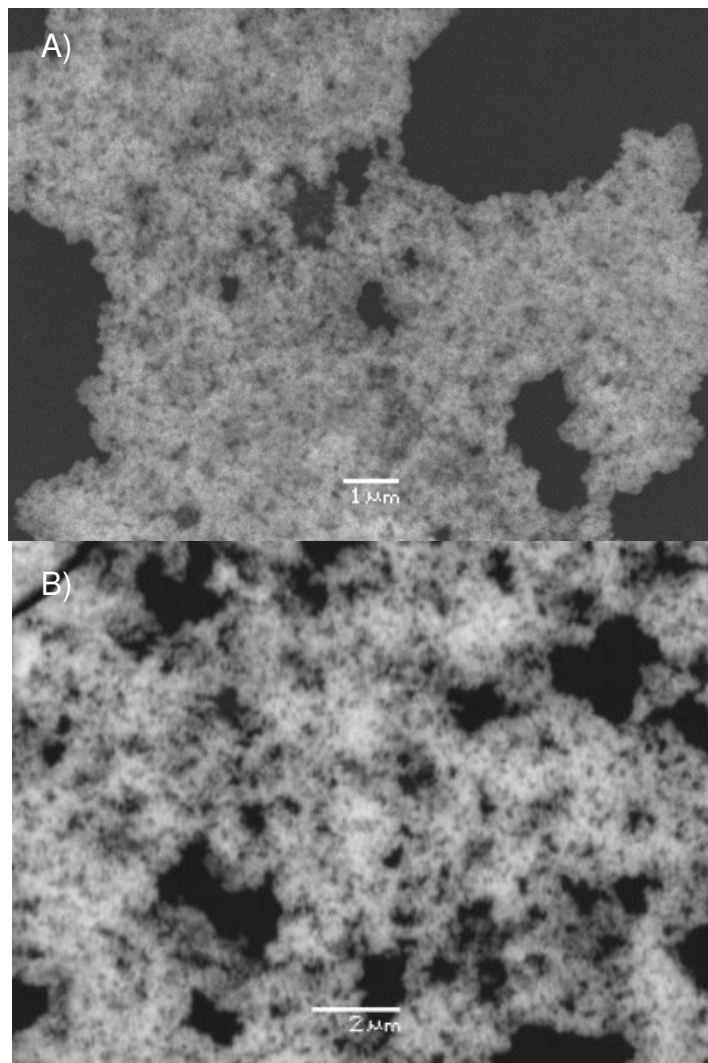


Figura 2.14: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura do hidróxido de níquel com nanopartículas de ouro, e B) detector de backscattering.

As imagens obtidas por MEV mostram um material nanoparticulado, característica que favorece o desempenho do material tanto na sua estabilidade quanto na atividade eletrocatalítica. A imagem da Figura 2.14. b) é formada por elétrons retroespalhados e como o hidróxido de níquel não é um bom condutor, é fácil observar contrastes no material devido à inserção das nanopartículas de ouro. Devido a diferença na densidade eletrônica entre o hidróxido de níquel e as nanopartículas de ouro, observa-se um contraste entre os dois materiais. Além disso, é possível observar que as nanopartículas de ouro, regiões mais claras da

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

imagens, estão distribuídas com certa uniformidade pela amostra e não estão aglomeradas. Portanto, acredita-se na formação de um nanocompósito.

As amostras também foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM), onde nas Figuras 2.15 e 2.16 apresentam-se as imagens para as amostras de hidróxido de níquel puro e do hidróxido de níquel com nanopartículas de ouro (NP6) respectivamente.

Na Figura 2.15 (imagens a, b, c e d) observa-se um material com morfologia de folhas e poroso. Essa morfologia foi observada em vários trabalhos na literatura para o α -Ni(OH)₂ (Oliva *et al.* 1982) e (Lang *et al.* 2008)) e para a o α -Ni(OH)₂ ((Liang *et al.* 2004; Liu and Li 2009). A partir das micrografias das nanofolhas apresentadas, acredita-se que o crescimento do hidróxido de níquel se dá provavelmente pelos eixos cristalográficos *a* e *b*. O crescimento pelo eixo *c* pode ser desfavorecido devido à instabilidade das interações e também pela distância interlamelar (Guan and Deng 2007). Nas imagens e e f pode-se observar que as folhas são formadas por uma aglomeração de cristalitos de dimensões nanométricas com tamanho médio de 3,8 nm. O histograma correspondente à essa análise de N= 126 e faixa de tamanho de 3,2 a 4,2 nm, está apresentado na Figura 2.18.

**Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para
aplicação em sensores – Resultados e Discussão**

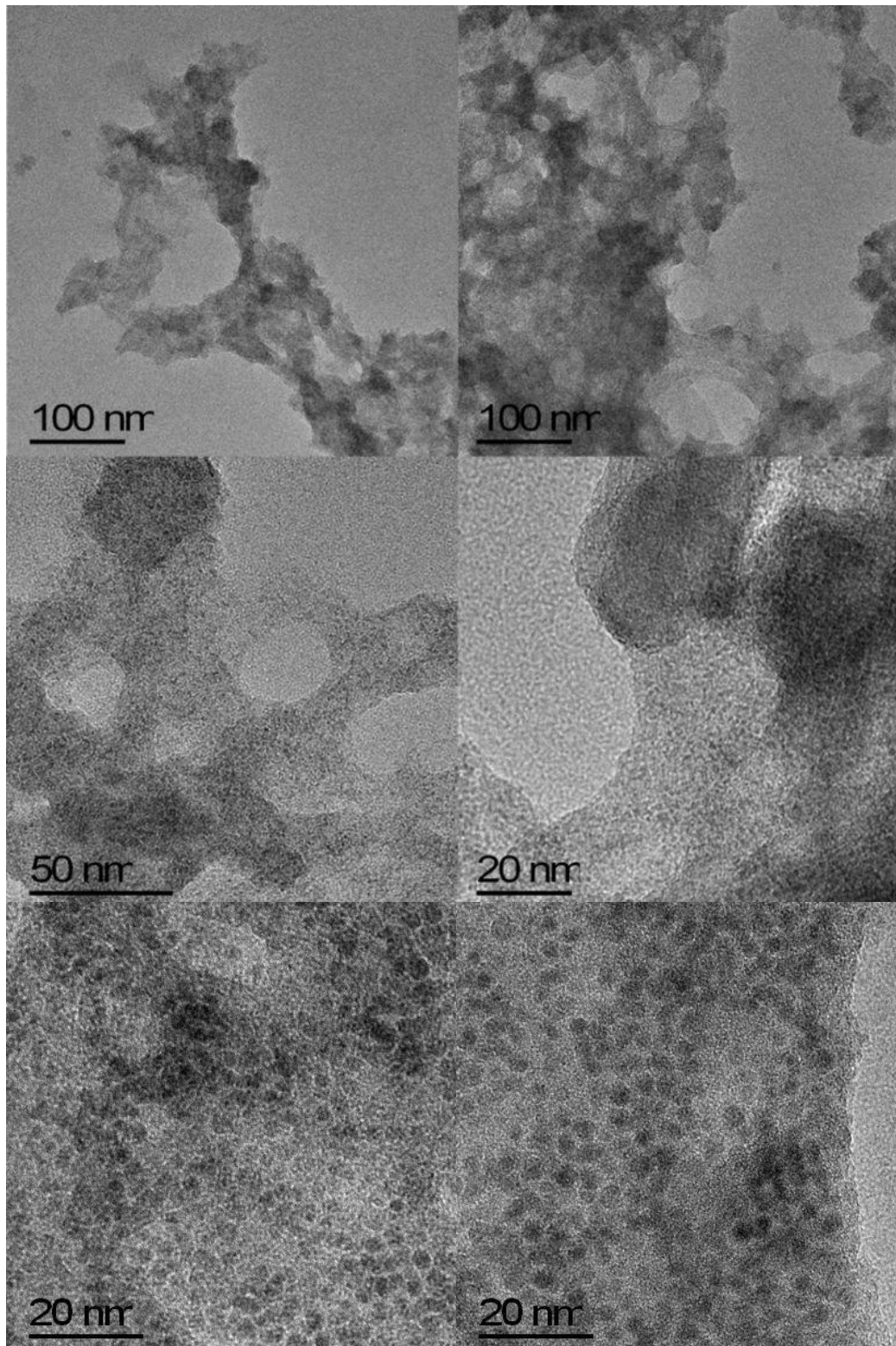


Figura 2.15: Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão do hidróxido de níquel puro em diferentes resoluções.

**Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para
aplicação em sensores – Resultados e Discussão**

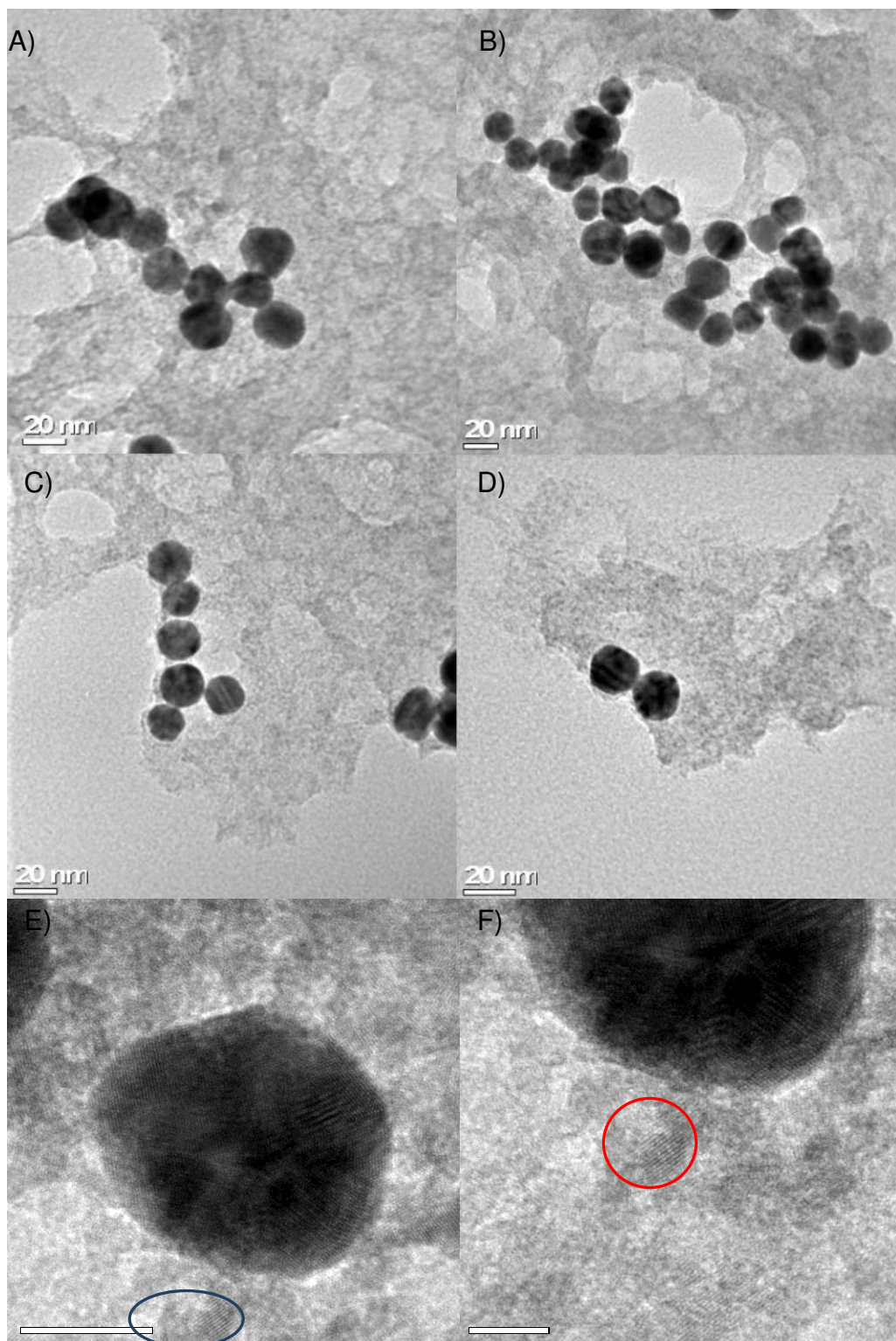


Figura 2.16: Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão do hidróxido de níquel com nanopartículas de ouro em diferentes regiões da amostra. E e F com maior resolução para a observação dos planos cristalinos (111) e (200) da fase alfa do hidróxido de níquel, círculos azul e vermelho respectivamente.

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

Nas imagens de TEM obtidas para hidróxido de níquel com a inserção de nanopartículas de ouro, observa-se um material similar ao hidróxido de níquel puro formado por nanofolhas. O material se apresenta como um nanocompósito de hidróxido de níquel e nanopartículas de ouro. De modo geral, é um material uniforme, o hidróxido de níquel mantém a mesma morfologia apresentada de quando puro, onde as AuNPs estão sempre recobertas pelo hidróxido de níquel. Já as imagens e e f (Figura 5.11) foram obtidas com maior resolução e podem-se identificar alguns planos cristalinos do ouro e do hidróxido de níquel (círculos na imagem). Apesar do hidróxido de níquel obtido ser pouco cristalino, como também observado nos difratogramas, os planos (111) e (200) da fase alfa (círculos vermelho e azul respectivamente) puderam ser identificados a partir da distância média entre eles. Observa-se nas imagens de maior resolução que o hidróxido de níquel está em contato com as nanopartículas, não há uma desconexão entre os dois materiais. Também foi obtido para uma estimativa do diâmetro do cristalito do hidróxido de níquel no novo material a partir das imagens de TEM. O histograma dessa análise está apresentado na Figura 2.18, onde observa-se uma pequena distribuição de tamanho (1,6 a 2,1 nm, n= 66) com valor médio do diâmetro de 1,9 nm. O diâmetro observado para o hidróxido de níquel na presença de nanopartículas de ouro é ainda menor que o observado para o hidróxido de níquel puro. Fato que pode ser atribuído à inserção destas no meio reacional antes da precipitação do hidróxido de níquel. A presença das nanopartículas de ouro pode favorecer a nucleação das nanopartículas de níquel ao invés do crescimento das mesmas.

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

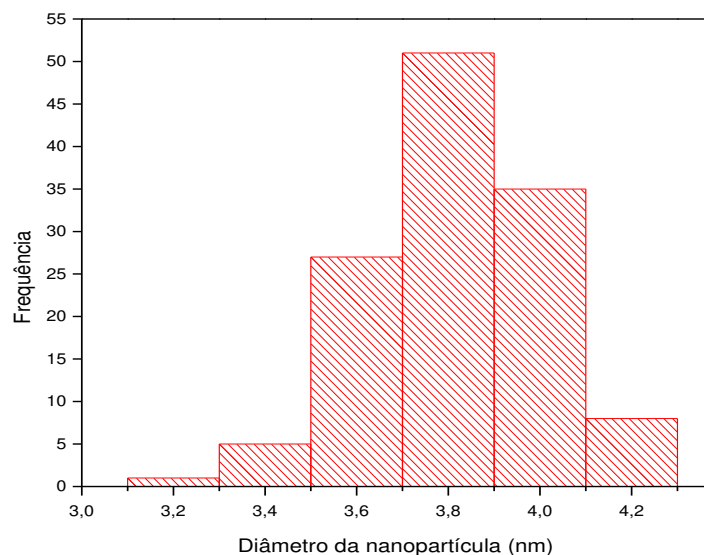


Figura 2.17: Histograma do diâmetro da partícula obtido a partir de imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão do hidróxido de níquel puro.

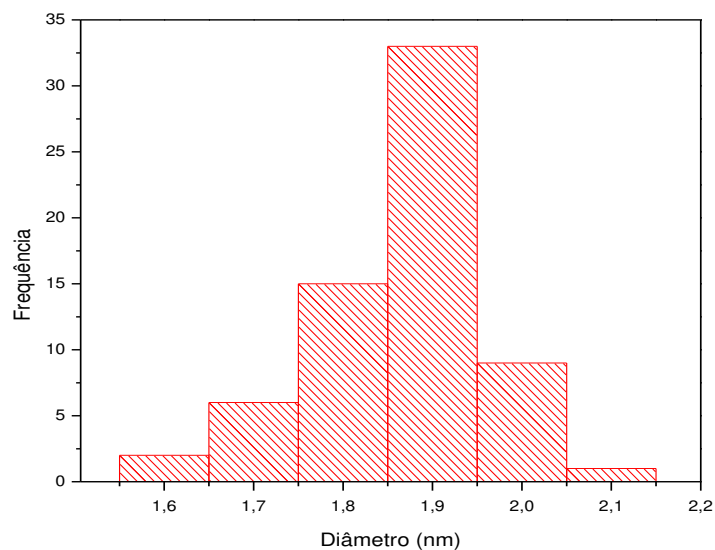


Figura 2.18: Histograma do diâmetro da partícula de hidróxido de níquel obtido a partir de imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão para o material de hidróxido de níquel com nanopartículas de ouro.

Com o objetivo de identificar o novo material, foi utilizado um recurso simples mas esclarecedor. Calculou-se o volume de hidróxido de níquel e o volume de

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

nanopartículas de ouro em uma amostra desse novo material. A partir da concentração e da densidade da fase alfa-hidróxido de níquel hidratada, obteve-se o valor aproximado de 0,007 mm³ para o hidróxido de níquel no novo material. No entanto, o volume calculado de nanopartículas de ouro é de 2 mm³, aproximadamente trezentas vezes maior que o de hidróxido de níquel. Este resultado traz o raciocínio de que apesar das imagens de TEM sugerirem que as nanopartículas de ouro estão inseridas em uma matriz de níquel, o material obtido é o oposto. O nanocompósito se apresenta como uma matriz de nanopartículas de ouro com hidróxido de níquel recobrando-a na superfície.

2.4.4. Caracterização eletroquímica e estabilidade

Após a caracterização morfológica dos materiais sintetizados, o sensor eletroquímico foi otimizado quanto à sua modificação e ao pH do eletrólito suporte. Esses dois parâmetros são determinantes para a performance de um sensor. Os sensores de hidróxido de níquel puro e do novo material NP6 são preparados a partir da deposição da suspensão aquosa dos respectivos materiais. Uma alíquota de 2 μ L da suspensão aquosa com concentração de 1,8 mmol/L de hidróxido de níquel é depositada na superfície limpa do eletrodo de carbono vítreo. A etapa de modificação é muito importante para o melhor funcionamento do sensor, onde deve-se alcançar o recobrimento ideal do eletrodo, uma vez que a deposição de pouco material, pode causar um desempenho aquém, além de facilitar a lixiviação do filme da superfície. Mas por outro lado, um filme muito espesso dificultaria o transporte de elétrons já que o hidróxido de níquel não é um bom condutor, com condutividade próxima a $10^{-5} \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$ quando hidratados. Nesse sentido procurou-se observar a melhor relação da corrente e estabilidade do eletrodo com o número de adições da alíquota de 2 μ L. A Figura 2.19 apresenta no gráfico de barras a relação entre a corrente de pico após 50 ciclos voltamétricos versus o número de deposição de alíquotas.

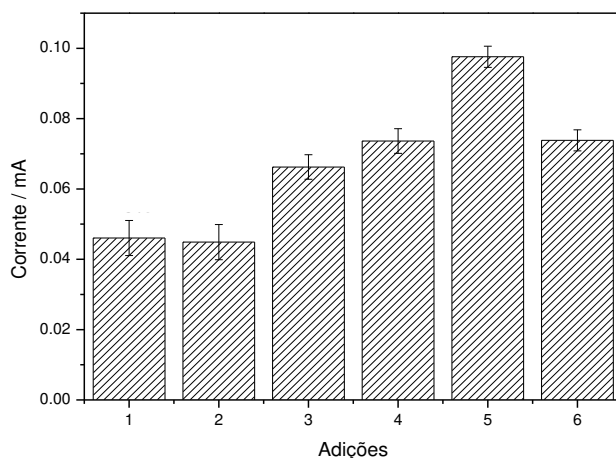


Figura 2.19: Gráfico da corrente pelo número de adições de 2 μ L da dispersão para a otimização da modificação do eletrodo. As porcentagens correspondem à corrente de pico após 50 ciclos em relação à corrente inicial.

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

O estudo de otimização resultou que o melhor recobrimento do eletrodo é obtido quando a modificação é feita com 5 deposições de 2 μ L sobre a superfície do eletrodo. O sensor preparado a partir desta modificação, apresentou grande estabilidade, permanecendo com 94% da corrente de pico inicial após 50 ciclos. O recobrimento do eletrodo pôde ser calculado a partir da seguinte equação:

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA} \quad (\text{Equação 5.3})$$

Onde, Q é a carga do pico anódico, n é o número de elétrons da reação de oxidação, F é a constante de Faraday e A a área geométrica do eletrodo. Para o eletrodo modificado com a otimização do recobrimento descrita, o recobrimento obtido foi $\Gamma = 2,11 \times 10^{-8} \text{ mol.cm}^{-2}$. A Figura 2.20 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos para no experimento de otimização do recobrimento para o eletrodo modificado com 5 deposições da suspensão.

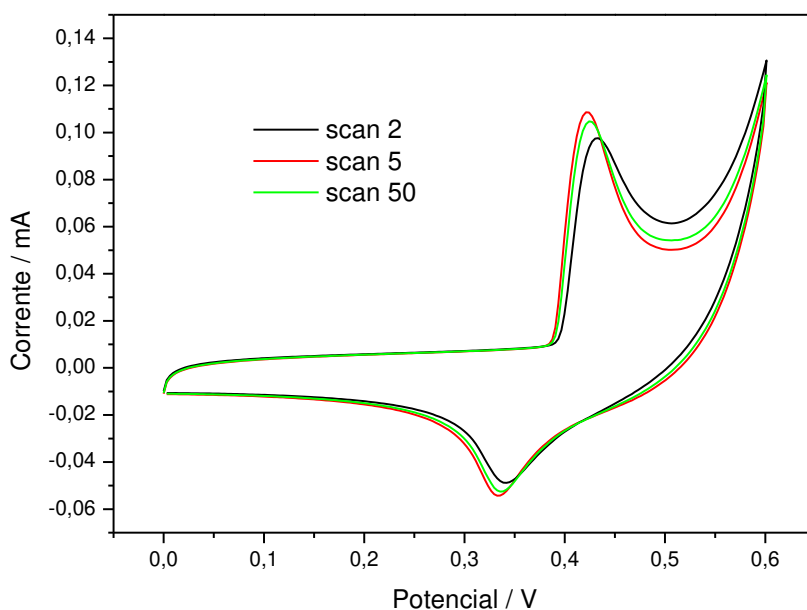


Figura 2.20: Voltamogramas cíclicos do eletrodo com o nanocompósito nas condições otimizadas de modificação; 2º ciclo (—), 5º ciclo (—) e 50º ciclo (—).

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

Observa-se um significativo aumento da estabilidade do eletrodo modificado após a otimização da deposição. Antes deste estudo, o nanocompósito alcançava sua estabilidade apenas no 20º ciclo e agora no 5º ciclo. Ainda mais, a diferença entre as correntes de pico é de apenas 6 % entre o 5º e o 50º ciclo.

Os potenciais de pico de oxidação/redução do nanocompósito apresentam-se em valores menos positivos (0,41/0,33V respectivamente) que para o hidróxido de níquel puro (0,45/0,37V). Este efeito é observado também na dopagem do hidróxido de níquel com íons de cobalto. Sugere-se que o mecanismo por trás dessa observação seja o mesmo. O aumento da condutividade do filme modificador diminui os potenciais dos processos.

A partir da otimização da modificação, o eletrodo foi caracterizado eletroquimicamente para que alguns parâmetros possam ser avaliados a fim de se obter um melhor entendimento das propriedades do filme. A constante de transferência de carga, k_s , pode ser obtida por vários métodos como o método de Laviron, Tafel, Koutech-Levich, Espectroscopia de Impedância Eletroquímica ou por micropolarização (Bard & Faulkner, 2001). O método de Laviron, sendo o mais simples experimentalmente, foi realizado com o intuito de obter o k_s . A velocidade de varredura de ciclos voltamétricos foi variada para o eletrodo modificado com o nanocompósito, Figura 2.21.

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

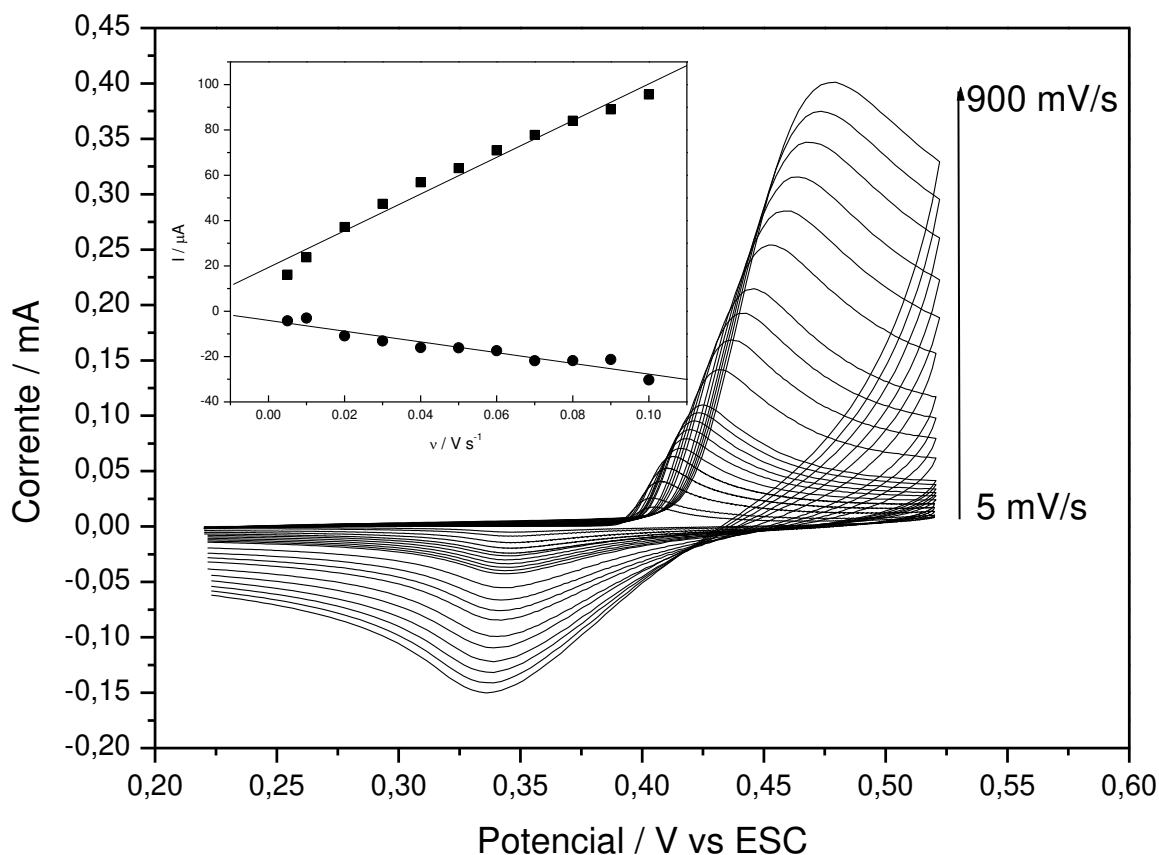


Figura 2.21: Voltamogramas cíclicos do eletrodo nanocompósito em diferentes velocidades de varredura (5 a 900 mV/s). Inset: Gráfico da corrente de pico versus a velocidade de varredura.

A análise dos dados é feita pela relação da corrente de pico com a velocidade de varredura, *inset* da Figura 2.21. Os voltamogramas obtidos mostram um aumento da corrente de pico e um deslocamento dos potenciais de oxidação e redução com o aumento da velocidade. Para este eletrodo modificado, o pico de oxidação desloca-se de forma significativa com o aumento da velocidade. No entanto, o pico de redução apresenta deslocamentos discretos. O potencial formal é quase independente da velocidade de varredura indicando uma transferência de carga rápida, e por isso, a condição de uma separação de picos de no mínimo $200 \text{ mV}/n$ (n = número de elétrons) não é atingida, impedindo a sua aplicação para a obtenção da constante. O comportamento linear observado no gráfico inserido

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

(Figura 2.21) é característica de espécies confinadas na superfície do eletrodo. Os métodos de Tafel e de Kouteck-Levich também foram aplicados para o sistema, mas também não foi possível a determinação da constante.

Como alternativa para avaliar o processo de transferência de carga no eletrodo, foram realizados experimentos de impedância aplicando um potencial de 0,40 V com 5 mV de amplitude da perturbação, para monitorar o processo de oxidação do hidróxido de níquel (Figura 2.22).

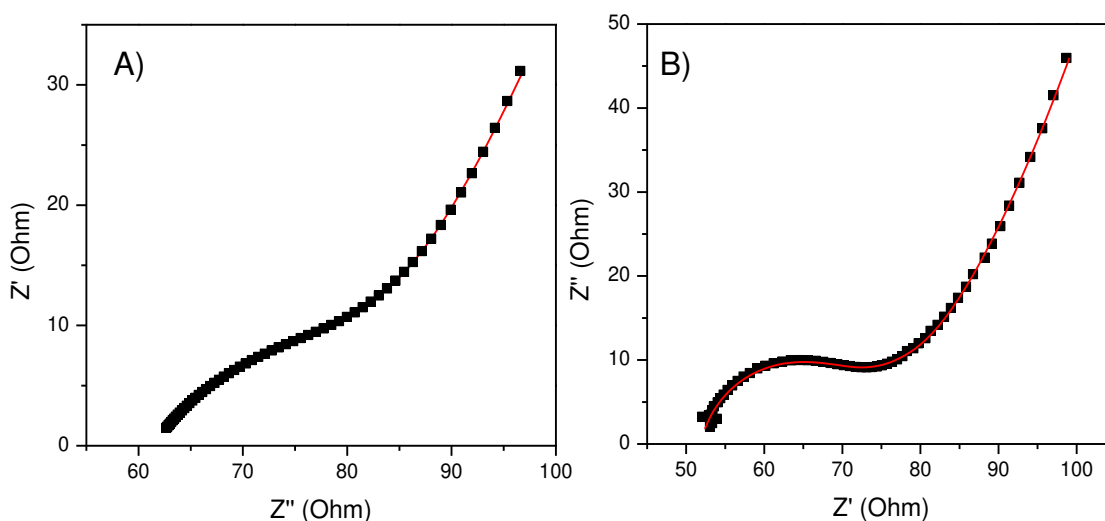


Figura 2.22: Gráficos de Nyquist dos experimentos impedimétricos com os eletrodos modificados com hidróxido de níquel puro a) e nanocompósito b).

Tanto o eletrodo preparado com hidróxido de níquel puro quanto o eletrodo modificado com o nanocompósito de ouro apresentaram perfis impedimétricos semelhantes. A faixa de frequência investigada foi de 100000 até 0,01Hz. No entanto, pode-se restringir o gráfico de Nyquist até 20Hz pois não ocorre nenhum evento adicional abaixo dessa frequência. Em ambos os gráficos de Nyquist observa-se um semicírculo no início seguido de uma reta com inclinação entre 45°, tendendo a 90°. Os dados impedimétricos foram ajustados para um circuito equivalente que está representado pela Figura 2.23.

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

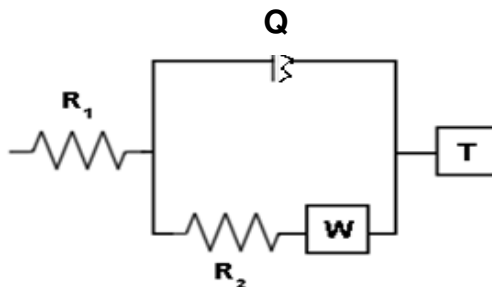


Figura 2.23: Representação do circuito equivalente resultante do ajuste dos experimentos impedimétricos.

Na figura 2.23, R_1 corresponde à resistência da solução, do sistema como um todo, distância entre os eletrodos e do eletrólito. Em seguida, o circuito se abre, e em paralelo estão Q e R_2 em série com W . Q representa o pseudocapacitor formada pela dupla camada elétrica na superfície do eletrodo (CPE, componente de fase constante). Já a segunda resistência, R_2 , corresponde à dificuldade/facilidade de transferência de carga entre o material modificador e o eletrodo de carbono vítreo. W (Warburg) e T (tangente hiperbólica) são elementos que se complementam para ajustar o evento difusional (reta no Gráfico de Nyquist). O evento de difusão apresentado pelos dois filmes possuem contribuições de uma difusão semifinita, representada por W , e difusão limitada representada por T . A primeira corresponde à difusão do eletrólito do bulk até a superfície do eletrodo. Já a segunda, sugere-se que corresponde à difusão entre compartimentos confinados, como poros ou lamelas. O valor de R_2 corresponde, no gráfico de Nyquist, ao diâmetro do semicírculo, que pelo ajuste obteve-se: $25,4 \pm 0,8$ e $19,5 \pm 0,7 \Omega$ para o hidróxido de níquel e para o nanocompósito respectivamente. Os baixos valores de R_2 obtidos mostram que a transferência de carga é fácil para o processo de oxidação do hidróxido de níquel, mesmo apesar da sua baixa capacidade condutora. Possivelmente, a nanoestruturação colabora com a boa transferência de carga observada nos dois materiais. A diferença entre os valores de R_2 do hidróxido de níquel puro e do nanocompósito pode ser atribuída à inserção das nanopartículas de ouro que melhoraram a condutância do material. Também se pode concluir que o pequeno valor de resistência na troca de carga entre o filme e

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

o eletrodo sugere que os filmes estão bem aderidos à superfície do eletrodo, facilitando assim a transferência de carga.

Este fenômeno é de grande importância ao se estudar o hidróxido de níquel já que as reações de oxidação e redução do material incluem a difusão de um próton (ver Eq. 2.1). Portanto, uma vez que a transferência de carga é rápida, a velocidade da reação é controlada pela transferência de prótons que são liberados e difundem para o eletrólito onde reagem com íons OH⁻ do meio e formam moléculas de água. O mesmo raciocínio é válido para a redução onde as vacâncias geradas na oxidação serão preenchidas com a redução do material e difusão de um próton para o interior da estrutura cristalina. Admite-se, portanto, que o balanço de carga é mantido no cristal todo o tempo. A influência do pH sobre a reação de oxidação e redução do hidróxido de níquel foi estudada na faixa entre 12 a 14 e está representada na Figura 2.24.

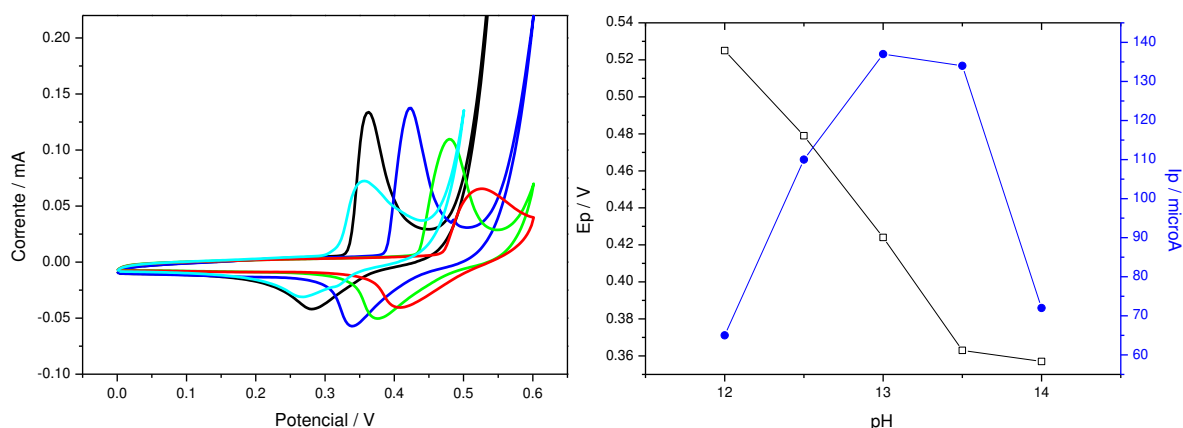


Figura 2.24: a) Voltamogramas cíclicos do eletrodo com o nanocompósito em diferentes valores de pH do eletrólito suporte, KOH/KCl, $v = 10 \text{ mV/s}$, pH 12 (—), 12,5 (—); 13 (—); 13,5 (—) e 14 (—). b) Relação do potencial de pico (dir.) e da corrente de pico anódica (esq.) com o pH do eletrólito suporte.

A Figura 2.24 a) apresenta os voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado com o nanocompósito (NP 6) em diferentes pHs. A Figura 2.24 b) mostra a influência do pH sobre o potencial de oxidação e sobre a corrente de pico anódica. Observa-se nos ciclos voltamétricos que os processos eletroquímicos

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

envolvidos na oxidação são fortemente influenciados pela concentração de OH⁻ do meio. Com o aumento da concentração de íons OH⁻ no meio, o potencial desloca-se para valores menos positivos e a corrente de pico aumenta até atingir um máximo em pH 13,5. Contudo, sabe-se que altas concentrações OH⁻ aceleram o processo de transformação do α -Ni(OH)₂ para β -Ni(OH)₂. É possível notar ainda um segundo pico de redução correspondente à fase β no voltamograma em pH 14, em apenas um ciclo. Além disso, uma grande diminuição da capacidade de carga do material foi atribuída a essa transformação. Apesar de no pH 13,5 a oxidação ocorrer em um valor menor de potencial que em pH 13, é neste último valor de pH que o processo se apresenta mais reversível (maior equivalência entre correntes de oxidação e redução) e portanto um sistema mais estável. A relação entre potencial de oxidação e pH é linear dentro da faixa de 12 a 13,5, e o coeficiente angular da reta correspondente foi igual a -108mV/pH, o que sugere que o processo de oxidação/redução do nanocompósito envolve duas vezes mais prótons do que elétrons, aproximadamente.

2.4.5. Eletrocatalise da glicose

As propriedades eletrocatalíticas do hidróxido de níquel são bem conhecidas para diversas moléculas, carboidratos, álcoois, ureia, aminoácidos e outros. No entanto, sua aplicabilidade é limitada devido à instabilidade da fase alfa. A caracterização do novo material mostrou que houve um melhoramento da estabilidade do processo de oxidação/redução do hidróxido de níquel a partir da inserção das nanopartículas de ouro. Por isso, o comportamento do nanocompósito deve ser avaliado quanto à sua aplicação. Para uma avaliação das propriedades eletrocatalíticas deste material, a oxidação da glicose foi o objeto deste estudo que foi realizado em conjunto com o hidróxido de níquel puro para comparação.

A eletrocatalise da glicose pode ocorrer em eletrodos de metais nobres como ouro ou platina (. No entanto, técnicas mais sofisticadas tem de ser usadas para a limpeza dos produtos de oxidação adsorvidos na superfície. Eletrodos de carbono vítreo (GCE) não possuem efeito eletrocatalítico para a glicose, contudo, o GCE é uma boa plataforma para modificações de sua superfície. A Figura 2.25

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

apresenta os voltamogramas cíclicos em eletrólito suporte de KOH 0,1 mol/L obtidos com eletrodo de carbono vítreo limpo na presença de 10 ppm de glicose (azul), o eletrodo modificado com o material de hidróxido de níquel com nanopartículas de ouro otimizado na ausência (preto) e na presença de 10 ppm de glicose (vermelho). Observa-se que com o carbono vítreo não há eletrocatalise do açúcar no eletrodo (azul). Ao modificar o eletrodo com o filme, observam-se os picos característicos do α -Ni(OH)₂ (preto) e um aumento da corrente de pico de oxidação e diminuição na de redução na presença do carboidrato (vermelho), indicando a ocorrência de eletrocatalise promovida pelo filme modificador.

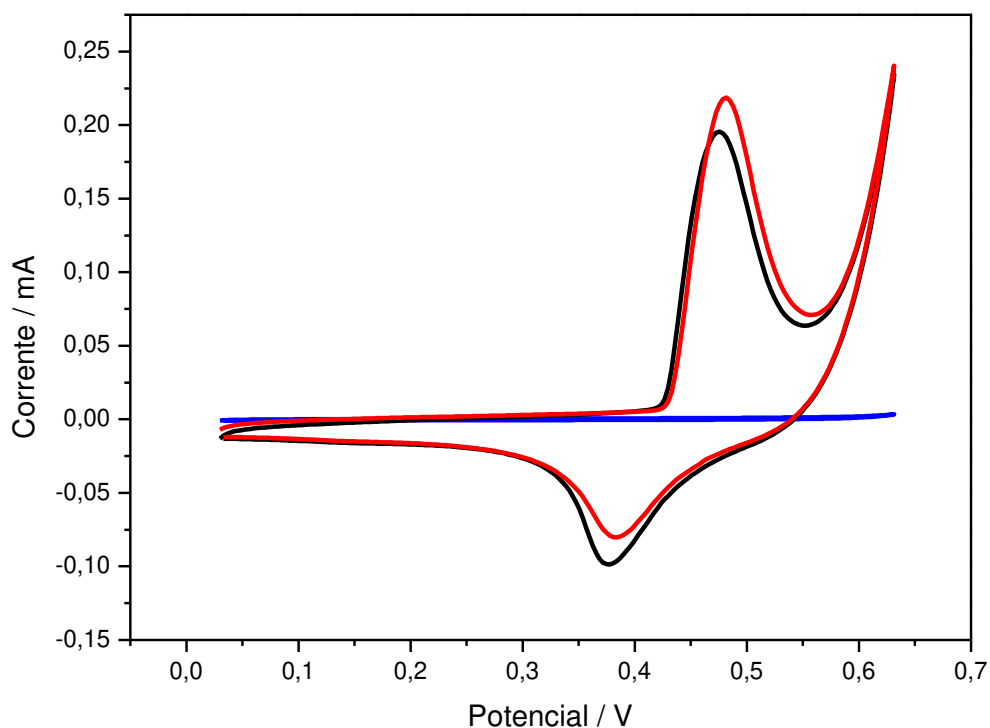


Figura 2.25: Voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono vítreo limpo (—) e do eletrodo modificado com o nanocompósito (—) em eletrólito suporte 0,1 KOH/KCl na presença de 100 ppm de glicose e eletrodo modificado com o nanocompósito em eletrólito suporte na ausência de glicose (—), $v = 10 \text{ mV/s}$.

Estudos mais detalhados sobre o processo de oxidação da glicose sobre os eletrodos modificados com hidróxido de níquel e com o nanocompósito foram realizados por voltametria cíclica. A corrente de pico proveniente da eletrocatalise da glicose depende da velocidade de varredura, de acordo com a Equação 2.4:

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

$$I_p = 0,496FACD_0^{1/2} \left(\frac{Fv}{RT} \right)^{1/2} \quad (\text{Equação 2.4})$$

Onde, I_p é a corrente de pico, C é a concentração da glicose, F é a constante de Faraday, A é a área do eletrodo, R é constante universal dos gases, T é a temperatura e D_0 é o coeficiente de difusão da glicose. Para este estudo, a velocidade de varredura foi variada de 5 a 50 mV/s na presença de glicose (100 ppm) como apresentados nas Figuras 2.26 e 2.27 para os eletrodos modificados com hidróxido de níquel puro e com o nanocompósito respectivamente

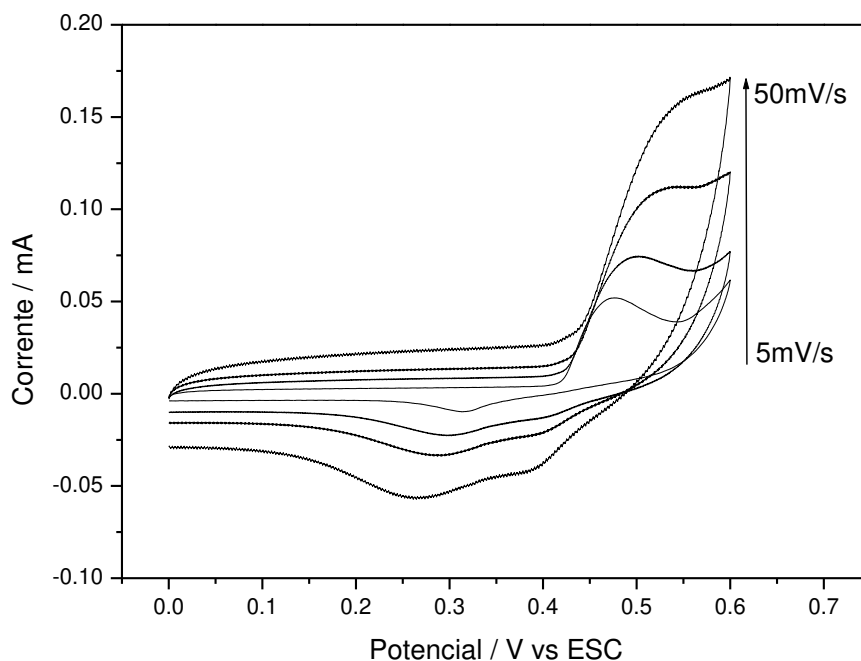


Figura 2.26: Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado com hidróxido de níquel puro em eletrólito suporte 0,1 KOH/KCl na presença de 100 ppm de glicose em diferentes velocidades de varredura (5-50 mV/s).

Para este estudo, a velocidade de varredura foi variada de 5 a 50 mV/s na presença de 100ppm de glicose como apresentados nas Figuras 2.26 e 2.27 para os eletrodos modificados com Ni(OH)₂ e com o nanocompósito respectivamente.

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

Observa-se em ambos os gráficos, uma aumento da corrente de pico com o aumento da velocidade de varredura.

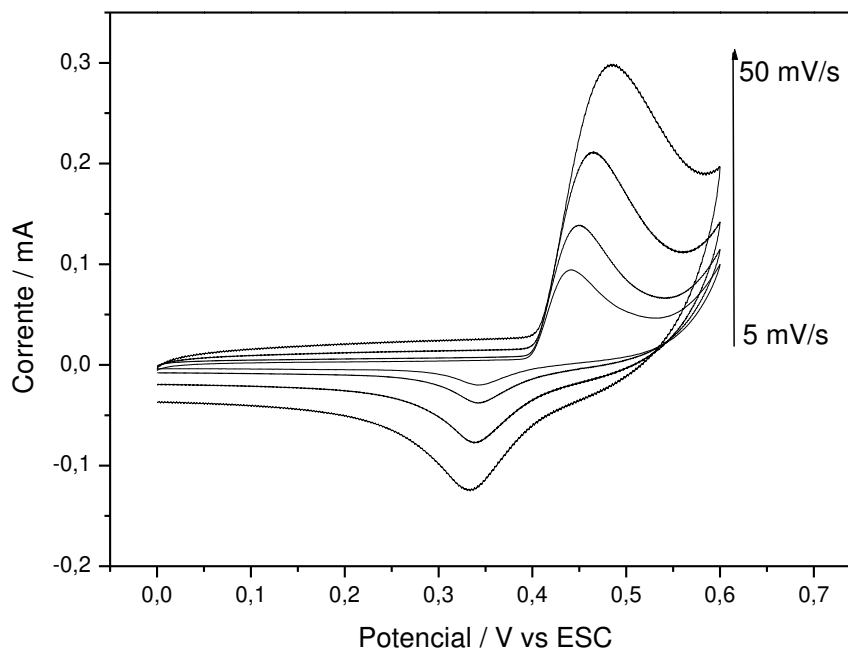


Figura 2.27: Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado com nanocompósito em eletrólito suporte 0,1 KOH/KCl na presença de 100 ppm de glicose em diferentes velocidades de varredura (5-50 mV/s).

Observa-se em ambos os gráficos, um aumento da corrente de pico com o aumento da velocidade de varredura. Para análise desses dados, a corrente de pico foi relacionada com a raiz quadrada da velocidade de varredura, Figura 2.28 e 2.29 para os eletrodos modificados com hidróxido de níquel puro e com hidróxido de níquel com nanopartículas de ouro respectivamente.

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

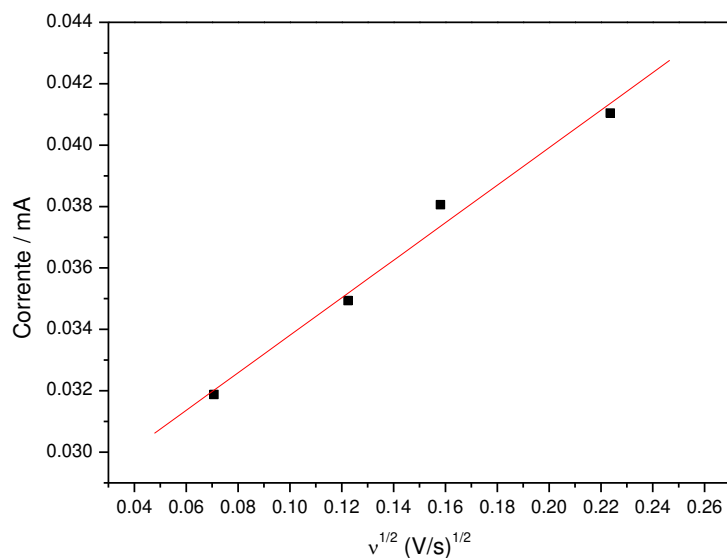


Figura 2.28: Corrente de pico anódica versus o quadrado da velocidade de varredura para o eletrodo modificado com hidróxido de níquel puro.

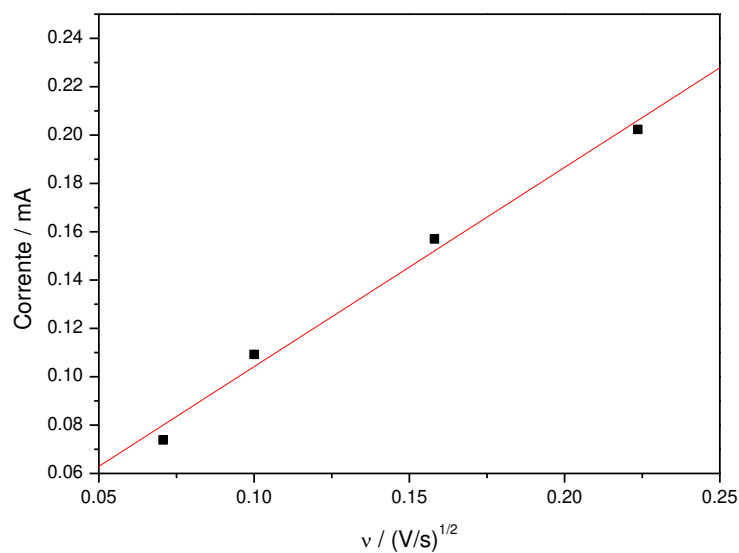


Figura 2.29: Corrente de pico anódica versus o quadrado da velocidade de varredura para o eletrodo modificado com nanocompósito.

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

A relação linear obtida entre a corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura indica que os processos de ambos sensores são controlados pela difusão da glicose. A transferência de carga no eletrodo é mais rápida que o transporte de massa para os dois sistemas. Também foi possível construir uma relação entre a corrente de pico normalizada pela raiz quadrada da velocidade de varredura pela raiz quadrada da velocidade de varredura ($I_p/v^{1/2}$ versus $v^{1/2}$), Figura 2.30. Foi observado para os dois eletrodos modificados um comportamento típico de um processo eletroquímico catalítico (EC') (Bard & Faulkner, 2001). O decaimento exponencial observado indica que a corrente catalítica é afetada pela amostragem de tempo através da variação da velocidade de varredura.

Observa-se que a curva para o nanocompósito (vermelha) tem um decaimento menor que a curva do hidróxido de níquel puro, apesar dos dois materiais oxidarem a glicose por meio de um processo catalítico. Provavelmente, a catálise da glicose pelo hidróxido de níquel na superfície das nanopartículas de ouro é mais rápida que para o hidróxido de níquel puro.

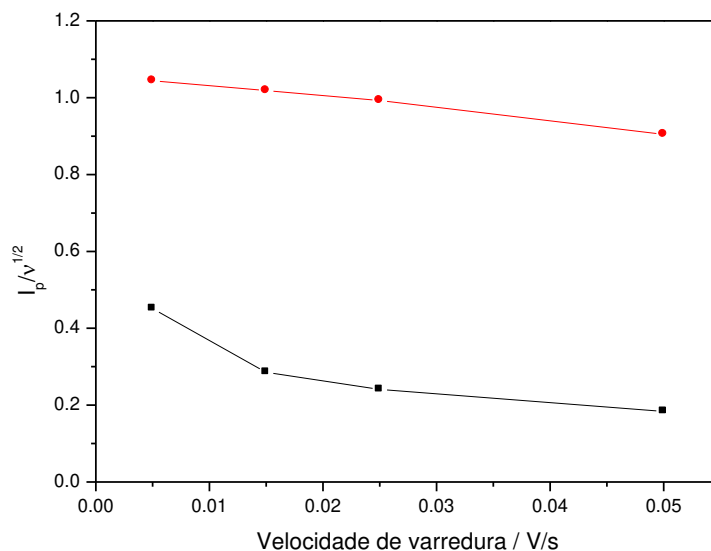


Figura 2.30: Corrente de pico anódica normalizada pela raiz quadrada da velocidade de varredura versus a velocidade de varredura para o eletrodo modificado com hidróxido de níquel (—) e para o nanocompósito (—).

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

Experimentos cronoamperométricos foram realizados com o objetivo de obter a constante da velocidade da eletrocatalise da glicose sobre os eletrodos. A cronoamperometria de duplo salto de potencial foi a técnica empregada para essa investigação. A presença de diferentes concentrações de glicose resulta em uma diferença entre as correntes anódicas, como apresentados nas Figuras 2.31 e 2.32 para o Ni(OH)₂ e para o nanocompósito respectivamente. O método descrito por Galus permite a obtenção da constante de velocidade k_{obs} para uma reação eletrocatalítica através da Equação 5.5. a seguir:

$$\frac{I_{cat}}{I_L} = \pi^{\frac{1}{2}} (k_{obs} C t)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Equação 2.5})$$

Onde I_{cat}/I_L é a razão entre a corrente em uma dada concentração de glicose e a corrente na ausência do analito, ou seja somente em eletrólito suporte. k_{obs} é a constante de velocidade catalítica, C é a concentração do analito e t é o tempo.

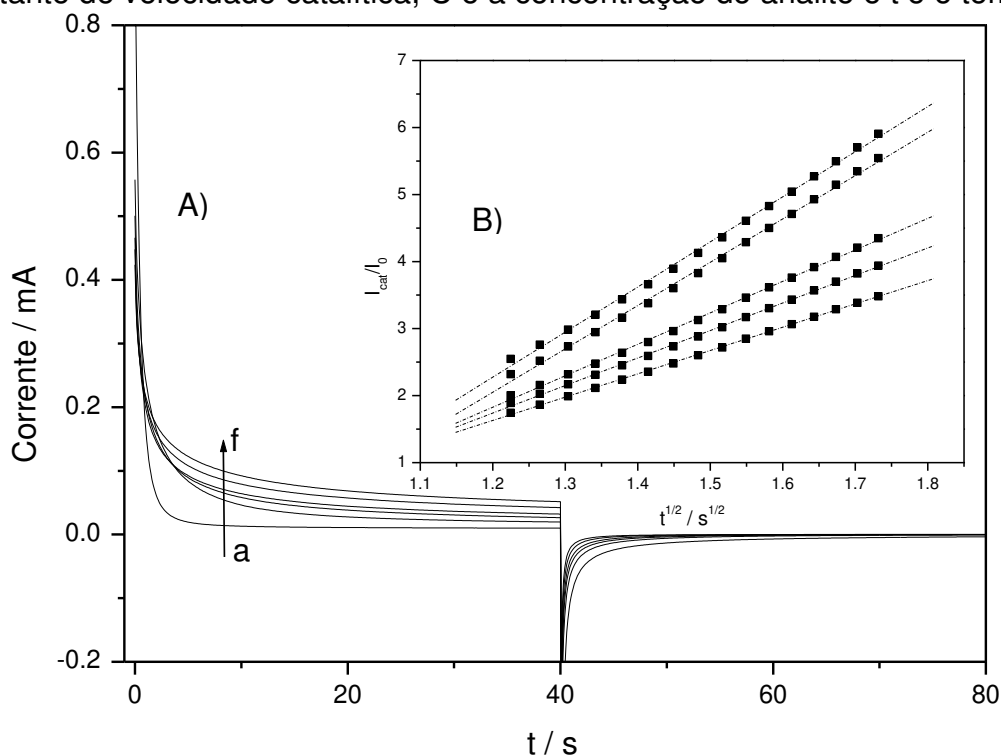


Figura 2.31: (A) Cronoamperogramas do eletrodo modificado com hidróxido de níquel puro na ausência (a) e na presença de 0,75 (b); 1,0 (c); 1,5 (d); 2,0 (e); 4,0 mmol/L de glicose(f) em eletrólito suporte 0,1 KOH/KCl. (B) Dependência de I_{cat}/I_0 vs $t^{1/2}$ derivado dos cronoamperogramas.

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

Diversos trabalhos na literatura reportam catálise da glicose por eletrodos modificados com hidróxido de níquel ou outros materiais similares. Na Tabela 2.2 encontram-se alguns desses trabalhos que obtiveram o valor de k_{obs} . Também estão apresentados os valores de k_{obs} encontrados neste trabalho para o hidróxido de níquel puro e para o hidróxido de níquel com nanopartículas de ouro. Observa-se que os materiais nanoestruturados levam vantagem ao aumentar a velocidade de catálise quando comparados com α -Ni(OH)₂ não-nanoestruturado. A melhora do processo pode ser atribuída ao aumento de sítios ativos devido à maior área superficial promovida pela nanoestruturação. (Vidotti *et al.* 2009a) obteve uma constante de $0,5 \cdot 10^{-7} \text{ L.mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, enquanto que neste trabalho a constante obtida foi de $3 \cdot 10^3 \text{ L.mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Consegue-se um aumento de seis ordens de grandeza no valor de k_{obs} ao produzir materiais nanoestruturados e depois depositá-los no eletrodo.

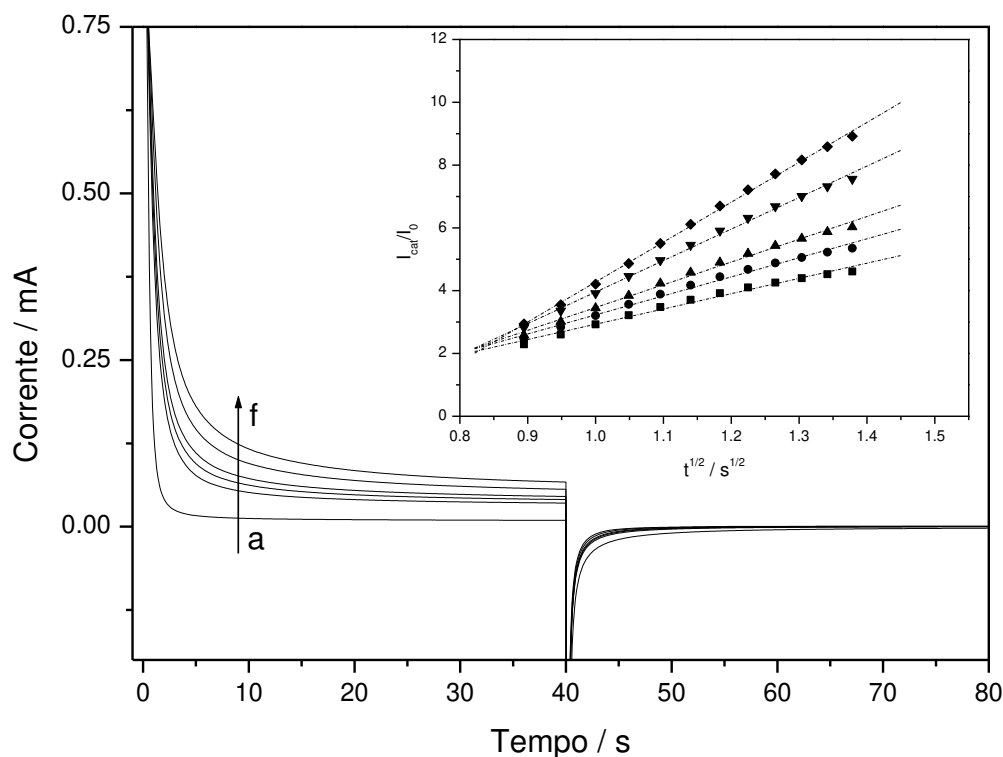


Figura 2.32: (A) Cronoamperogramas do eletrodo modificado com nanocompósito na ausência (a) e na presença de 0,75 (b); 1,0 (c); 1,5 (d); 2,0 (e); 4,0 mmol/L de glicose(f) em eletrólito suporte 0,1 KOH/KCl. (B) Dependência de I_{cat}/I_0 vs $t^{1/2}$ derivado dos cronoamperogramas.

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

O valor de k_{obs} obtido para o novo material de hidróxido de níquel com nanopartícula de ouro foi igual a $21 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ou seja um valor sete vezes maior que o hidróxido de níquel puro, sem as nanopartículas de ouro. Na literatura não foram encontrados valores de k_{obs} maiores do que o alcançado pelo nanocompósito (Tabela 2.2). Este aumento na velocidade da catálise é devido à inserção das nanopartículas de ouro na matriz do hidróxido de níquel. Sugere-se que esse aumento observado para o k_{obs} do novo material é devido a um melhor transporte de elétrons pelo filme com a inserção das nanopartículas de ouro e pela fino recobrimento do hidróxido de níquel na superfície das AuNPs.

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

Tabela 2.2. Comparação de estudos da literatura entre materiais, potencial, contante catalítica e faixa estudada com este trabalho.

Referência	Material	Potencial (mV)	k_{obs} (L.mol ⁻¹ .s ⁻¹)	Faixa
(Danaee <i>et al.</i> 2012)	Ni/Ni(OH) ₂	560/320	$5,4 \times 10^2$	1-9 mM
(Elahi <i>et al.</i> 2007)	Ni(curcumin)	700/350	$6,5 \times 10^3$	1 μ M -10 mM
(Ojani <i>et al.</i> 2008)	Ni/Poly(o-aminophenol)	600/400	$1,8 \times 10^3$	0,9 – 2,7 mM
(Jafarian <i>et al.</i> 2009)	Ni/Cu	560/320	$5,8 \times 10^2$	1-9 mM
(Yi <i>et al.</i> 2008)	Ni/Ti	500/250	$1,67 \times 10^3$	1,2 μ M –10 mM
(Karim-Nezhad <i>et al.</i> 2009)	Co(OH) ₂	560/230	$2,64 \times 10^1$	0,8 – 50 mM
(Vidotti <i>et al.</i> 2009a)	Ni(OH) ₂ eletrodepositado	450	$0,5 \times 10^{-7}$	0,2 – 2 mM
Este trabalho	α -Ni(OH) ₂ puro	536/245	3×10^3	0,75 – 4mM
Este trabalho	α -Ni(OH) ₂ /AuNP	520/230	21×10^3	0,75 – 4mM

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

A estabilização da fase alfa do hidróxido de níquel através da inserção das nanopartículas de ouro resultou na estabilização da corrente em 98% do valor inicial em eletrólito suporte. Porém, o estudo de estabilização do novo material se completa com a investigação do comportamento de ambos materiais na presença de glicose. Os eletrodos modificados foram submetido a 50 ciclos voltamétricos consecutivos na presença de 100 ppm de glicose. O último ciclo de cada eletrodo está apresentado nas Figuras 2.33 e 2.34 para o hidróxido de níquel puro e para o hidróxido de níquel com nanopartículas de ouro respectivamente. Para o eletrodo modificado com o hidróxido de níquel puro foi observado já um deslocamento de 50mV do potencial de pico para valores mais positivos, o que indica a transformação da fase α para a fase β .

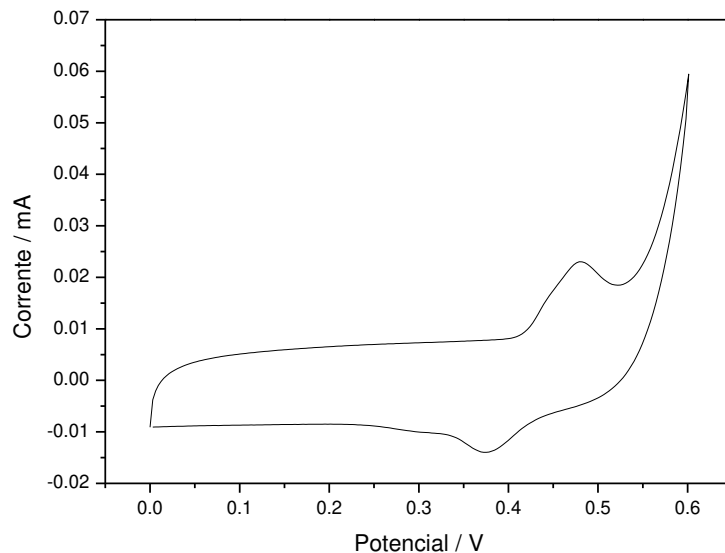


Figura 2.33. Voltamograma cíclico (50º) do eletrodo modificado com hidróxido de níquel puro após 50 ciclos consecutivos em eletrólito suporte 0,1M KOH/KCl na presença de 100 ppm de glicose.

Por sua vez, o nanocompósito mantém a corrente de pico bastante constante e sua estrutura alfa mesmo na presença de glicose e com o tratamento de 50 ciclos.

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

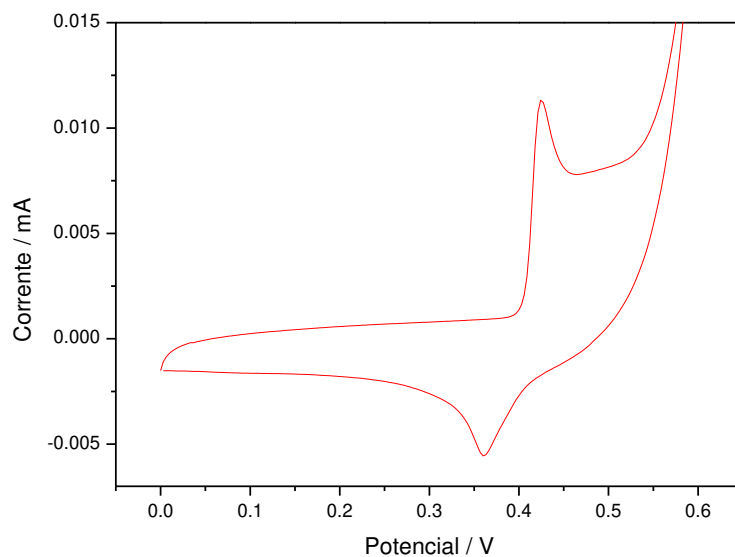


Figura 2.34: Voltamograma cíclico (50º) do eletrodo modificado com nanocompósito após 50 ciclos consecutivos em eletrólito suporte 0,1M KOH/KCl na presença de 100 ppm de glicose.

Na Figura 2.35 apresenta-se a porcentagem da corrente de pico após 50 ciclos em relação à corrente inicial em ao longo dos ciclos para os dois eletrodos modificados.

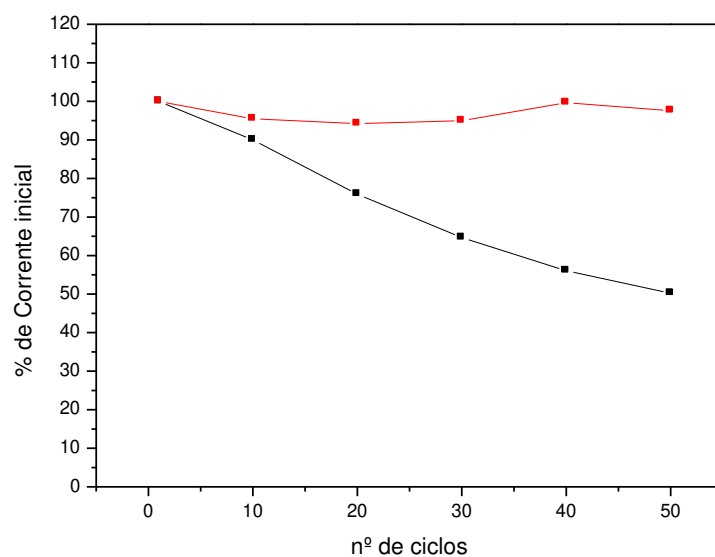


Figura 3.35: Porcentagens da corrente de pico anódica em relação à inicial após ciclagens consecutivas do eletrodo modificado com hidróxido de níquel puro (-) e modificado com nanopartículas de ouro (-) na presença de 100ppm de glicose.

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

Observa-se que enquanto no hidróxido de níquel a corrente diminui consideravelmente, chegando a aproximadamente 50% do valor inicial, a corrente de pico para o nanocompósito permanece praticamente inalterada. Isso mostra a alta estabilidade do hidróxido de níquel com nanopartículas de ouro mesmo em experimentos exaustivos na presença do analito, o que indica sua aplicação em análises consecutivas.

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

2.4.6. Curva analítica e determinação de glicose

Uma das vantagens do hidróxido de níquel quanto à oxidação de carboidratos e quando comparado a eletrodos de metais nobres, é a utilização de técnicas eletroquímicas mais simples. Por isso, o eletrodo modificado com nanocompósito foi utilizado na construção de uma curva analítica para determinação de glicose por cronoamperometria. Cada adição de glicose promove um aumento da corrente anódica correspondente à catálise, foram estudadas concentrações de 0,5 a 150 $\mu\text{g/mL}$.

Uma vez que hidróxido de níquel puro é muito instável, não foi possível obter medidas de determinação da glicose reproduzíveis e confiáveis. Portanto, apresenta-se Figura 2.36 a curva analítica resultante desse estudo.

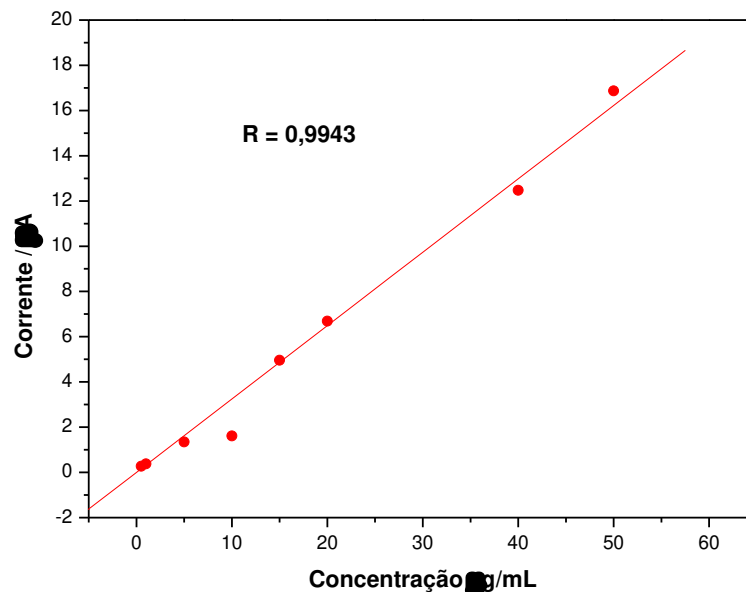


Figura 2.36: Curvas analíticas obtidas a partir de cronoamperogramas para o hidróxido níquel modificado com nanopartículas de ouro o (•) em consecutivas adições de glicose, potencial aplicado de 0,41V

A faixa linear obtida para o nanocompósito e a equação de reta do ajuste dos dados se encontra abaixo:

α -Ni(OH)₂/AuNP:

$I / (\mu\text{A}) = 0,324 [\text{Glicose } (\mu\text{mol/L})]$

Faixa linear: 0,5 a 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Resultados e Discussão

As concentrações mais altas (100 e 150 $\mu\text{g/mL}$) não pertencem à região linear, sugerindo portanto uma saturação do sistema. A sensibilidade do eletrodo modificado com o nanocompósito é de 0,3 $\mu\text{A}/\mu\text{mol}$. O limite de detecção foi calculado como: $3\sigma/b$, sendo σ o desvio padrão do branco em $n = 8$ e b o coeficiente angular da curva. Os valores encontram-se na Tabela 5.3 que também contém alguns estudos da literatura.

Observa-se que a sensibilidade obtida para este trabalho é cerca de uma ou duas ordens de grandeza maior que os demais. Os trabalhos de (Kumary *et al.* 2013)) e (Qiao and Zheng 2012) obtiveram limites de detecção bem menores que o deste trabalho e de outros encontrados na literatura. Possivelmente, o grafeno, utilizado como plataforma do eletrodo em ambos, permita a determinação de glicose em uma faixa linear mais baixa. No entanto, a sensibilidade destes dispositivos com grafeno foi cerca de duas e três ordens de grandeza menor que o do α -Ni(OH)₂/AuNP. O trabalho publicado por (Vidotti *et al.* 2009a)), alcança um valor maior de sensibilidade, contribuição esta que pode ser atribuída para o acoplamento de técnicas que aumentam a sensibilidade como FIA e Cromatografia Líquida. Safavi *et al.* (2009) trabalharam com hidróxido de níquel nanoestruturado e obtiveram um limite de detecção similar ao deste trabalho, no entanto a sensibilidade aproximadamente duas ordens de grandeza menor que a deste trabalho. Uma vez que o efeito da nanoestruturação é controlada ao se comparar com o trabalho de Safavi, sugere-se que o aumento observado na sensibilidade seja consequência da inserção das nanopartículas de ouro. Esperava-se uma diminuição na sensibilidade do nanocompósito quando comparado com o hidróxido de níquel, já que o aumento da estabilidade do hidróxido de níquel dopado vem acompanhado de uma diminuição da capacidade de carga. No entanto, a formação do hidróxido de níquel com as nanopartículas de ouro manteve uma boa sensibilidade frente a eletrocatalise da glicose.

**Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para
aplicação em sensores – Resultados e Discussão**

Tabela 2.3. Comparação entre parâmetros da curva analítica para a detecção de glicose entre trabalhos da literatura e este estudo.

Referência	Material	Método	Faixa linear	Sensibilidade (A/mol.L ⁻¹)	LD (μmol/L)
(Kumary <i>et al.</i> 2013)	Grafeno-níquel/óxido de níquel	Voltametria cíclica	0,1 – 5 μmol/L	0,00341	0,28
(Safavi <i>et al.</i> 2009)	Nano-Ni(OH) ₂	Amperometria	0,05 – 23 mM	0,0051	6
(Qiao and Zheng 2012)	Nanocompósito Grafeno/Hidróxido de níquel	Amperometria	1-10μM	0,035	0,6
(Han <i>et al.</i> 2010)	Platina	Amperometria (Cromatografia)	0,001-0,1M	NI	0,24mM
(Huang 2009)	Monocamada de níquel sobre ouro nanoporoso	Cronoamperometria	0,001–10mM	5	NI
(Luo <i>et al.</i> 2012)	β-Ni(OH) ₂ nanofio/CNT	Cronoamperometria	0,02 –0,5 mM	0,060	5
(Luo <i>et al.</i> 2012)	β-Ni(OH) ₂ nanofolha/CNT	Cronoamperometria	0,02 – 1mM	0,017	10
(Vidotti <i>et al.</i> 2009a)	α-Ni(OH) ₂ Eletrodepositado	Amperometria (FIA)	0.5 – 50 ppm	0,979	3,4
Este trabalho	α-Ni(OH) ₂ /AuNP	Amperometria	0,5-50 μmol/L	0,324	6,5

2.5. Conclusões Parciais

Neste trabalho, o hidróxido de níquel em sua fase alfa foi sintetizado a partir de sua precipitação em uma dispersão alcoólica de nanopartículas de ouro. O grande desafio era obter α -Ni(OH)₂ nanoparticulado e que apresentasse uma maior estabilidade frente ao hidróxido de níquel puro. A estratégia traçada para alcançar esse objetivo é o uso de nanopartículas de ouro dispersas em uma matriz de hidróxido de níquel para que o aumento de condutividade do material proporcionado pela inserção da nanopartícula de ouro estabilizasse o processo de oxidação/redução do hidróxido de níquel.

A síntese desenvolvida para a obtenção do material de hidróxido de níquel com nanopartículas de ouro resultou:

- Em um material nanoparticulado que colabora com o processo de oxidação/redução pois facilita a difusão de íons pelo material.
- Na formação de um nanocompósito, onde as nanopartículas de ouro estão formam a matriz e o hidróxido de níquel recobre a superfície. Ainda mais, o hidróxido de níquel recobriu totalmente as nanopartículas de ouro, como foi comprovado pela combinação das observações voltamétricas, de espectroscopia de ultravioleta-visível e microscopia eletrônica de transmissão.

A modificação do eletrodo com a dispersão do nanocompósito possibilitou:

- Um sensor otimizado que mantém aproximadamente 94% da corrente inicial após 50 ciclos consecutivos tanto na ausência quanto na presença de glicose.

Modificação de eletrodos com nanopartículas α -Ni(OH)₂ e ouro para aplicação em sensores – Conclusões Parciais

- Um deslocamento dos potenciais de oxidação/redução, quando comparado com o hidróxido de níquel puro, que indica um aumento da condutividade do material. Fenômeno este atribuído à inserção das nanopartículas de ouro.

Quanto às propriedades eletrocatalíticas, o α -Ni(OH)₂/AuNP apresentou:

- Um grande aumento, cerca de seis ordens de grandeza no k_{obs} quando comparado ao hidróxido de níquel puro eletrodepositado. E sete vezes maior que o hidróxido de níquel puro obtido neste trabalho. Ainda mais, não foi encontrado nenhum trabalho da literatura com constante eletrocatalítica maior para a oxidação da glicose por materiais baseados em hidróxido ou óxido de níquel. Sabe-se que as nanopartículas de ouro no novo material não eletrocatalisam a glicose, portanto este efeito deve-se provavelmente ao aumento de condutividade.
- Detecção amperométrica da glicose foi aproximadamente igual entre o α -Ni(OH)₂/AuNP e os estudos da literatura. Os valores obtidos tanto para a sensibilidade quanto para o limite de detecção foram similares. Apesar de não ter sido observado um aumento da sensibilidade à carboidratos para o nanocompósito, sua capacidade de carga não foi diminuída como geralmente é observado para os materiais de hidróxido de níquel dopados.

**Emprego de nanopartículas
fluorescentes para o melhoramento
da detectabilidade de um sensor
*point-of-care.***

3.1. Introdução

3.1.1. Nanopartículas em biossensores

O número de estudos realizados no desenvolvimento de novos nanomateriais aumentou nos últimos anos devido as propriedades diferenciadas e a vasta possibilidade de aplicação que apresentam. Uma área de grande aplicação de nanomateriais é no desenvolvimento de sensores e biossensores (Anker *et al.* 2008; West and Halas 2003). Devido à grande razão entre superfície e volume (S/V), os nanomateriais geralmente apresentam alta atividade de reações na superfície, maior eficiência catalítica e grande capacidade de absorção. Essas propriedades de superfície dos nanomateriais conferem aos sensores maior sensibilidade e limites de detecção mais baixos. Sensores que se utilizam de nanomateriais permitem a detecção de analitos em concentrações muito baixas, na ordem de 10^{-9} até 10^{-18} g/mL (de la Rica *et al.* 2012; Linares *et al.* 2012). Isto é um fator determinante no tratamento de pacientes em que há pouco tempo para tomar medidas que possam ser decisivas, como em casos de infarto, câncer, dengue, malária e outros (.

Dentre os nanomateriais mais utilizados para o desenvolvimento de biossensores podem-se destacar os materiais de carbono (nanotubo e grafeno), nanopartículas de ouro, óxidos e poliméricas. Os materiais de carbono são muito utilizados em sensores eletroquímicos devido à sua alta condutividade, grande área superficial e baixo custo. Tanto os nanotubos quanto o grafeno podem ser funcionalizados a partir da oxidação dos mesmos. Grupos carboxílicos são facilmente formados na superfície e estes podem ser usados para formar ligações com biomoléculas, por exemplo.

As nanopartículas de ouro (AuNPs) são utilizadas em diferentes tipos de biossensores. A alta condutividade dessas nanopartículas justifica a aplicação em biossensores eletroquímicos pois facilita o transporte de elétrons em sistemas pouco condutores, devido a materiais poliméricos biomiméticos ou pela inserção de biomoléculas. (

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da

detectabilidade de um sensor *point-of-care*- Introdução

Outra propriedade muito explorada das AuNPs é a absorção de luz na região visível. Essa banda surge da oscilação coletiva dos elétrons da banda de condução e varia com o tamanho, forma e composição da nanopartícula. Muitos estudos na literatura utilizam o deslocamento do comprimento de onda dessa banda plásmon como sinal do biossensor. Há muitos sensores também que se baseiam na ressonância do plásmon de superfície (SPR). Um dos sinais analíticos monitorados é a mudança de ângulo de ressonância, onde esta é consequência da oscilação dos elétrons (Anker *et al.* 2008; Attridge *et al.* 1991; Dutra and Kubota 2007; Grieshaber *et al.* 2008).

A banda de absorção plasmônica das nanopartículas de ouro se encontra na região do visível (400 a 700 nm) o que justifica sua coloração vermelha. Muitos biossensores utilizam essa propriedade como sinal analítico. Esses métodos colorimétricos se baseiam no uso da AuNP como marcador quali/quantitativo de uma biomolécula. Tanto a intensidade da coloração pode ser usada como um método de quantificação do analito, como somente a presença ou ausência de cor (qualitativo) (Chin *et al.* 2007; Haeberle and Zengerle 2007). Biossensores qualitativos que se utilizam dessas nanopartículas de ouro também são muito encontrados pois somente a presença ou não do analito seria uma resposta suficiente. O dispositivo comercial de resposta qualitativa mais conhecido que se utiliza das nanopartículas de ouro é o teste de confirmação de gravidez que detecta a presença do hormônio hCG (gonadotrofina coriônica humana). A absorção de luz na região do visível é uma propriedade muito explorada em biossensores destinados ao uso de pessoas não treinadas, ou *point-of-care*, pois somente a identificação visual é suficiente para a leitura do resultado (Linares *et al.* 2012). Assim, permite o desenvolvimento de dispositivos mais práticos e que não necessitam de instrumentos complexos e dispendiosos para leitura. A Figura 3.1 ilustra um dispositivo LFIA (Imunoensaio de Fluxo Lateral) para a detecção de hCG. A cor vermelha das linhas é o sinal colorimétrico das nanopartículas de ouro do dispositivo.

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor *point-of-care*- Introdução

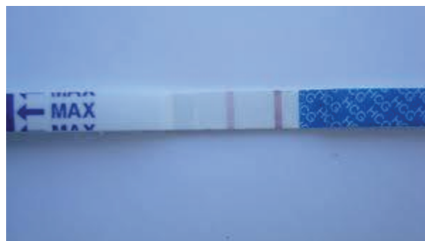


Figura 3.1: Dispositivo point-of-care para a detecção do hormônio hCG para confirmação de gravidez. As linhas vermelhas são sinais colorimétricos emitidos pelas nanopartículas de ouro.

Por todas as razões discutidas, nanopartículas de ouro são aplicadas em biossensores de diferentes métodos de detecção: colorimétrico, eletroquímico e óptico (Anker *et al.* 2008; Pingarron *et al.* 2008; Xie *et al.* 2012). O uso da AuNP não restringe o método de detecção, ao contrário, expande ainda mais suas possibilidades.

Nanopartículas poliméricas também são muito utilizadas como marcadores em biossensores. A grande vantagem dessas nanopartículas é a imobilização de cromóforos e fluoróforos em seu interior. A "capa" polimérica protege a molécula fluorescente de *quenching* e de interações não específicas, prolonga a atividade e a emissão do sinal e ainda fornece grupos para funcionalização com biomoléculas. Nanopartículas de poliestireno funcionalizadas e preenchidas com diferentes compostos fluorescentes estão facilmente disponíveis comercialmente para aplicação, Figura 3.2.



Figura 3.2: Dispersão de nanopartículas poliméricas fluorescentes da marca Invitrogen que emitem em diferentes comprimentos de onda.

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da

detectabilidade de um sensor *point-of-care*- Introdução

O fenômeno de fluorescência ocorre a partir de um decaimento energético de valor menor que a radiação de excitação original. Por isso, a banda de emissão de fluorescência sempre se apresentará em comprimentos de onda maiores que a radiação absorvida, isto é denominado como deslocamento de Stokes (West *et al.* 2006). A detecção por fluorescência surge como alternativa para aumento do limite de detecção de muitos sistemas. Uma representação do fenômeno de fluorescência se encontra na Figura 3.3.

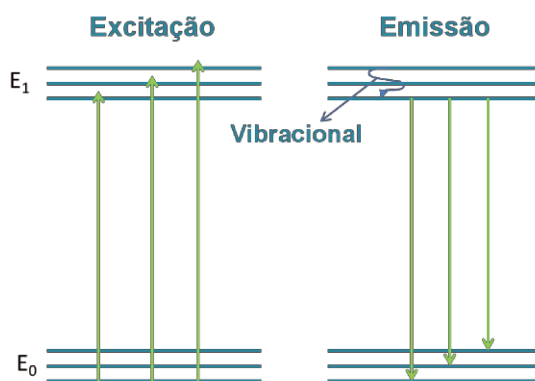


Figura 3.3: O estado fundamenta E_0 e o estado excitado E_1 possuem estados vibracionais excitados. Ao absorver a radiação, os elétrons podem passar pra qualquer um dos níveis vibracionais do estado excitado E_1 . A radiação absorvida pode ter perdas vibracionais e depois gerar uma emissão fluorescente voltando a qualquer um dos níveis do estado fundamental.

O estado fundamenta E_0 e o estado excitado E_1 possuem estados vibracionais excitados. Ao absorver a radiação, os elétrons podem passar pra qualquer um dos níveis vibracionais do estado excitado E_1 . A radiação absorvida pode ter perdas vibracionais e depois gerar uma emissão fluorescente voltando a qualquer um dos níveis do estado fundamental.

Assim como com as nanopartículas de ouro, as nanopartículas fluorescentes podem ser aplicadas no desenvolvimento de dispositivos *point-of-care* se a molécula fluorescente emitir na região do visível com intensidade suficiente para ser detectada a olho nu (Linares *et al.* 2013).

3.1.2. Imunossensores

Um imunossensor é um dispositivo no qual se utiliza da reação bioquímica de reconhecimento específico entre antígeno e anticorpo para detectar o analito (Luppa *et al.* 2001). O reconhecimento entre anticorpo e analito é a chave da aplicação dessas biomoléculas em sensores, pois assegura uma alta especificidade para o sistema.

Muitos dispositivos combinam a especificidade da reação bioquímica anticorpo-antígeno com a sensibilidade atribuída aos métodos de detecção quando nanopartículas são usadas como marcadores. Diversos métodos podem ser usados para a formação desses conjugados (nanopartícula-anticorpo). A conjugação pode ser feita por atração eletrostática, reações com glutaraldeído, carbodiimida, succinimida e periodato ((Lu *et al.* 1996); Ratner *et al.*, 2004). Geralmente, algumas moléculas são usadas como espaçadores entre a nanopartícula e o anticorpo. O uso de espaçador diminui o impedimento estérico e aumenta a efetividade do reconhecimento nanopartícula-anticorpo. Após a síntese do conjugado, a aplicação em um imunoensaio depende do analito a ser detectado. Os métodos com os conjugados de nanopartículas seguem o mesmo princípio que o ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). A Figura 3.4 ilustra o procedimento ELISA indireto.

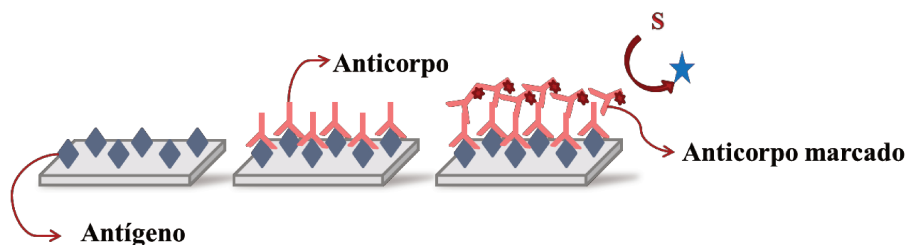


Figura 3.4: Esquema ilustrativo descrevendo as etapas de um ensaio ELISA tipo indireto.

O antígeno, analito a ser detectado no ensaio, é imobilizado a partir da amostra em um substrato que pode ser, por exemplo, o poço de uma placa de ELISA ou uma membrana de papel. A amostra pode ser sangue, urina, extrato de folhas, suor etc. Após a imobilização do analito é realizada uma etapa de bloqueio

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da

detectabilidade de um sensor *point-of-care*- Introdução

para evitar interações não específicas. Em seguida o anticorpo primário, aquele que reconhece o analito, é adicionado ao ensaio e deixa-se um certo tempo para que ocorra a reação de reconhecimento. Somente após diversas etapas de lavagem, é adicionado o anticorpo secundário que está ligado, marcado, a uma enzima, no caso do ELISA. Esse anticorpo secundário reconhece o anticorpo primário. A enzima ligada ao anticorpo na presença do substrato adequado (S) o transforma em um composto colorido. A intensidade da cor gerada no ensaio é proporcional a concentração do analito.

Ao marcar o anticorpo primário com uma nanopartícula colorida ou fluorescente, o anticorpo secundário deixa de ser necessário ao ensaio e reduz-se o número de etapas da análise. A análise resume-se a Figura 3.5.

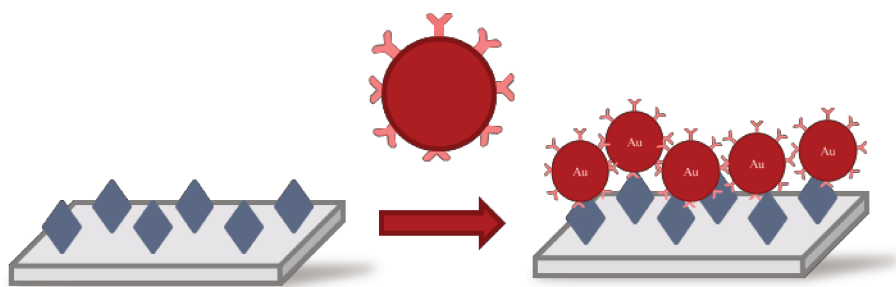


Figura 3.5: Esquema ilustrativo do imunoensaio ao se usar o conjugado de nanopartícula com o anticorpo primário.

3.1.3. Ferrugem Asiática da soja

A Organização das Nações Unidas estima uma população mundial de 9 bilhões em 2050, o que precisa ser acompanhado por um grande aumento na produção de alimentos[†]. Existem algumas estratégias para aumentar a produtividade como, aumento das áreas de cultivo, melhoramento das práticas agrícolas e o uso de sementes geneticamente modificadas. O cultivo da soja é muito importante em toda a cadeia alimentícia tanto na produção para consumo humano quanto para animais. Em 2010, foram produzidos cerca de 260 milhões de toneladas de soja em todo o mundo. Os Estados Unidos da América são os maiores produtores com cerca de 35% e o Brasil vem logo em segundo com 27%

[†] http://esa.un.org/unpd/wpp/Documentation/pdf/WPP2010_Press_Release.pdf (acessado em 27/07/2012)

da produção mundial. Em ambos os países a soja é um importante commodity. Os EUA em 2010 exportou mais de 23 bilhões de dólares somente no setor de produção da soja[‡].

Patógenos de plantas podem causar sérias consequências nas plantações e afetar a economia dos países (Skottrup *et al.* 2008). A doença que mais prejudica a safra da soja é a ferrugem asiática que é causada principalmente pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*. Este fungo foi relatado pela primeira vez no Japão em 1903 e permaneceu no continente Asiático com poucos episódios epidêmicos. Um infográfico da disseminação da doença está apresentado na Figura 3.6. Em 1990 o fungo foi identificado no continente africano. Após 10 anos, foi relatada sua chegada na América do Sul, no Brasil e no Paraguai em 2001 e em poucos anos se espalhou pelo continente. O fungo atingiu os Estados Unidos da América provavelmente por disseminação pelo vento após uma temporada de furacões em 2004.

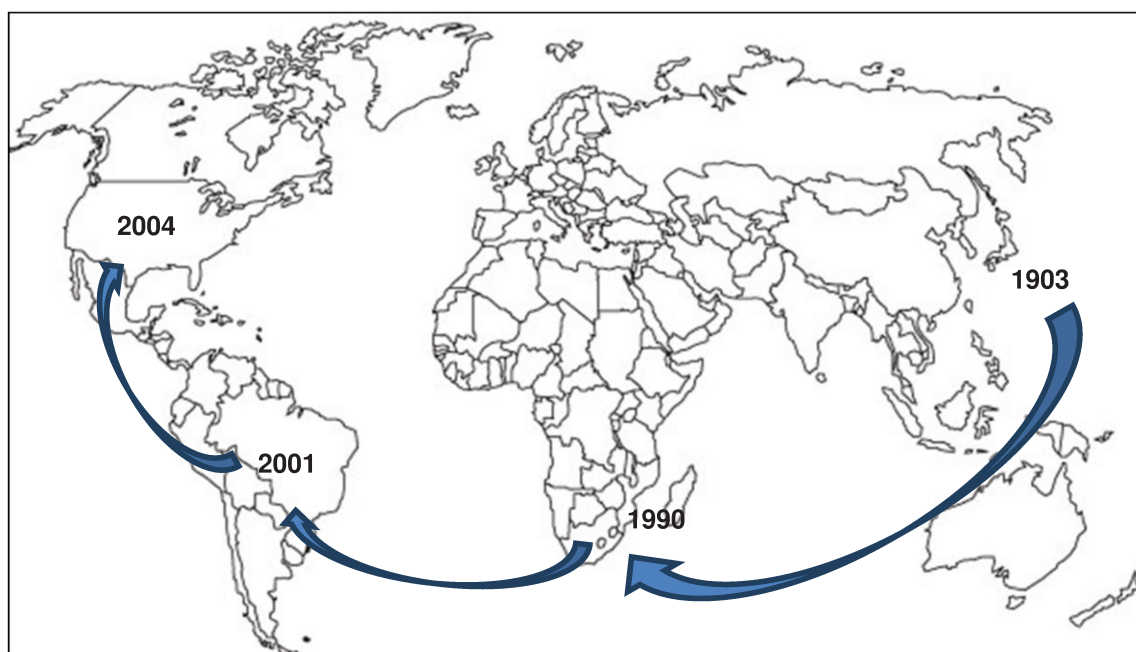


Figura 3.6: Infográfico da disseminação da ferrugem asiática da soja pelo mundo. Fonte: Consórcio Antiferrugem.

[‡] SOYSTATS 2011—a reference guide to important facts and figures. American Soybean Association, 2011. <http://www.soystats.com/2011/default.htm>. (accessado em 27.07.12).

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor *point-of-care*- Introdução

Este fungo é responsável por grandes danos às plantações de soja no Brasil, como na safra de 2003/2004 com prejuízo de mais de US\$ 1 bilhão de dólares (Ribeiro *et al.* 2007). Existe uma estimativa entre 240 milhões a 2 bilhões de dólares de prejuízo causado aos EUA se suas plantações de soja fossem contaminadas por este fungo (Schnepf, 2005). A Figura 3.7 apresenta um gráfico que relaciona as perdas da lavoura de soja devido à ferrugem asiática da soja em cada safra. Estão apresentados no gráfico dados do Consórcio antiferrugem[§] o prejuízo em bilhões de dólares: 1) em grãos calculado de acordo com o preço da safra (verde claro) e 2) o custo total da ferrugem que agrega a perda dos grãos com os gastos com produtos e aplicação dos fungicidas para prevenção (verde escuro).

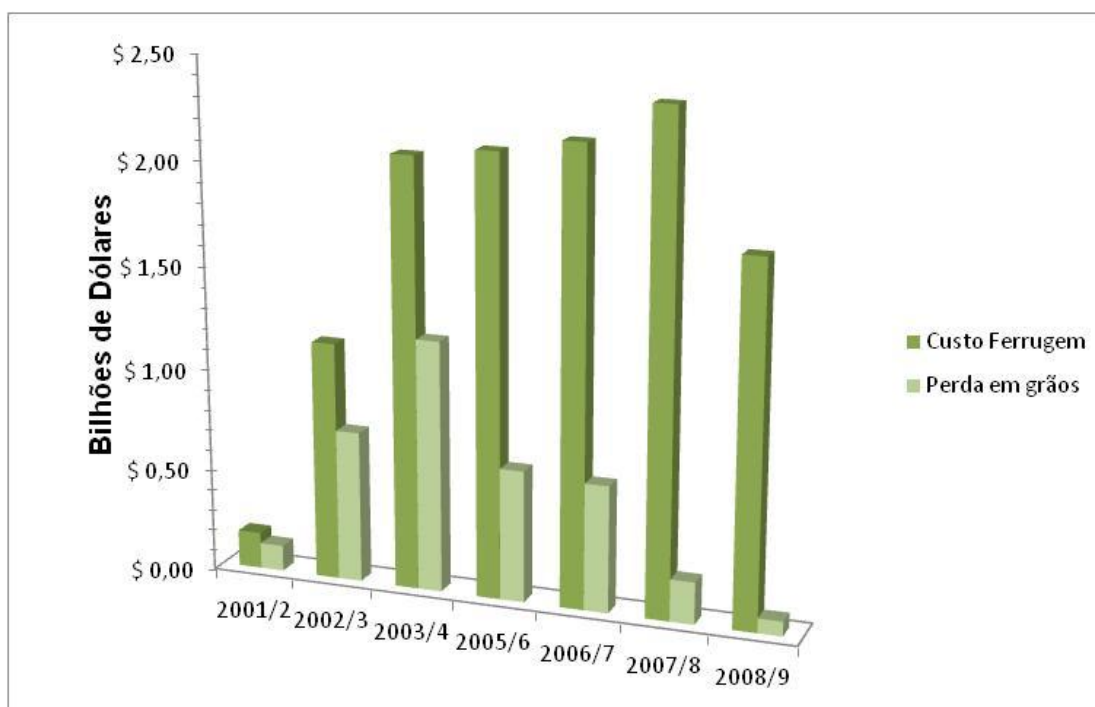


Figura 3.7: Prejuízo causado pela ferrugem asiática da soja no Brasil em cada safra. Perda em grãos (verde claro) e custo total da ferrugem: produtos e aplicação do fungicida mais a perda dos grãos (verde escuro). Fonte: Consórcio antiferrugem^{**}.

[§] <http://www.consorcioantiferrugem.net/portal/> (acessado em 21/05/2013)

^{**} <http://www.consorcioantiferrugem.net/portal/> (acessado em 21/05/2013)

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da

detectabilidade de um sensor *point-of-care*- Introdução

Observa-se que apesar da perda em grãos ter diminuído até a safra de 2008/9 o valor da perda para a economia brasileira, e para os fazendeiros, ainda é alta: 71 milhões de dólares.

A infecção da planta de soja pelo fungo ocorre muito rapidamente, 5 dias após a inoculação já se observam pontos escuros nas folhas. Esses são os primeiros sintomas visuais dessa doença, pústulas de cor marrom. Após 9 dias da inoculação, pústulas correspondentes ao pontos marrons são encontrados do lado de baixo das folhas da planta. Essas saliências são as urédias, unidades de frutificação da doença e responsáveis pela liberação de mais esporos. Ao longo do processo de infecção, as folhas se tornam amareladas e caem. As consequências para a plantação são: desfolhação precoce em poucos dias, vagens vazias, perda de peso dos grãos e consequentemente baixos qualidade e valor de mercado (Goellner *et al.* 2010). As perdas com a ferrugem asiática podem variar de 10 a 90% da produção, a Figura 3.8 é uma foto de uma plantação parte sadia e outra parte infectada.



Figura 3.8: Foto para ilustrar os danos às plantações de soja causados pela ferrugem asiática da soja. Fonte: Consórcio Antiferrugem^{††}.

Fatores ambientais e climáticos, como altas temperaturas, alta umidade e irrigação das plantas são os responsáveis por criar condições ambientais ótimas para o crescimento do fungo (Furtado *et al.* 2011). As condições ótimas são

^{††} <http://www.consorcioantiferrugem.net/portal/> (acessado em 21/05/2013)

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da

detectabilidade de um sensor *point-of-care*- Introdução

temperatura entre 18 e 26 °C e umidade foliar por mais de 6 horas. As boas condições climáticas das regiões tropicais e subtropicais amplificam o dano causado por essa doença. Por essa razão, os Estados Unidos não sofreram ainda as consequências dessa doença apesar da presença do fungo no país. Também por razões climáticas, os prejuízos causados pela ferrugem são tão voláteis.

O método de identificação convencional da ferrugem asiática da soja se resume em observar o lado de baixo das folhas da planta suspeita de estar contaminada. A visualização contra a luz em um fundo claro facilita a observação das urédias, Figura 3.9. No caso de suspeita, essa amostra é enviada para um laboratório central, muitas vezes distante da lavoura, para uma análise bioquímica a qual é muito demorada (no mínimo 4 horas), dependente de operadores treinados e equipamentos sofisticados e caros. Ainda mais, quando essa identificação visual é possível, a infecção da planta já ocorreu e o fungo provavelmente está espalhado por várias regiões do cultivo. A ferrugem asiática da soja pode facilmente se espalhar por meio da disseminação do esporo do fungo pelo vento e atingir terrenos vizinhos em poucos dias e danificar uma safra inteira. Portanto, o tempo é um fator crucial para o isolamento da área ou aplicação de fungicidas, evitando contaminações maiores.



Figura 3.9: Folha de soja contaminada com a ferrugem asiática da soja analisada contra o sol. Observam-se as urédias marrons já acompanhadas de amarelamento. Fonte: Consórcio AntiFerrugem^{††}.

^{††} <http://www.consorcioantiferrugem.net/portal/> (acessado em 21/05/2013)

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da

detectabilidade de um sensor *point-of-care*- Introdução

Por todas as razões descritas, uma identificação específica e precoce é muito importante para a tomada de medidas necessárias para salvar a plantação da infecção da ferrugem asiática da soja, para que evite-se a contaminação da lavoura inteira e terrenos vizinhos e medidas mais extremas como isolamento e destruição das áreas infectadas (Scherer *et al.* 2009). Trabalhos recentes descrevem o desenvolvimento de sensores com alta especificidade e baixos limites de detecção (Mendes *et al.* 2009a; Mendes *et al.* 2012). Como o objetivo de identificar o fungo de modo mais acurado, reação polimérica em cadeia, (PCR) (Frederick *et al.* 2002) ou ensaio enzimático imunoadsorvente (ELISA) são realizados nas folhas infectadas da soja. O uso de anticorpos como agentes de reconhecimento fornece ao ensaio especificidade e acurácia na resposta. Apesar da maioria dos sensores desenvolvidos serem mais simples do que realizar ELISA, eles ainda são dependentes de procedimentos laboratoriais, pessoal treinado e equipamentos caros para ler o sinal (Baysal-Gurel *et al.* 2008; Mendes *et al.* 2009a; Mendes *et al.* 2009b; Mendes *et al.* 2012).

3.1.4. Dispositivos *point-of-care*

Para superar a necessidade de equipamentos e rotinas exaustantes, dispositivos analíticos baseados em papel tem sido amplamente utilizados desde a década de 60 para diferentes aplicações (Carrilho *et al.* ; Cheng *et al.* 2010; Haeberle and Zengerle 2007; Mark *et al.* 2010; Martinez *et al.* 2010). A maioria desses dispositivos é usada em ensaios biológicos e dispositivos point-of-care (POC) (Gubala *et al.* 2012). Novos dispositivos POC podem ter nanoestruturas em seus sistemas de detecção, que agem como carregadores de moléculas e marcadores gerando resultados mais precisos e confiáveis (Giljohann and Mirkin 2009). Estes tem muitas vantagens em relação às metodologias clássicas analíticas: são mais baratos, mais simples, portáteis e descartáveis. As análises em laboratórios centrais são muito demoradas, variando entre 5 e 24 horas dependendo do tempo de incubação. Além disso, as amostras devem ser colhidas e enviadas para os laboratórios cadastrados que geralmente se encontram a longas distâncias das lavouras. Depois de toda a análise, o fazendeiro ainda tem

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da

detectabilidade de um sensor *point-of-care*- Introdução

que consultar um especialista para decidir as medidas necessárias para o caso. A aplicação de dispositivos *point-of care* não se limita somente a diagnósticos clínicos em humanos, esses dispositivos devem ser desenvolvidos e aplicados onde se fazem necessários. Análises *in loco* são mais baratas e economizam tempo. Ainda mais, leitores simples de dispositivos POC colorimétricos já estão sendo desenvolvidos para o uso em campo por Whitesides e colaboradores (Martinez *et al.* 2007).

Geralmente estes dispositivos são baseados no reconhecimento de anticorpos conjugados com nanopartículas de ouro. Entretanto, o limite de detecção não é baixo o suficiente para algumas aplicações. Já há no mercado um teste de fluxo lateral comercial para a ferrugem asiática da soja com limite de detecção do teste de 3000 esporos por polegada quadrada de folha, o que indica que somente plantas com alto grau de infecção serão diagnosticadas com a doença. Portanto há a necessidade de testes mais sensíveis porque quanto antes a doença é diagnosticada mais chances de salvar a lavoura. O uso de nanopartículas fluorescentes pode aumentar a detectabilidade de um sensor para a ferrugem asiática da soja. Ainda mais, estes testes devem preencher requisitos para um diagnóstico precoce que guie a decisão do fazendeiro por isso devem ser simples o suficiente para serem usados por pessoas não treinadas, ter tempo de prateleira adequado para ser estocado, barato e ser usado em condições remotas (Ellerbee *et al.* 2009). O uso destes testes na agricultura pode ser muito útil para salvar a plantação, uma vez que o próprio fazendeiro pode realizar o teste em poucos minutos e tomar uma atitude imediata ao invés de mandar as folhas suspeitas de infecção para um laboratório central e esperar o diagnóstico.

3.2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo desenvolver um dispositivo *point-of-care* de alta detectabilidade para a detecção precoce da ferrugem asiática da soja. Para a detecção precoce anticorpos contra o esporo do fungo são usados como elementos de reconhecimento do imunosensor. A aplicação de nanopartículas como marcadores do ensaio vem como estratégia para aumentar a detectabilidade e desenvolver um sinal que possa ser visível a olho nu. Para alcançar esses objetivos nanopartículas de ouro e fluorescentes foram estudadas na formação do conjugado anticorpo-nanopartícula. O ensaio para a detecção do esporo em amostra de folhas foi desenvolvido para que a análise possa ser realizada em campo, por uma pessoa não treinada e que a detecção do sinal seja a olho nu.

3.3. Materiais e Métodos

3.3.1 Materiais e Reagentes

Albumina de soro bovino (BSA), cloreto de sódio, hidrocloreto de N-(3-Dimethylaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), membranas de diálise (MWCO 100 kDa e 130 kDa), fosfato mono- e dibásico foram comprados da Sigma-Aldrich (Munique, Alemanha). Nanopartículas de ouro (40 nm) foi comprada da British Biocell International (Cardiff, Reino Unido). Anticorpo anticoelho IgG foi comprado da Abcam, (Alemanha) FluoSphere, nanoesferas de tamanho médio de 40 nm modificadas com grupos carboxilados (505/538 nm) (540/560 nm); (575/609 nm) e (655/684 nm) 5% (m/m), foram compradas da Invitrogen (Carlsbad, Estados Unidos da América). Membranas de nitrocelulose AC 100 (8 µm), celulose (z286591, z270814) e acetato de celulose (RC 60) foram comprados da Whatman (Maidstone, Reino Unido).

3.3.2. Produção do antígeno e anticorpos contra o fungo *Phakopsora pachyrhizi*.

Antígeno e anticorpos policlonais antimicélio do fungo causador da ferrugem asiática da soja foram produzidos pela Prof.^a Dr.^a Dagmar Statch-Machado do Instituto de Biologia da UNICAMP. O antígeno (esporo *Phakopsora pachyrhizi*) usado nos experimentos foram cedidos pela Embrapa Soja, cultivados, separados e redispersos em tampão fosfato pH 7,4 0,01 mol/L com concentração de 32 µg/mL. Os anticorpos foram expressos em coelhos que foram imunizados com o esporo do *Phakopsora pachyrhizi* três vezes em um período de 14 dias. Dez dias após a última incubação, foi feita uma punção cardíaca para a retirada do soro. O soro de anticorpos policlonais foi purificado por cromatografia de afinidade IgG com uma concentração final de 0,4 mg/mL.

3.3.3. Microscopia óptica e fluorescência

Uma alíquota da amostra de 2 µL da dispersão do esporo foi depositada em um substrato, lâmina de vidro ou três tipos de papel (celulose, acetato de celulose

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor *point-of-care* – Materiais e Métodos

e nitrocelulose) e depois de secos, foram lavados com tampão fosfato pH 7,4 0,01mol/L. Um microscópio óptico invertido com uma magnificação de 40x foi usado (Axio Observer Z1, Carl Zeiss GmbH). A fonte usada para as imagens fluorescentes foi uma lâmpada de mercúrio de alta pressão e um filtro de emissão em 400-500 nm (HBO 100, Leistungselektronik JENA GmbH). A imagem digital foi obtida por uma câmera CCD (Rolera-XR, QImaging) e montada pelo software QCapture Pro software 6.0 (QImaging).

3.3.4. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

A imagens foram obtidas em um microscópio JEOL JSM-6500F. Alíquotas dos esporos foram depositadas em um adesivo condutor e após secos foram cobertos com um filme fino de carbono.

3.3.5. Conjugado anticorpo-nanopartícula fluorescente

Nanopartículas fluorescentes modificadas com grupos carboxilados foram previamente modificadas com BSA. Para isso, os grupos foram ativados primeiramente com EDC. Uma alíquota de 15 µL da dispersão de nanopartículas comerciais foram diluídas em 600 µL de tampão fosfato 0,01 mol/L pH 6. A dispersão foi misturada por 30 minutos a temperatura ambiente. Então, 400 µL de uma solução de BSA 30 mg/mL foi adicionada à dispersão de nanopartículas nas mesmas condições anteriores. Subsequentemente, 200 µL de uma solução 15 mg/mL de EDC em água destilada foram adicionadas à dispersão, e agitada por 2 horas a temperatura ambiente. Para tirar o excesso de reagente, após a reação, a dispersão FNP/BSA foi dialisada por 24 horas em tampão fosfato 0,01 mol/L pH 7,4. A solução externa foi trocada quatro vezes. Uma alíquota de 70 µL do anticorpo foi diluído em 500 µL de uma solução de tampão fosfato 0,01 mol/L pH 6 e 200 µL da dispersão FNP/BSA. A mistura foi agitada por 30 minutos a temperatura ambiente. Após, a etapa de adição de EDC e diálise foram realizadas nas mesmas condições que a etapa anterior. A dispersão final FNP/BSA/anticorpo tem concentração de $1,9 \cdot 10^{12}$ nanopartículas/mL.

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor *point-of-care* – Materiais e Métodos

3.3.6. *Spot test*

Diferentes concentrações de antígeno, variando de 0,0032 a 32 µg/mL, foram depositadas em alíquotas de 2,5 µL em uma membrana de nitrocelulose. Depois de secas, as membranas foram imersas em uma solução de BSA a 3% (m/v) em tampão fosfato 0,01 mol/L, pH 7,4 por 30 minutos e enxaguadas com a mesma solução tampão, para fazer o bloqueio de sítios não específicos. Logo depois, as membranas foram imersas na dispersão do conjugado anticorpo-nanopartícula fluorescente por 60 minutos. Somente para o conjugado anticorpo-nanopartícula de ouro realizou-se um *spot test* onde um anticorpo secundário IgG foi depositado em diferentes diluições (1:0, 1:1, 1:10 e 1:100) na membrana de nitrocelulose.

3.3.7 Microscopia confocal

Para as análises de microscopia confocal um microscópio Carl Zeiss LSM 510 NLO (Göttingen, Germany) com o seguinte conjunto de filtros NT80/20/543, espelho, NFT545, BP565-615; foi usado; um laser de 543 nm foi usado para a excitação e as imagens foram gravadas com o software LSM 510 (versão 4.2 SP1).

3.3.8 Medidas de fluorescência

As etapas para as medidas de fluorescência são as mesmas para o *spot test*. A membrana foi seca ao final e o sinal foi lido com um espectrofluorímetro LS-55 Perkin-Elmer (Connecticut, USA) equipado com uma lâmpada de xenônio usando uma fibra de quartzo bifurcada (4 mm diâmetro).

3.3.9. Construção do dispositivo e ensaio em campo

Um dispositivo foi construído com o objetivo de facilitar a realização do ensaio em campo para que possa ser utilizado por uma pessoa leiga não treinada. A amostra de folha suspeita de contaminação do tamanho de uma tampa de um tubo Eppendorf (1,5 mL) é inserida em um tubo deste tipo e uma solução de tampão fosfato 0,01 mol/L é adicionada para extrair os esporos. Com uma pipeta de Pasteur de plástico pode-se retirar uma alíquota e depositar na membrana que

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor *point-of-care* – Materiais e Métodos

está presa em um suporte de plástico. Depois de seco, o palito é imerso no tubo que contém a solução específica de cada etapa do imunoensaio de acordo com a Figura 4.20. Finalmente o sinal é lido visualmente, a olho nu por uma lâmpada UV simples. O limite de detecção foi determinado a partir da visualização a olho nu do sinal produzido pela realização do ensaio com concentrações variando de 3,2 ng/mL a 32 µg/mL. A concentração mais baixa visível a olho nu foi escolhida para um teste estatístico da sensibilidade com N=10.

3.4. Resultados e Discussão

3.4.1. O analito: esporo do fungo *Phakopsora pachyrhizi*

O desenvolvimento de um imunossensor é direcionado pelas características do analito e define o tratamento adequado da amostra e o sistema de detecção. O analito e amostra são importantes fatores para a escolha dos materiais usados no desenvolvimento de um dispositivo para ser usado como sensor.

A visualização da infecção da ferrugem asiática da soja nas folhas da planta é difícil. As marcas visuais (pontos escuros, urédias e amarelamento) presentes na folha podem ser confundidas com outras doenças, como a pústula bacteriana, crestamento bacteriano, míldio e mancha parda. A identificação do esporo do fungo a partir de microscopia ótica, é complicada devido a diversas classificações fenóticas e morfológicas do curto e complexo ciclo de vida do fungo. Além disso, existem seis tipos diferentes de esporo, mudanças morfológicas dependendo da planta hospedeira. Imagens do esporo do fungo *Phakopsora pachyrhizi* usado neste trabalho sob diferentes técnicas microscópicas estão apresentadas na Figura 3.10. A imagem de microscópio óptico de campo claro (3.10.A) mostra alguns aglomerados de esporos. Na imagem de MEV (4.10.B) podem ser observados mais detalhes do esporo, como as protuberâncias em forma de agulha na superfície do esporo, em maior detalhe na Figura 3.10.C. Pela análise de MEV, observou-se que os esporos tem um tamanho médio de 20 µm. Em um estudo prévio (Baysal-Gurel *et al.* 2008), foi descrito que os esporos do *Phakopsora pachyrhizi* possuem uma fraca fluorescência natural, em imagens obtidas por microscopia de fluorescência também obteve-se a mesma constatação como mostrada na Figura 3.10.D.

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor *point-of-care*– Resultados e Discussão

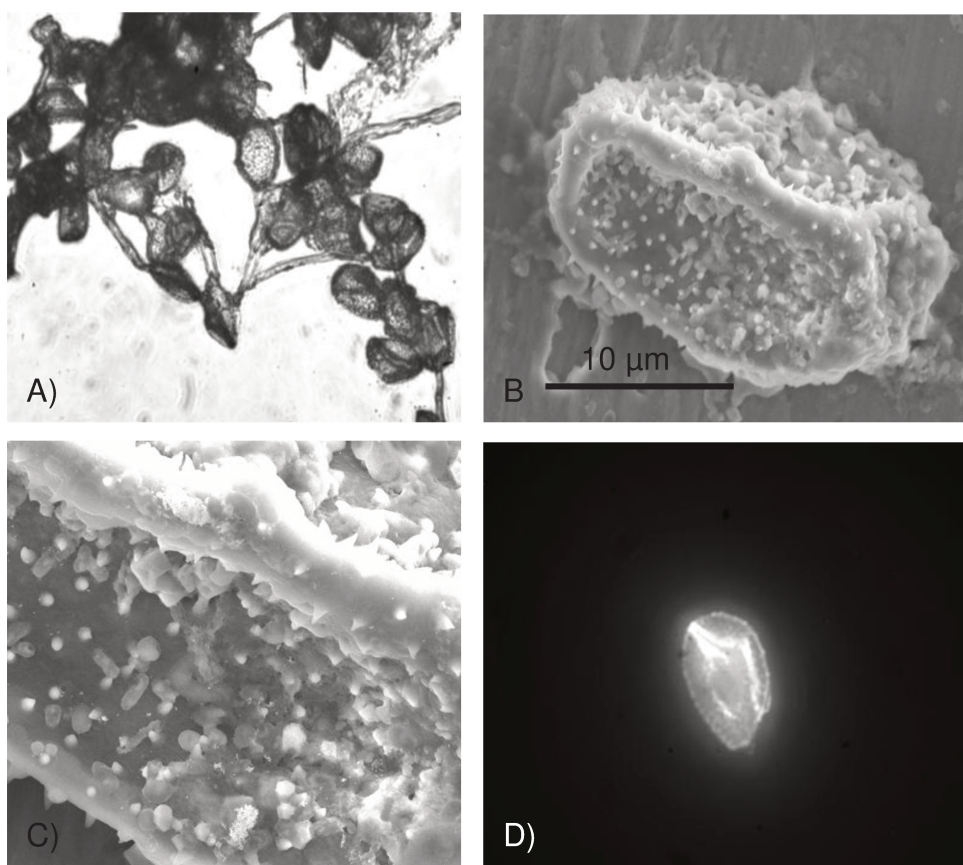


Figura 3.10: Imagens de diferentes técnicas microscópicas para investigar as características dos esporos com a) imagem ótica de campo claro (43x) b) e c) imagem de microscopia eletrônica de varredura; d) Imagem digital de espectro de fluorescência, 32µg/mL, λ_{exc} : 530nm.

O analito investigado neste estudo é relativamente grande em relação aos analitos alvos mais comuns dos sensores publicados na literatura, moléculas pequenas ou proteínas. O esporo do fungo não conseguiria fluir pelas membranas de um dispositivo de fluxo lateral (LFIA) comum, onde a capilaridade gera o fluxo e os poros das membranas, em geral, são menores que o esporo. Por isso, apesar do LFIA ser o dispositivo *point-of-care* mais comum, não poderá ser usado para este analito. O ensaio em forma de *immunospot* seria o mais adequado para este analito (Linares *et al.* 2007; Linares *et al.* 2013).

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor *point-of-care*– Resultados e Discussão

3.4.2. Conjugado anticorpo–nanopartícula de ouro

Nanopartículas de ouro são extensamente usadas como marcadores em sistemas *point-of-care*, tanto em estudos encontrados na literatura quanto em dispositivos comerciais. A interação dos anticorpos com a nanopartícula de ouro pode ocorrer por três maneiras: atração eletrostática entre a nanopartícula de ouro carregada negativamente e a proteína que está carregada positivamente; atração hidrofóbica entre o anticorpo e a superfície do ouro; e a ligação covalente entre os elétrons do ouro e os átomos de enxofre do aminoácido cisteína que constituem o anticorpo (Pensa *et al.* 2012; Xie *et al.* 2012). Portanto, a conjugação entre anticorpo e nanopartícula de ouro é muito dependente do pH, porque é este que vai determinar a distribuição das cargas, de acordo com o ponto isoelétrico específico da proteína e a estabilidade da dispersão, proporcionando a maior cobertura possível da superfície da partícula com a proteína, influenciando assim na sua biofuncionalidade. Devido a isso, três valores distintos de pH foram testados para essa conjugação. Ao mesmo tempo, a estabilidade da dispersão de ouro é mantida por repulsão eletrostática. Quando eletrólitos são adicionados à dispersão, ocorre aglomeração dessas nanopartículas e precipitação e, portanto alteração da cor (Liang *et al.* 2009). Este efeito pode ser evitado se as partículas estiverem estabilizadas pela adsorção de moléculas na superfície, como proteínas. No entanto, altas concentrações de anticorpo também não são desejáveis porque causam a sobreposição de camadas de anticorpos sobre a primeira monocamada de anticorpos da partícula. Isso reduz a eficiência do teste, além de aumentar o custo do ensaio realizado. Por isso, a concentração de proteína para a formação do conjugado foi estudada em quatro valores diferentes, (5, 10, 50 e 100 µg/mL).

Várias tentativas foram realizadas para a conjugação dos anticorpos com as nanopartículas de ouro, (diferentes concentrações, tampões e pHs). No entanto, não foi obtido sinal visual para esse sistema de detecção. Como já investigado na literatura, sistemas com a nanopartícula de ouro não resultam em baixos limites de detecção. Portanto, este sistema não é sensível o suficiente para o desenvolvimento de um dispositivo *point-of-care*. Outros marcadores foram investigados em seguida para o diagnóstico da ferrugem asiática da soja.

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor *point-of-care*– Resultados e Discussão

3.4.2. Conjugado anticorpo-nanopartícula fluorescente

Como alternativa, nanopartículas fluorescentes comerciais foram investigadas para aumentar a sensibilidade, abaixar o limite de detecção e desenvolver o dispositivo *point-of-care* para a detecção precoce da ferrugem asiática da soja. Foram compradas diferentes dispersões de nanopartículas fluorescentes para que o sistema de detecção escolhido não tenha interferência de sinal nem do analito (fluorescência natural do esporo) e nem da amostra (extrato de folhas da soja). A Figura 3.11 apresenta os espectros de absorção das quatro dispersões das nanopartículas fluorescentes estudadas.

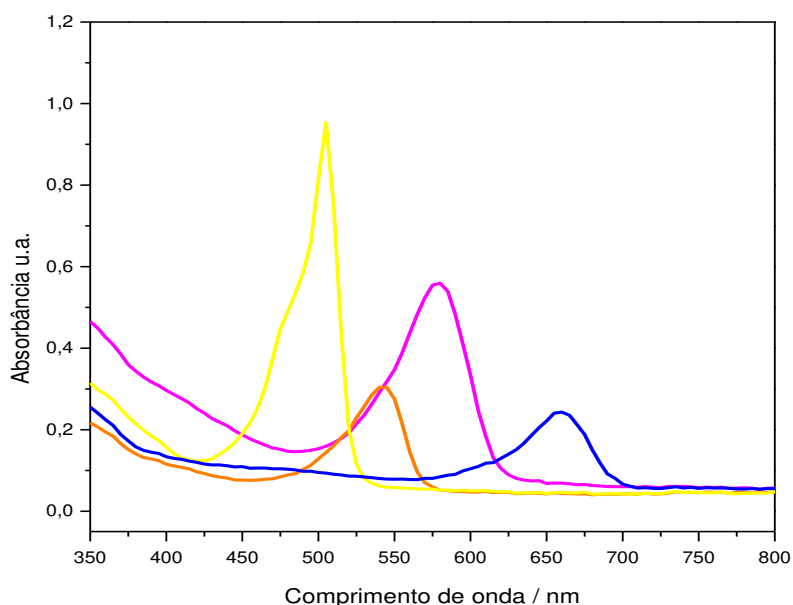


Figura 3.11: Espectro de absorção das quatro nanopartículas fluorescentes estudadas.

As nanopartículas de poliestireno comerciais possuem diâmetro de 40 nm e são preenchidas por moléculas fluorescentes^{§§}, na superfícies estão presentes grupos carboxílicos que permitem a funcionalização das mesmas. Observa-se no espectro que as nanopartículas absorvem a radiação em diferentes comprimentos de onda, mas todas dentro da região do visível. O comprimento de onda de

^{§§} A empresa Invitrogen® não disponibiliza as moléculas fluorescentes utilizadas em cada nanopartícula.

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor *point-of-care*– Resultados e Discussão

absorção máxima de cada nanopartícula foi usado para excitar as mesmas. Os espectros de emissão das nanopartículas estão apresentados na Figura 3.12.

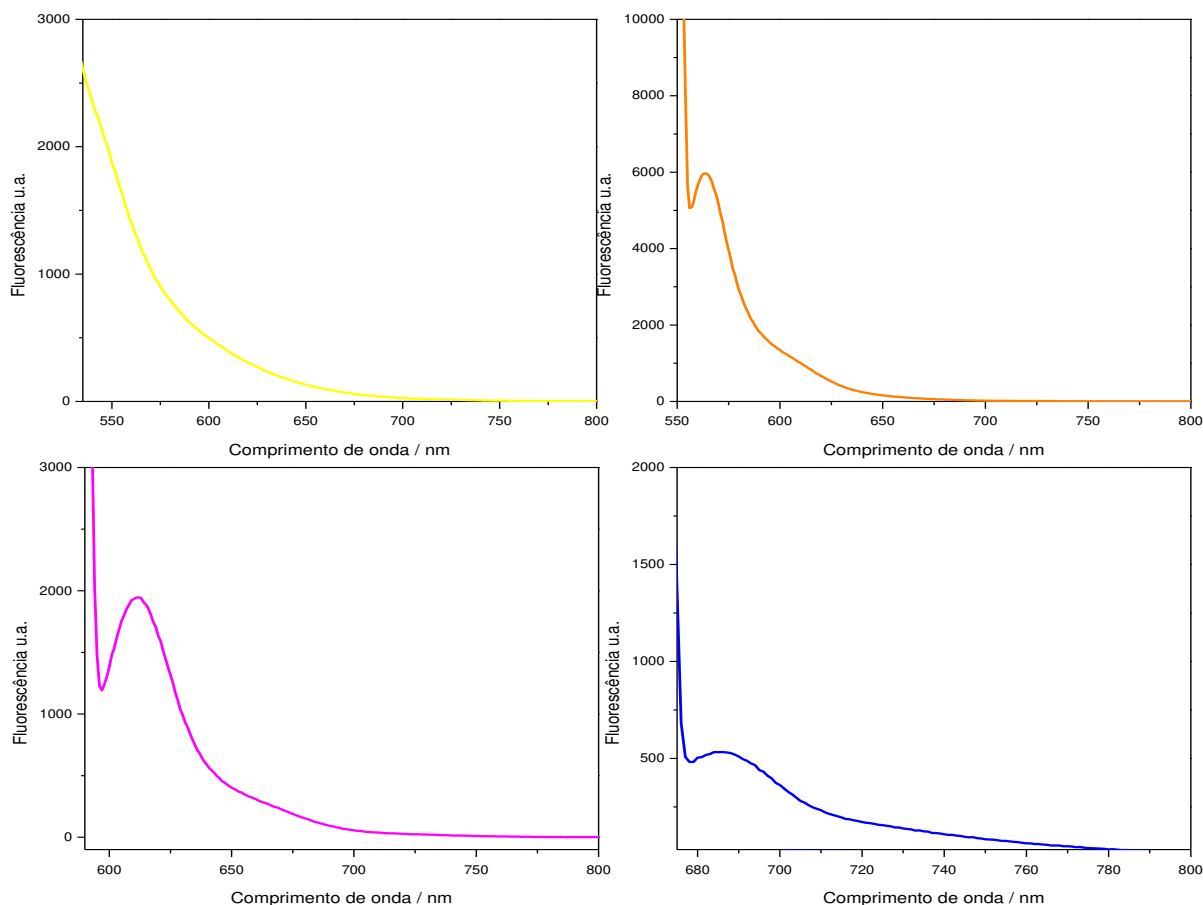


Figura 3.12: Espectros de emissão das nanopartículas fluorescentes estudadas. A) Amarela ($\lambda_{exc}=505$ nm); B) Laranja ($\lambda_{exc}=540$ nm); C) Rosa ($\lambda_{exc}=575$ nm) e D) Azul ($\lambda_{exc}=655$ nm)

De modo geral as nanopartículas investigadas apresentaram um pico definido de emissão de fluorescência, com exceção da nanopartícula amarela. As nanopartículas foram excitadas nas mesmas condições e apresentaram diferentes intensidades de fluorescência. A que apresentou maior intensidade foi a (B) laranja, seguidas pelas (C) rosa, (A) amarela e por último a (D) azul. Os comprimentos de onda máximos de absorção e emissão estão apresentados na Tabela 3.1.

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor *point-of-care*– Resultados e Discussão

Tabela 3.1: Comprimentos de onda de absorção e emissão das nanopartículas fluorescentes estudadas.

Nanopartícula	λ máx. de Absorção (nm)	λ máx. de Emissão (nm)
Amarela	505	538
Laranja	540	560
Rosa	575	609
Azul	655	684

Após a caracterização das nanopartículas partiu-se para a verificação da possível interferência dos esporos e do extrato de folhas da soja. A amostra da análise dos esporos é um extrato de tampão da folha infectada. Portanto, não somente o esporo pode interferir no sinal como também o extrato de folhas da amostra, por isso esta amostra também foi caracterizada por fluorescência. Como é bem conhecido, a clorofila é um dos compostos principais das folhas das plantas e tem intensa atividade fluorescente. Devido a isso, o extrato de folhas de soja foi caracterizado quanto à sua fluorescência. Os espectros de absorbância e emissão fluorescente ($\lambda_{exc} = 680$ nm) do extrato das folhas de soja estão apresentados na Figura 3.13

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor *point-of-care* – Resultados e Discussão

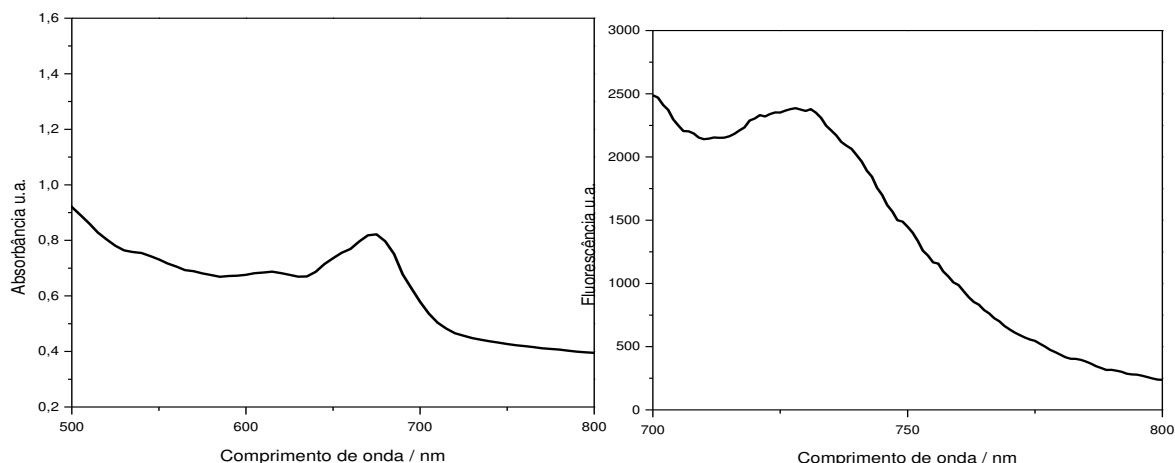


Figura 3.13: Espectros do extrato das folhas sadias de soja: A) absorção e B) emissão.

O espectro do extrato de folhas mostra uma forte absorção na região do visível o que sugere uma grande mistura de compostos absorventes. O máximo de absorção da amostra corresponde a uma banda de pico em 680 nm. O espectro de emissão da fluorescência foi obtido a partir da excitação da dispersão neste comprimento de onda. A emissão correspondente encontra-se em comprimentos de onda maiores que 720 nm.

Como já visto na seção 3.3.1, o próprio esporo possui uma fluorescência natural. Portanto, para prevenir qualquer interferência no sinal emitido pelas nanopartícula marcadora do sistema de detecção, a fluorescência intrínseca dos esporos foi caracterizada. O espectro de absorção da dispersão do esporo ($32\mu\text{g/mL}$) está apresentado na Figura 3.14.

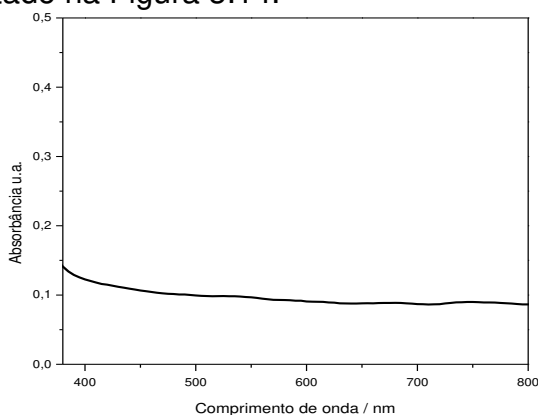


Figura 3.14: Espectros de absorção da dispersão de esporos da ferrugem asiática da soja ($32\mu\text{g/mL}$)

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor *point-of-care*– Resultados e Discussão

Comparando os resultados obtidos para a amostra com as características das NPFs, pode-se sugerir que as emissões das nanopartículas Azul e Rosa seriam reabsorvidas pela amostra devido à proximidade dos comprimentos de onda de emissão das NPFs e de absorção da amostra. Isso poderia levar a resultados de falso negativo da análise. Portanto, estas nanopartículas foram descartadas. Como não foi possível identificar um pico característico para a dispersão do analito, esta foi excitada no mesmo comprimento de onda que a nanopartícula fluorescente laranja (540 nm) já que esta possui a maior intensidade de emissão. O espectro obtido está apresentado na Figura 3.15.

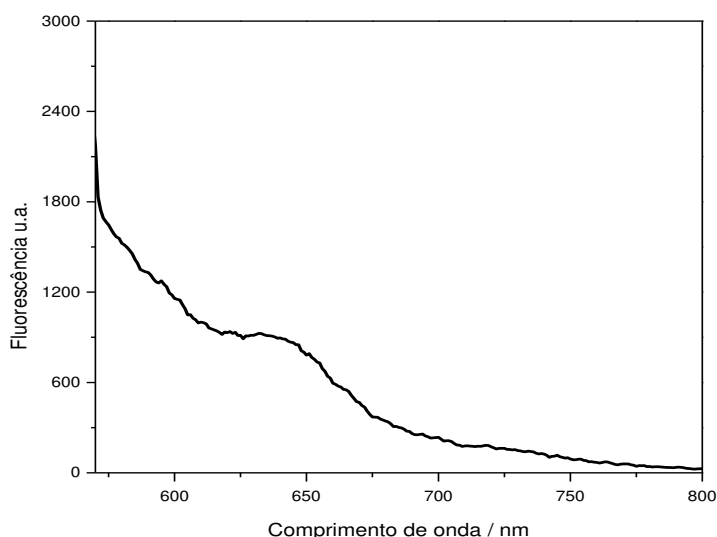


Figura 3.15: Espectros de emissão da dispersão de esporos da ferrugem asiática da soja ($\lambda_{exc}=530$ nm)

A excitação da dispersão em 540 nm resultou em uma emissão de fluorescência de baixa intensidade, é possível observar apenas uma banda entre 640 e 650 nm. Apesar de fraca, a nanopartícula fluorescente a ser escolhida não deverá emitir na mesma região. Por isso, a nanopartícula laranja foi escolhida porque sua emissão ocorre em 560 nm, comprimento de onda menor que a emissão do esporo e da amostra, além de apresentar a maior intensidade de emissão.

Após a definição do nanomaterial a ser utilizado para o ensaio fluorescente, o conjugado de anticorpo-nanopartícula fluorescente foi sintetizado (descrição na

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor *point-of-care* – Resultados e Discussão

seção 3.3.5), uma ilustração da formação do conjugado está apresentada na Figura 3.16.

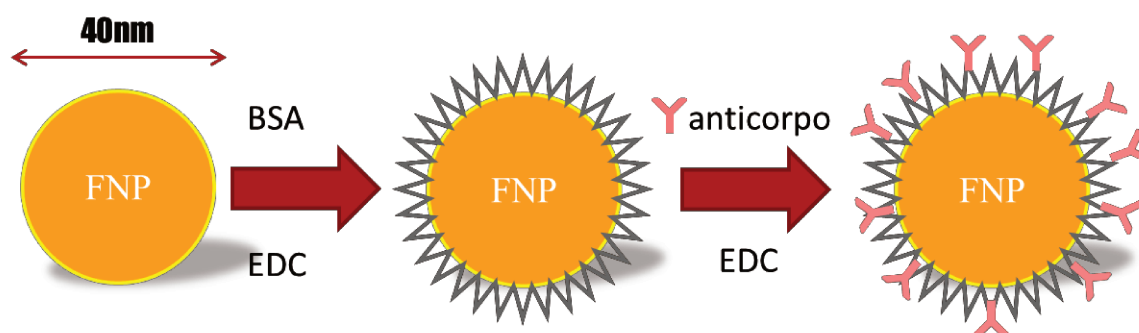


Figura 3.16: Ilustração da síntese do conjugado anticorpo da ferrugem asiática da soja com nanopartícula de ouro.

A nanopartícula fluorescente primeiramente é funcionalizada com BSA e depois o anticorpo é ligado ao BSA. Tanto a reação utilizada para a ligação da albumina com a FNP quanto a ligação do anticorpo com o BSA foram realizadas através de ligação com hidrocloreto de 3-(3-dimetilaminopropil)-1-etilcarbodiimida. Os grupos carboxílicos reagem com EDC formando um intermediário que por sua vez reagem com grupos aminas formando uma ligação peptídica amida (Ratner *et al.*, 2004).^{***} Ligações cruzadas ocorrem por todo o conjugado. O BSA é usado neste conjugado como um espaçador com o objetivo de evitar o impedimento histórico. A probabilidade de reconhecimento entre anticorpo-antígeno aumenta com o uso do espaçador e portanto pode-se observar um aumento na sensibilidade por esta razão também. A conjugação dos anticorpos com as nanopartículas fluorescentes foi otimizada quanto ao sinal visual obtido nos spot test. A concentração teórica final do anticorpo foi variada em: 5, 10, 20 e 50 mg/mL. Observou-se um aumento gradativo do sinal visual com o aumento da concentração de anticorpos. Apenas a concentração de 50 mg/mL resultou em uma intensidade a olho nu similar à da concentração com 20 mg/mL de anticorpos. Concluiu-se que se atinge uma saturação do recobrimento das nanopartículas

http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/ProteinInteractions/GBIOSC_ProtCrossLinkersHandbook.pdf
(acessado em 22/05/2013)

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor *point-of-care* – Resultados e Discussão

aproximadamente nesta concentração para um sistema de detecção visual. O reagente de ligação cruzada, EDC, está sempre em excesso e para isso a diálise da suspensão é feita em todas as etapas reacionais da conjugação. Além do EDC, a diálise com a membrana remove as proteínas não conjugadas (BSA e anticorpos). Assim, os sítios do antígeno serão reconhecidos somente por anticorpos ligados às nanopartículas possivelmente contribuindo para uma maior sensibilidade. O pH (6,4, 7,4, e 8,4) e a natureza do tampão (fosfato e TRIS-HCl) também foram estudados quanto à estabilidade da dispersão final e a intensidade da marcação no spot test visual. O sistema otimizado é obtido através de uma diálise final em tampão fosfato pH 7,4 0,01 mol/L.

3.4.3. Ensaio em microscopia confocal

O microscópio confocal permite uma melhor definição na imagem de amostras mais espessas que o plano focal. Ele traz grandes vantagens principalmente em amostras biológicas, imagens tridimensionais, e análise em células vivas, por exemplo. A investigação da marcação do esporo pelo conjugado anticorpo-nanopartícula fluorescente foi feita pela microscopia confocal. Para este estudo, o substrato utilizado para a análise foi uma lâmina de vidro na qual a amostra foi depositada. No entanto, este não é o substrato ideal para um dispositivo descartável e a escolha do substrato definitivo será explorada mais adiante. Após a deposição da amostra (com os esporos) para o ensaio no microscópio, a lâmina foi submersa na dispersão do conjugado para reação com o analito. Logo após a lavagem, as laminae foram levadas ao microscópio confocal e as imagens obtidas estão apresentadas na Figura 3.17(A) imagem em campo claro e B) em fluorescência.

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor *point-of-care*– Resultados e Discussão

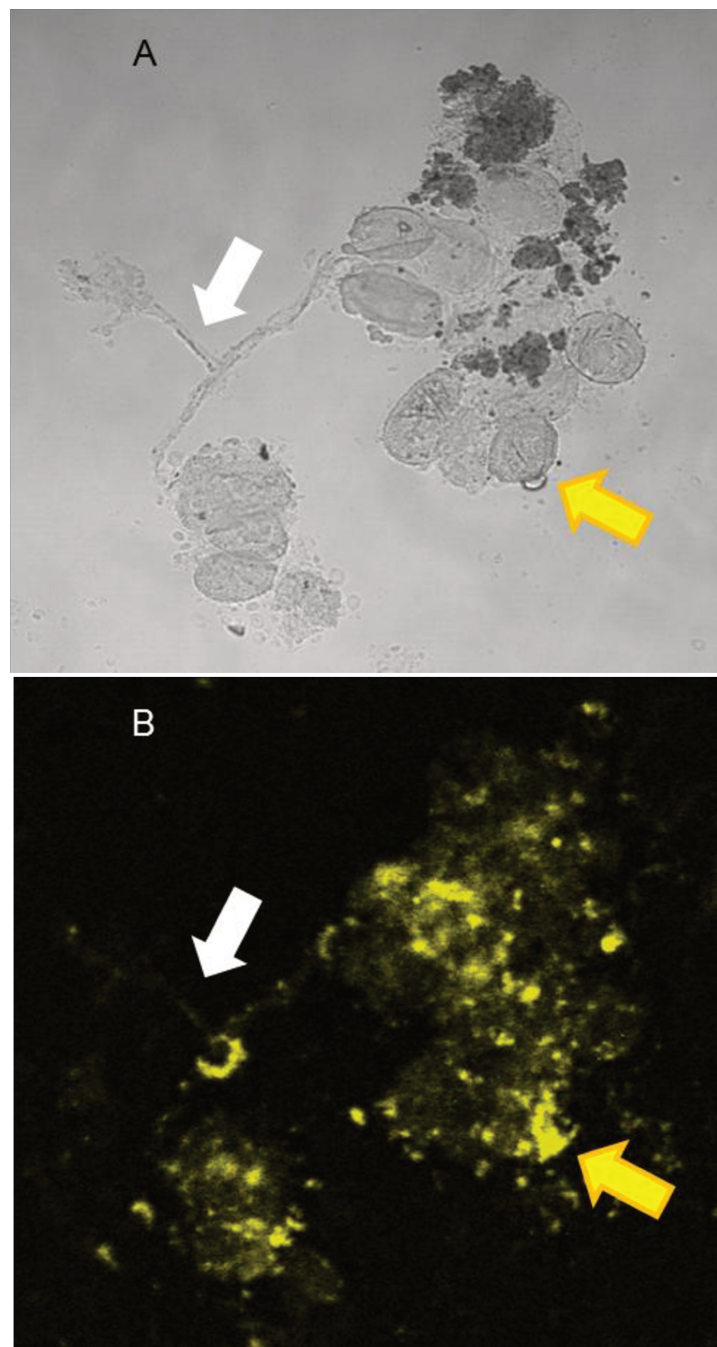


Figura 3.17: Imagens de microscopia confocal em campo claro (A) e fluorescência (B) de esporos da ferrugem asiática da soja marcados com o conjugado anticorpo-nanopartícula fluorescente. As setas brancas indicam material vegetal não específico que não foi marcado e as setas amarelas regiões de esporo marcados pelo conjugado.

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor *point-of-care*– Resultados e Discussão

As imagens obtidas mostram que os analitos foram marcados pelo conjugado de anticorpo-nanopartícula fluorescente, o que indica um reconhecimento dos esporos pelos anticorpos. Como o extrato das folhas pode ser fibroso, poderia ter a possibilidade da marcação de estruturas da planta, mas isso não foi observado. Observa-se um sinal de alta intensidade fluorescente. Uma comparação entre a imagem fluorescente e a de campo claro evidencia que a marcação possui certa especificidade. A estrutura vegetal não-específica da amostra indicada pela seta branca não foi marcada pelo conjugado, como indica a comparação com a imagem fluorescente. Já as setas laranjas indicam regiões do esporo do fungo que foram marcadas pelo conjugado, mostrando, portanto, a especificidade do ensaio.

3.4.4. Dispositivo imunossensor para a detecção precoce da ferrugem asiática da soja

Apesar de a análise funcionar com especificidade e sensibilidade no microscópio confocal, o objetivo deste trabalho é desenvolver um dispositivo que mantenha essas qualidades mas que seja prático, descartável e fácil de ser usado pelo próprio fazendeiro no campo. Por isso, a seguir descreve-se o desenvolvimento do sensor e sua adaptação para ser um dispositivo *point-of-care*.

As etapas necessárias para a realização da análise no desenvolvimento do sensor estão representadas no esquema apresentado na Figura 3.18.

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor *point-of-care* – Resultados e Discussão

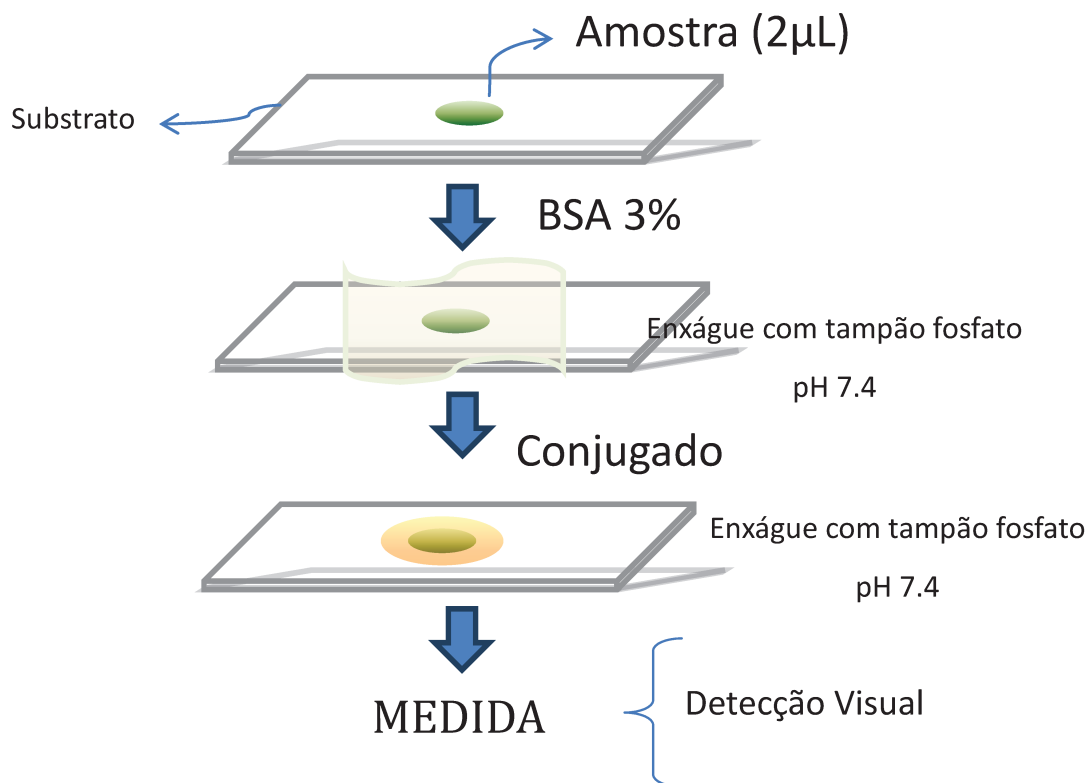


Figura 3.18: Etapas do imunoensaio tanto em substrato de lâmina de vidro para leitura do sinal em microscópio quanto em substrato de papel para leitura em fluorímetro.

Um volume muito pequeno (2 μ L) de extrato da folha contaminada é depositado sobre uma lamina de vidro ou membrana de celulose (papel). A característica hidrofílica de ambos os substratos permitem a adsorção do esporo na superfície. Para evitar interações não-específicas entre as nanopartículas cobertas pelo anticorpo com o substrato, uma solução de albumina é utilizada como bloqueador. Essa etapa diminui o ruído e portanto melhora a razão S/R. O anticorpo que recobre a nanopartícula se liga à diferentes epítomos do analito e garante uma interação específica e portanto sua detecção. Para cada epítomo, há várias moléculas de corante dentro da nanopartícula contribuindo para o sinal total obtido e para a fotoestabilidade. Por essa razão, a medida pode ser facilmente detectada por um fluorímetro, um detector portátil ou uma lâmpada simples de UV. Sendo os dois últimos adequados para aplicações no campo, onde o próprio

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor *point-of-care*– Resultados e Discussão

fazendeiro pode coletar a amostra, realizar o teste e ler o resultado em pouco tempo.

O uso da lâmina de vidro como substrato para o ensaio teve como objetivo averiguar a especificidade da marcação das estruturas do esporo no microscópio confocal. O uso da lâmina de vidro como substrato do dispositivo *point-of-care* poderia levar a mais etapas do ensaio porque seria necessária mais uma etapa para a imobilização do antígeno no vidro. Além disso, poderia comprometer a integridade do esporo e consequentemente o resultado da análise. Como o objetivo de desenvolver um teste portátil, o substrato foi cuidadosamente escolhido para resultar numa maior retenção de esporos. Membranas de celulose, acetato de celulose e nitrocelulose foram testados e as imagens óticas obtidas são mostradas na Figura 3.19.

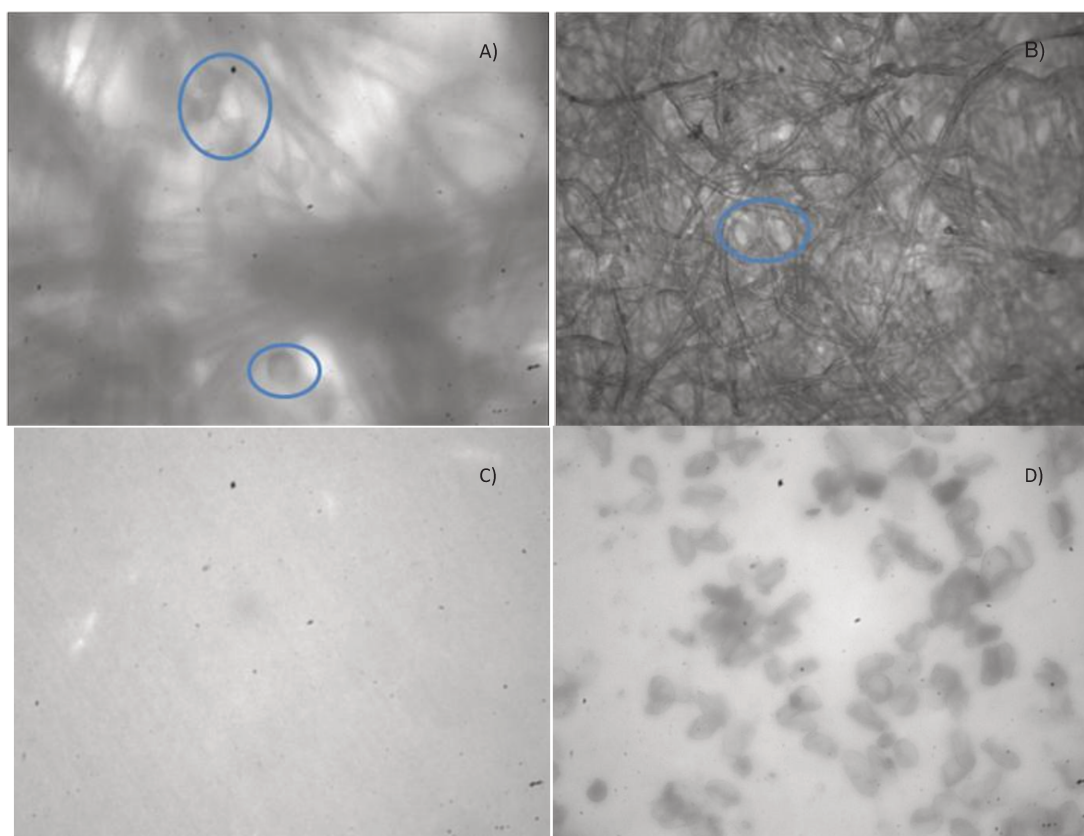


Figura 3.19: Imagens óticas de quatro membranas diferentes testadas para a retenção dos esporos: A) membrana de celulose (z286591), B) membrana de celulose (z270814) C) acetato de celulose e D) nitrocelulose. Círculos azuis em A) e B) marcam os esporos nas fibras. (43x)

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor *point-of-care*– Resultados e Discussão

Os substratos escolhidos para o estudo são relativamente baratos e descartáveis, qualidades importantes para um dispositivo para análises em campo. O papel mais importante do substrato é ligar-se ao analito, prendendo o maior número de esporos e evitando que sejam retirados durante as outras etapas do ensaio. A Figura 3.19 A e B mostram fibras de celulose (papel de filtro comum) contendo alguns esporos retidos (círculo). A membrana de acetato de celulose (C) mostra uma superfície mais homogênea mesmo na mesma escala das fibras mas não é capaz de reter os esporos. De todas as membranas estudadas, a de nitrocelulose apresenta a maior afinidade aos esporos, Figura 3.19 (D), onde observam-se dezenas de esporos retidos na membrana de grande superfície devido à porosidade. Este fator pode contribuir com a imobilização do antígeno mas também a natureza do polímero determina boa parte de suas características de ligação. Membranas de nitrocelulose se ligam a proteínas e outros analitos por meio de interações entre o éster de nitrato e o forte dipolo presente nas biomoléculas, Figura 3.20. Ao se usar nitrocelulose, a alta afinidade esporo-membrana assegura a retenção do analito na membrana e apenas uma deposição e poucos minutos para a secagem são necessários para a fixação da amostra sem a necessidade de etapas adicionais de imobilização da amostra.

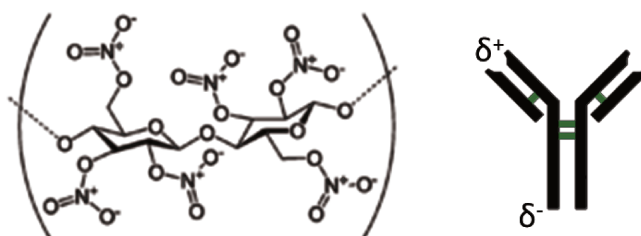


Figura 3.20: Estrutura da membrana de nitrocelulose (A) e o dipolo em anticorpos (B).

Um etapa importante da análise de um biossensor é a otimização do bloqueio. A etapa de bloqueio confere maior especificidade da análise pois evita as interações não específicas por adsorção e interações eletrostáticas do conjugado com o substrato. A molécula mais comum para bloqueio de imunoensaios e imunossensores é albumina de soro bovino, BSA. Na literatura existem outras

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor *point-of-care*– Resultados e Discussão

moléculas que são utilizadas como bloqueadoras, como leite desnatado, gelatina e glicina. Porém a molécula de BSA apresenta sempre resultados bons no bloqueio de diferentes sistemas de antígeno e anticorpo. Portanto, apesar de algumas moléculas necessitarem de menos tempo de incubação para o bloqueio, o uso do BSA agrega confiabilidade ao resultado e por isso ela foi escolhida para este dispositivo *point-of-care*. A medida de fluorescência com a variação do tempo da etapa de bloqueio está apresentada na Figura 3.21.

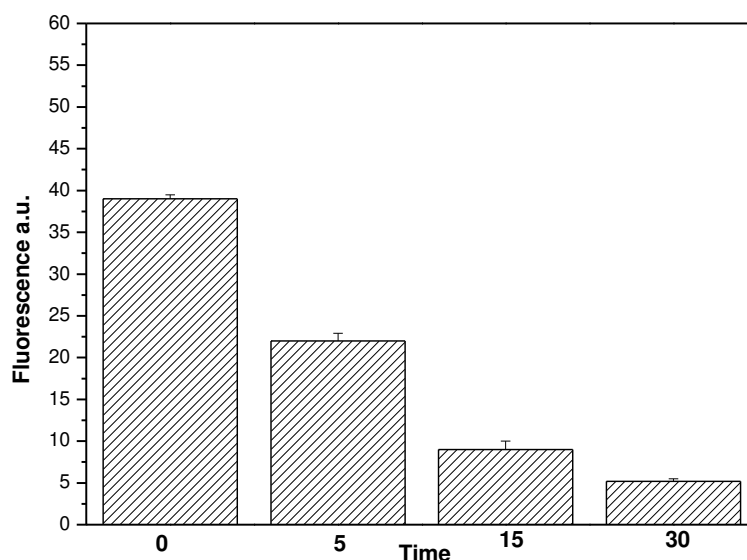


Figura 3.21: Sinal de fluorescência proveniente de interações não específicas versus o tempo de reação para bloqueio.

Foram estudados 4 tempos de bloqueio diferentes para um substrato sem amostra e foi medido o sinal fluorescente, o qual corresponde somente à interações não específicas entre o conjugado e o substrato. Como é possível ver no gráfico apresentado, o tempo de 30 minutos apresentou um sinal bastante baixo e foi escolhido para a etapa de bloqueio. O tempo de bloqueio para a nitrocelulose desse imunossensor é menor que para análises convencionais pelo método ELISA.

Determinações de faixa linear e o limite de detecção do imunossensor, foram obtidas a partir da construção de uma curva analítica por análises do substrato em papel por fluorímetro acoplado com uma fibra ótica (Miranda *et al.* 2013).

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor *point-of-care* – Resultados e Discussão

Diferentes concentrações do esporo (0,0032 – 32 $\mu\text{g/mL}$) foram depositadas em pedaços de 0,5 cm^2 da membrana de nitrocelulose. Depois das etapas de bloqueio, reação com conjugado e lavagem (Figura 3.18), foram obtidos espectros no próprio papel, Figura 3.22.

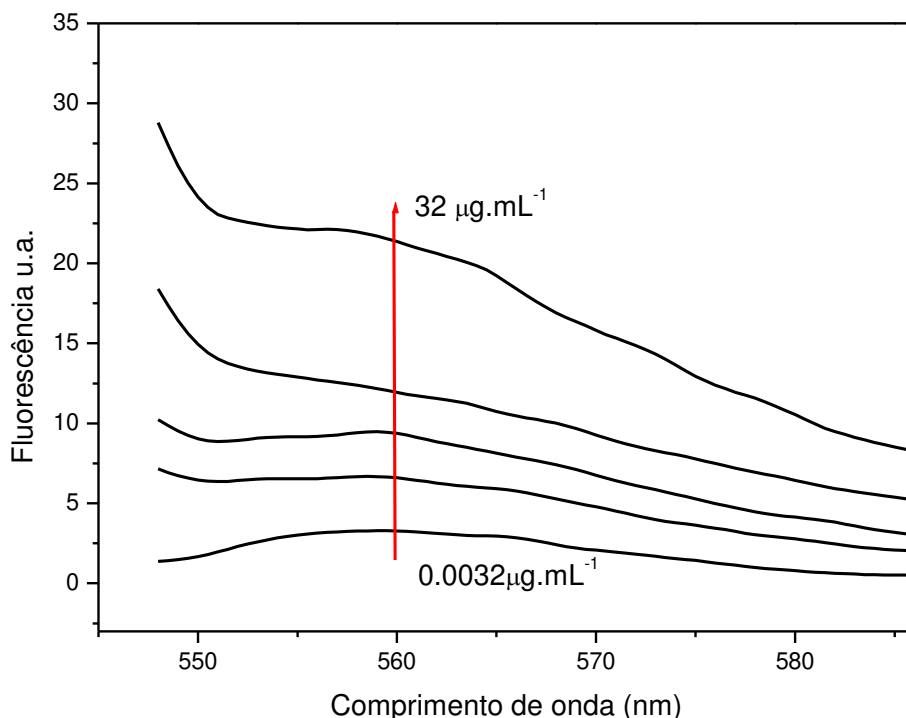


Figura 3.22: Espectros de emissão dos papéis após realização da análise ($\lambda_{\text{exc}}=560$ nm).

O comprimento de excitação é o da nanopartícula fluorescente escolhida, 540 nm e o comprimento de onda escolhido para a leitura de fluorescência para a curva analítica foi 560 nm. Com os dados obtidos foi traçada uma curva analítica apresentada na Figura 3.23. Observa-se que o sinal da fluorescência em função dos esporos não é linear, entretanto é linear contra o logaritmo da concentração, como mostrado no gráfico inserido da Figura 3.23.

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor *point-of-care*– Resultados e Discussão

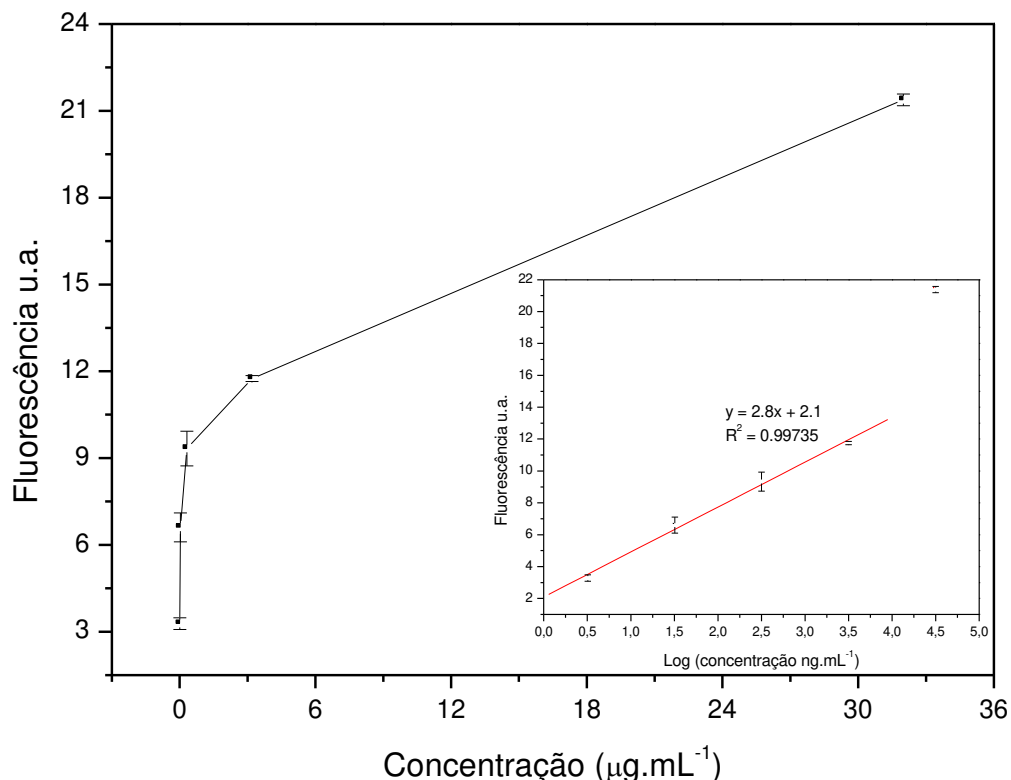


Figura 3.23: (A) Curva analítica para a detecção da ferrugem asiática da soja em papel. (B) Inset com a linearização da curva analítica (Fluorescência vs log da Concentração do esporo)

A curva é linear na faixa entre 0,0032 e 28 $\mu\text{g/L}$; o ponto 32 $\mu\text{g/mL}$ não pertence a curva traçada. Esse fato é comum em imunoenaios uma vez que a faixa de concentração é bastante larga, é comum a curva sigmoide e alcançar um ponto de saturação (32 $\mu\text{g/mL}$). O limite de detecção calculado para essa curva foi de 2,2 ng/mL e isso corresponde a aproximadamente 8-12 esporos/mL. Para este cálculo foi admitido que:

$$\text{LD} = 3 \sigma / b$$

Onde σ é o valor de desvio para $n=3$ e b é o coeficiente angular da reta obtida pelo ajuste dos dados. Até o momento, este é o limite de detecção mais

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor *point-of-care* – Resultados e Discussão

baixo encontrado na literatura, comparável a métodos como ELISA e PCR, e mais de mil vezes mais baixo que o kit disponível comercialmente. Uma tabela comparando estudos da literatura de análises para a detecção da ferrugem asiática da soja e o kit disponível comercialmente encontram-se na Tabela 3.2

Tabela 3.2: Comparação entre sensores encontrados na literatura e o kit comercial para a detecção da ferrugem asiática da soja.

Referência	Analito	Método de Detecção	Faixa linear	Limite de detecção
(Mendes <i>et al.</i> 2009a)	Micélio do fungo	Óptico SPR	3,5 – 28 $\mu\text{g/mL}$	800 (ng/mL)
(Mendes <i>et al.</i> 2009b)	Micélio do fungo	Eletroquímico Impedância	0,35 - 35 $\mu\text{g/mL}$	315 (ng/mL)
(Mendes <i>et al.</i> 2012)	Micélio do fungo	Eletroquímico	5 - 45 $\mu\text{g/mL}$	18 (ng/mL)
Kit comercial	Proteína não especificada	Colorimétrico	Não se aplica	3000 esporos
Este trabalho	Micélio do fungo	Fluorimétrico (instrumento)	0,0032 – 28 $\mu\text{g/mL}$	2,2 (ng/mL) $\approx$ 10 esporos
Este trabalho	Micélio do fungo	Fluorimétrico (Olho nu)	Não se aplica	64 (ng/mL) $\approx$ 300 esporos

O fato deste imunossensor ter alcançado um limite de detecção baixo pode ser atribuído a diversos fatores, recobrimento otimizado da nanopartícula marcadora com os anticorpos, o uso de espaçador, otimização da etapa do bloqueio e o sinal fluorescente intenso da nanopartícula. Este último altera bastante a detectabilidade dos sensores, é uma característica intrínseca da fluorescência de que a intensidade da radiação emitida é proporcional à intensidade da fonte usada, de acordo com Equação 3.1, onde F é a intensidade da fluorescência emitida, P_0 é a intensidade da fonte, P é a intensidade depois de atravessar o meio e K é uma constante dependente da eficiência quântica do fluoróforo. Portanto, a técnica de fluorescência é intrinsicamente mais sensível que a colorimétrica, uma vez que a absorbância é independente da intensidade da fonte.

$$F = K' (P_0 - P) \quad (\text{Equação 3.1})$$

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor *point-of-care*– Resultados e Discussão

Apesar do imunossensor ser bastante sensível e possuir um limite de detecção muito baixo ao se utilizar o espectrofluorímetro, isso não será possível em campo. Equipamentos caros como espectrofluorímetros e microscópios não estarão disponíveis. Por isso, um dispositivo foi proposto para realizar o teste em campo. Os passos necessários para a análise em campo estão resumidos na Figura 3.24. Primeiro, o fazendeiro cortaria a amostra de área aproximada de 5 cm², aproximadamente o tamanho de uma tampa de um tubo Eppendorf. Inseriria o pedaço de folha contaminada dentro do tubo e gotejaria tampão fosfato em pH 7,4 0,01mol/L que atuaria como extrator dos esporos. Essa dispersão é gotejada na membrana de celulose que está presa em um suporte de plástico e o ensaio correria como descrito anteriormente (Figura 3.18). No entanto, utiliza-se de um frasco para conter os reagentes para as etapas de bloqueio, enxágue e reação, uma foto do dispositivo está mostrada na Figura 3.25.

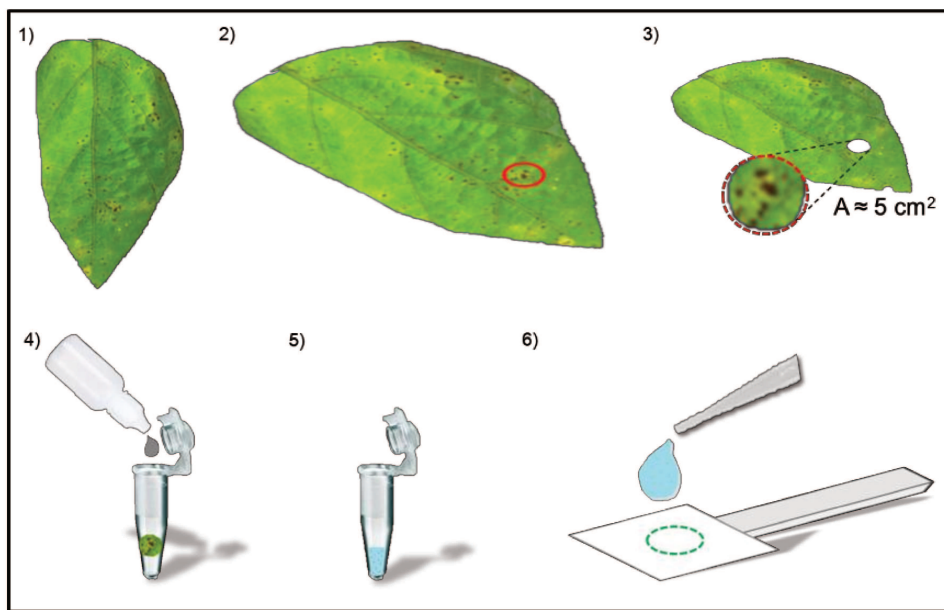


Figura 3.24: Esquema ilustrativo da análise realizada em campo.

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor *point-of-care* – Resultados e Discussão

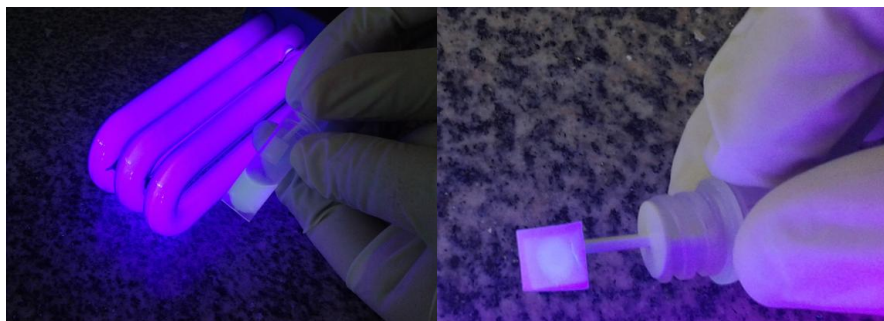


Figura 3.25: Fotos do dispositivo para aplicação em campo

A marcação da amostra é revelada com a ajuda de uma simples lâmpada UV. Ao utilizar a lâmpada como fonte de excitação e o sinal sendo detectado a olho nu (condições do experimento no campo), o limite de detecção aumenta para 64 ng/mL (por volta de 300 esporos). O aumento do LD pode ser atribuído à diminuição da intensidade da fonte de excitação e também à limitação da visão humana. Ainda assim, obteve-se um limite de detecção dez vezes menor que o kit comercial.

Para diagnósticos, a sensibilidade de uma análise ou dispositivo pode ser calculada de acordo com a Equação 3.2 a seguir:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{número de positivos}}{\text{número de positivos} + \text{números de falsos negativos}} \quad (\text{Equação 3.2})$$

A determinação da concentração limite correta, o *cut off*, é primordial para o dispositivo. Como o objetivo deste trabalho é a detecção precoce do esporo, escolheu-se o limite inferior da detecção a olho nu com a excitação de uma lâmpada UV. Portanto, *cut off* = 64 ng/mL e nesta concentração foi determinada a sensibilidade do dispositivo. A escolha de uma concentração maior *cut off* poderia levar a um grande número de falsos negativos. O número de falsos negativos, são os casos em que há a presença de 64 ng/mL do esporo mas não foi possível detectar visualmente. O valor obtido foi de 70% de sensibilidade com N=10. Esse é um valor alto considerando que a detecção é feita a olho nu em uma concentração

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor *point-of-care* – Resultados e Discussão

baixa de esporos. A sensibilidade de 70% agrega confiabilidade no dispositivo para a detecção de 64 ng/mL dos esporos, aproximadamente 300 esporos.

Muito se discute sobre a viabilidade de usar imunossensores para o desenvolvimento de dispositivos *point-of-care*, devido ao alto custo de produção dos anticorpos. No entanto, como a quantidade de anticorpo necessária para cada teste é muito pequena, o valor do teste feito em escala laboratorial ainda é acessível. A estimativa foi feita considerando que as nanopartículas e os anticorpos são os materiais mais caros para este dispositivo. O custo da membrana e da albumina são insignificantes em comparação aos outros. O custo aproximado da produção de anticorpos policlonais pela empresa (ProMab, Richmond, Estados Unidos da América) é US\$ 500-700 para dois coelhos imunizados na concentração de aproximadamente 1-2mg/mL. Considerando as quantidades usadas, descritas na seção 3.3.5, o teste custaria menos de US\$ 0,50. A Tabela 3.3 apresenta os valores. Os custos dos materiais diminuem quando a produção do teste passa para larga escala, como mostrado. Os valores foram baseados^{††} em dispositivos LFIA que são bem similares a este.

Tabela 3.3: Custo dos materiais e do dispositivo em escala laboratorial e em grande escala.

	Escala laboratorial	Grande escala
Nanopartículas	US\$ 0,16	US\$ 0,01
Anticorpo	US\$ 0,19	US\$ 0,02
TOTAL	TOTAL	
	US\$0,35	US\$0,03

O custo total do teste em grande escala ficaria em US\$ 0,03 o que é bem viável para um dispositivo *point-of-care*, acessível ao fazendeiro e poderia ajudar diminuir os prejuízos causados pela ferrugem asiática da soja.

^{††} (<http://www.bangslabs.com/sites/default/files/bangs/docs/pdf/303.pdf>) acessado em: 04/01/2013

3.5. Conclusões Parciais

Neste trabalho, nanopartículas foram aplicadas para o desenvolvimento de um sensor point-of-care. O grande desafio deste trabalho era a obtenção de um dispositivo que apresentasse uma melhor detectabilidade para o esporo do fungo da ferrugem asiática da soja e que ao mesmo tempo fosse simples e suficientemente independente de instrumentos para ser usado no campo pelo próprio fazendeiro. Para alcançar esses objetivos várias estratégias foram traçadas para o desenvolvimento do dispositivo.

A escolha de um imunossensor permite flexibilidade na escolha do analito. A detecção do esporo faz com que somente a presença do fungo na região possa ser detectada. Não há necessidade da infecção da planta para que seja monitorado um biomarcador indireto da doença. Por isso pode-se dizer que a detecção da ferrugem asiática da soja é precoce.

A escolha de nanopartículas como marcadores da reação de reconhecimento entre o anticorpo e o antígeno possibilitou:

- Maior probabilidade de reconhecimento do antígeno: a grande área superficial das nanopartículas permite que com o seu recobrimento, um maior número de anticorpos estejam disponíveis para a reação.
- Que o sinal da reação seja visível a olho nu. As nanopartículas de ouro possuem uma intensa coloração vermelha o que justifica sua vasta aplicação em dispositivos point-of-care. No entanto, para este sistema a detectabilidade não foi suficiente. Por isso, nanopartículas fluorescentes foram escolhidas como marcadores pois sabe-se que a técnica de fluorescência pode ser muito mais sensível que a colorimétrica. A detecção a olho nu é mantida mesmo assim porque as nanopartículas fluorescentes escolhidas emitem na região do visível.

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor *point-of-care* – Conclusões Parciais

- O limite de detecção mais baixo da literatura, 2,2 ng/mL, quando o resultado é lido por um espectrofluorímetro. Quando a detecção é pela visualização a olho nu o limite de detecção aumenta para 64 ng/mL, ainda assim dez vezes menor que o kit comercial disponível.
- As nanopartículas formam dispersões bastante estáveis, qualidade necessária para um maior tempo de prateleira do sensor.
- Um dispositivo sensível. A detecção a olho nu resultou em 70% de resultados positivos com excitação de uma lâmpada de UV simples. Isso é devido provavelmente a alta eficiência quântica dos fluoróforos usados nas nanopartículas.

O desenvolvimento da análise permitiu:

- Maior especificidade ao sensor. A otimização da etapa de bloqueio garante que o sinal emitido seja proveniente da reação de bioreconhecimento.
- Uma extração fácil dos esporos para que possa ser realizada em campo.
- Menor tempo de realização da análise. O resultado é obtido em menos de 2 horas enquanto análises de ELISA podem chegar a mais de 24 horas dependendo dos tempos de incubação.

O estudo dos melhores componentes para o dispositivo possibilitou:

- Uma contribuição na sensibilidade porque a membrana de nitrocelulose é capaz de reter o analito por toda a análise através da interação dos grupos nitro com o dipolo das biomoléculas.

Emprego de nanopartículas fluorescentes para o melhoramento da detectabilidade de um sensor *point-of-care* – Conclusões Parciais

- Que o dispositivo seja descartável; ao utilizar papel como substrato, não há problemas para ser descartado.
- A possível comercialização do sensor. Os baixos custos dos materiais escolhidos compensam a escolha de anticorpos como elementos de reconhecimento. O dispositivo custa menos de US\$ 0,50 em escala laboratorial. Diminuindo assim, o prejuízo do fazendeiro.

Considerações Finais e Perspectivas Futuras

4. Considerações Finais e Perspectivas Futuras

Estudos com nanomateriais aumentaram nos últimos anos devido às suas propriedades que são dependentes do tamanho da partícula. Este último, quando reduzido à escala nanométrica, além de outros efeitos, produz um aumento na relação área/volume. Eventos de superfícies são muito favorecidos, como reações de eletrocatalise e reconhecimento, o que justifica a intensa aplicação dos nanomateriais em sensores, sejam eles ópticos ou eletroquímicos. Geralmente observa-se um aumento da sensibilidade do sensor devido a um maior número de sítios disponíveis.

Este trabalho descreve a aplicação de nanomateriais para o melhoramento de dois sensores distintos. Um, consiste na inserção de nanopartículas de ouro ao hidróxido de níquel com o objetivo de obter um material com novas propriedades e principalmente de maior estabilidade da estrutura alfa do hidróxido de níquel. O segundo estudo apresentado se concentra na aplicação de nanopartículas como marcadores para o desenvolvimento de um imunossensor com maior detectabilidade para a ferrugem asiática da soja. Ambos apresentaram melhoramentos em seus desempenhos devido à aplicação de nanomateriais.

O hidróxido de níquel é um material muito estudado devido às suas diversas propriedades: eletrocromáticas, eletroquímicas (bateria) e eletrocatalíticas. Contudo, a extensa aplicação do hidróxido de níquel é limitada pela instabilidade da sua estrutura alfa. Pode-se encontrar diversos trabalhos na literatura que tem como objetivo resolver a instabilidade do hidróxido de níquel através de novas sínteses, morfologias, dopagens e compósitos. Até o momento nenhum estudo revolucionou esta área ainda. Contudo, discretos progressos são observados. Este trabalho vem a contribuir com esta pesquisa. A inserção de nanopartículas de ouro, de fato melhorou a estabilidade do processo de oxidação/redução do hidróxido de níquel. Ainda mais, a constante de velocidade de catálise da glicose é maior para o hidróxido de níquel com nanopartículas de ouro. Contudo, o esperado aumento da sensibilidade na detecção da glicose para o nanocompósito

Síntese e emprego de nanomateriais visando o desenvolvimento de sensores – Considerações Finais e Perspectivas Futuras

não foi observado. Os resultados obtidos ficaram no mesmo nível de outros trabalhos da literatura ($\mu\text{mol/L}$) e aquém do eletrodo de ouro (padrão para a determinação de carboidratos) que tem seu limite de detecção na região de pmol/L .

Contudo, ao se observar as publicações na área nota-se uma evolução do desempenho desses sensores sempre associado com a aplicação de nanoestruturas novas: nanotubos de carbono, nanopartículas de ouro e grafeno. Por isso, acredita-se que o sistema do hidróxido de níquel continuará com perspectivas e promessas para o seu melhoramento. Longe de ser o material ideal, vale a pena a investigação do comportamento do nanocompósito frente à detecção de carboidratos em sistemas em fluxo, como FIA e cromatografia. A combinação do novo material com a técnica *layer-by-layer* pode favorecer a imobilização do nanomaterial ao eletrodo para que ele resista ao intenso fluxo de eluente e produzir sistemas com menores limites de detecção.

A modificação da superfície da nanopartícula de níquel é ainda pouco explorada. Uma alternativa de funcionalização é usar os elétrons dos orbitais d do níquel para se ligar com os orbitais vazios do átomo de enxofre. Mercaptanas são excelentes alternativas para esta modificação. Uma nova funcionalização dos nanomateriais abre áreas diferentes para aplicação.

O domínio da funcionalização de superfícies é essencial para o desenvolvimento de sensores e biossensores. Esses últimos tem vantagens já bem estabelecidas, a especificidade de suas reações de reconhecimento são imbatíveis até os dias de hoje. Apesar de cada dia, materiais sintéticos se aproximarem mais de seus desempenhos. A flexibilidade da produção de anticorpos para diversos analitos permite o desenvolvimento de infinitos sensores. Desde doenças mundialmente estudadas como o câncer, às doenças negligenciadas do terceiro mundo, malária, dengue e etc. Aqui no Brasil, devido às condições climáticas, a lavoura da soja é muito atacada pela doença da ferrugem asiática. Mesmo sendo a soja um dos maiores commodities da economia brasileira, poucos estudos são encontrados na literatura com o objetivo de diminuir os prejuízos causados. A detecção precoce da presença desse patógeno na

Síntese e emprego de nanomateriais visando o desenvolvimento de sensores – Considerações Finais e Perspectivas Futuras

lavoura pode reduzir os prejuízos dos fazendeiros brasileiros. A aplicação de nanopartículas fluorescentes juntamente com a especificidade do anticorpo resultou no imunossensor com menor limite de detecção da literatura. Além disso, possibilitou a construção de um dispositivo point-of-care para que o próprio fazendeiro possa monitorar sua lavoura, detectar precocemente a presença do patógeno a um custo mais baixo.

Dispositivos point-of-care é uma tendência crescente no desenvolvimento de sensores para que análises possam ser realizadas in loco e rapidamente. Nesse sentido, há muitos aspectos desses dispositivos que devem ser estudados. Um deles é o desenvolvimento de elementos reconhecedores sintéticos que poderão contribuir na estabilidade e na viabilidade dos sensores. A imobilização desses fragmentos reconhecedores sintéticos em nanopartículas podem ser aplicados não somente em sensores mas também em sistemas de *drug-delivery* e em tratamentos personalizados de pacientes.

Após as considerações feitas, conclui-se que apesar de já muito explorada, a nanotecnologia ainda permeará as pesquisas em diversos campos. Ainda mais, as aplicações desses sistemas vão continuar revolucionando as soluções para os problemas do mundo atual.

Referências Bibliográficas

5. Referências Bibliográficas

Anker, J.N., Hall, W.P., Lyandres, O., Shah, N.C., Zhao, J., Van Duyne, R.P., 2008. Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nature Materials* 7(6).

Attridge, J.W., Daniels, P.B., Deacon, J.K., Robinson, G.A., Davidson, G.P., 1991. Sensitivity enhancement of optical immunosensors by the use of a surface-plasmon resonance fluoroimmunoassay. *Biosensors & Bioelectronics* 6(3), 201-214.

Bao, F., Li, J.-F., Ren, B., Yao, J.-L., Gu, R.-A., Tian, Z.-Q., 2008. Synthesis and characterization of Au@Co and Au@Ni core-shell nanoparticles and their applications in surface-enhanced Raman Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry C* 112(2).

Bard A.J.; Faulkner L.; *Electrochemical Methods – Fundamental and Applications*, 2nd ed. Wiley, New York, 2001.

Baysal-Gurel, F., Ivey, M.L.L., Dorrance, A., Luster, D., Frederick, R., Czarnecki, J., Boehm, M., Miller, S.A., 2008. An immunofluorescence assay to detect urediniospores of *Phakopsora pachyrhizi*. *Plant Disease* 92(10), 1387-1393.

Bloss, F.D.; *Crystallography and Crystal Chemistry: an introduction*, Mineralogical Society of America, 1994.

Bode, H., Dehmelt, K., Witte, J., 1969. Nickel hydroxide electrodes .2. Oxidation products of nickel (2) Hydroxides. *Zeitschrift Fur Anorganische Und Allgemeine Chemie* 366(1-2), 1-&.

Cao, G.; *Nanostructures and nanomaterials: synthesis, properties and applications*, Imperial College, London, 2004.

Carpenter, M.K., Corrigan, D.A., 1988. Photoelectrochemistry of nickel-hydroxide thin-films. *Journal of the Electrochemical Society* 135(3), C155-C155.

Carrilho, E., Martinez, A.W., Whitesides, G.M., Patterning porous, hydrophilic substrate e.g. chromatography paper into hydrophobic and hydrophilic regions involves disposing wax material onto substrate in predetermined pattern, and heating the substrate to melt the wax material. Harvard College.

Cataldi, T.R.I., Campa, C., De Benedetto, G.E., 2000. Carbohydrate analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed

amperometric detection: The potential is still growing. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 368(8), 739-758.

Cheng, C.-M., Martinez, A.W., Gong, J., Mace, C.R., Phillips, S.T., Carrilho, E., Mirica, K.A., Whitesides, G.M., 2010. Paper-Based ELISA. *Angewandte Chemie-International Edition* 49(28), 4771-4774.

Chin, C.D., Linder, V., Sia, S.K., 2007. Lab-on-a-chip devices for global health: Past studies and future opportunities. *Lab on a Chip* 7(1), 41-57.

Chin, C.D., Linder, V., Sia, S.K., 2012. Commercialization of microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab on a Chip* 12, 2118-2134.

Corrigan, D.A., Bendert, R.M., 1988. Effect of coprecipitated metal-ions on the electrochemistry of nickel-hydroxide thin-films – cyclic voltammetry in 1M KOH. *Journal of the Electrochemical Society* 135(3), C156-C156.

de la Rica, R., Aili, D., Stevens, M.M., 2012. Enzyme-responsive nanoparticles for drug release and diagnostics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64(11), 967-978.

Danaee, I., Jafarian, M., Forouzandeh, F., Gobal, F., 2012. Kinetic studies of glucose electrocatalytic oxidation on GC/Ni electrode. *International Journal of Chemical Kinetics* 44(11), 712-721.

Dutra, R., Kubota, L., 2007. An SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyl-dextran-modified gold chip. *Clinica Chimica Acta* 376(1-2), 114-120.

Elahi, M.Y., Heli, H., Bathaie, S.Z., Mousavi, M.F., 2007. Electrocatalytic oxidation of glucose at a Ni-curcumin modified glassy carbon electrode. *Journal of Solid State Electrochemistry* 11(2), 273-282.

Ellerbee, A.K., Phillips, S.T., Siegel, A.C., Mirica, K.A., Martinez, A.W., Striehl, P., Jain, N., Prentiss, M., Whitesides, G.M., 2009. Quantifying Colorimetric Assays in Paper-Based Microfluidic Devices by Measuring the Transmission of Light through Paper. *Analytical Chemistry* 81(20), 8447-8452.

Ferreira, D., Mendes, R., Kubota, L., 2010. Kinetic Studies of HRP Adsorption on ds-DNA Immobilized on Gold Electrode Surface by EIS and SPR. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 21(9), 1648-1655.

Frederick, R.D., Snyder, C.L., Peterson, G.L., Bonde, M.R., 2002. Polymerase chain reaction assays for the detection and discrimination of the soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P-meibomia*. *Phytopathology* 92(2), 217-227.

Furtado, G.Q., Gomes Moraes, S.R., Meirelles Alves, S.A., Amorim, L., Massola Junior, N.S., 2011. The Infection of Soybean Leaves by *Phakopsora pachyrhizi* during Conditions of Discontinuous Wetness. *Journal of Phytopathology* 159(3), 165-170.

Giljohann, D.A., Mirkin, C.A., 2009. Drivers of biodiagnostic development. *Nature* 462(7272), 461-464.

Goellner, K., Loehrer, M., Langenbach, C., Conrath, U., Koch, E., Schaffrath, U., 2010. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. *Molecular Plant Pathology* 11(2), 169-177.

Grieshaber, D., MacKenzie, R., Voeroes, J., Reimhult, E., 2008. Electrochemical biosensors - Sensor principles and architectures. *Sensors* 8(3).

Gubala, V., Harris, L.F., Ricco, A.J., Tan, M.X., Williams, D.E., 2012. Point of Care Diagnostics: Status and Future. *Analytical Chemistry* 84(2), 487-515.

Guan, X.-y., Deng, J.-C., 2007. Preparation and electrochemical performance of nano-scale nickel hydroxide with different shapes. *Materials Letters* 61(3), 621-625.

Guo, S., Wen, D., Zhai, Y., Dong, S., Wang, E., 2010. Platinum Nanoparticle Ensemble-on-Graphene Hybrid Nanosheet: One-Pot, Rapid Synthesis, and Used as New Electrode Material for Electrochemical Sensing. *Acs Nano* 4(7), 3959-3968.

Haeberle, S., Zengerle, R., 2007. Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications. *Lab on a Chip* 7(9), 1094-1110.

Han, J.H., Choi, H.N., Park, S., Chung, T.D., Lee, W.-Y., 2010. Mesoporous Platinum Electrodes for Amperometric Determination of Sugars with Anion Exchange Chromatography. *Analytical Sciences* 26(9), 995-1000.

Han, M., Gao, X., Su, J.Z., Nie, S., 2001. Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. *Nature Biotechnology* 19, 631–635

Huang, J.-F., 2009. Facile preparation of an ultrathin nickel film coated nanoporous gold electrode with the unique catalytic activity to oxidation of glucose. *Chemical Communications*(10), 1270-1272.

Ida, S., Shiga, D., Koinuma, M., Matsumoto, Y., 2008. Synthesis of Hexagonal Nickel Hydroxide Nanosheets by Exfoliation of Layered Nickel Hydroxide Intercalated with Dodecyl Sulfate Ions. *Journal of American Chemical Society* 130, 14038-14039.

Jafarian, M., Forouzandeh, F., Danaee, I., Gobal, F., Mahjani, M.G., 2009. Electrocatalytic oxidation of glucose on Ni and NiCu alloy modified glassy carbon electrode. *Journal of Solid State Electrochemistry* 13(8), 1171-1179.

Karim-Nezhad, G., Hasanzadeh, M., Saghatforoush, L., Shadjou, N., Earshad, S., Khalilzadeh, B., 2009. Kinetic Study of Electrocatalytic Oxidation of Carbohydrates on Cobalt Hydroxide Modified Glassy Carbon Electrode. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 20(1), 141-151.

Katz, E. e Willner I., 2004. Integrated Nanoparticle-Biomolecule Hybrid Systems: Synthesis, Properties and Applications. *Angewandte Chemie* 43, 6042-6108.

Kumary, V.A., Nancy, T.E.M., Divya, J., Sreevalsan, K., 2013. Nonenzymatic Glucose Sensor: Glassy Carbon Electrode Modified with Graphene-Nickel/Nickel Oxide Composite. *International Journal of Electrochemical Science* 8(2), 2220-2228.

Lacourse, W.R., Johnson, D.C., 1993. Optimization of wave-forms for pulsed amperometric detection of carbohydrates based on pulsed voltammetry. *Analytical Chemistry* 65(1), 50-55.

Lang, J.-W., Kong, L.-B., Wu, W.-J., Luo, Y.-C., Kang, L., 2008. Facile approach to prepare loose-packed NiO nano-flakes materials for supercapacitors. *Chemical Communications*(35), 4213-4215.

Liang, Z.H., Zhu, Y.J., Hu, X.L., 2004. beta-nickel hydroxide nanosheets and their thermal decomposition to nickel oxide nanosheets. *Journal of Physical Chemistry B* 108(11), 3488-3491.

Liang, C.-H., Wang, C.-C., Lin, Y.-C., Chen, C.-H., Wong, C.-H., Wu, C.-Y., 2009. Iron Oxide/Gold Core/Shell Nanoparticles for Ultrasensitive Detection of Carbohydrate-Protein Interactions. *Analytical Chemistry* 81(18), 7750-7756.

Linares, E.M., Kubota, L.T., Michaelis, J., Thalhammer, S., 2012. Enhancement of the detection limit for lateral flow immunoassays: Evaluation and comparison of bioconjugates. *Journal of Immunological Methods* 375(1-2), 264-270.

Linares, E.M., Palermo, L.T., Moreira, A.B., T Sotomayor, M.D.P., Kubota, L.T., 2007. A fluorescence spot test for salicylate determination. *Analytical Letters* 40(3), 573-583.

Linares, E.M., Pannuti, C.S., Kubota, L.T., Thalhammer, S., 2013. Immunospot assay based on fluorescent nanoparticles for Dengue fever detection. *Biosensors & Bioelectronics* 41, 180-185.

Liu, C., Li, Y., 2009. Synthesis and characterization of amorphous alpha-nickel hydroxide. *Journal of Alloys and Compounds* 478(1-2), 415-418.

Lu, B., Smyth, M.R., Okennedy, R., 1996. Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors. *Analyst* 121(3), R29-R32.

Luo, Y., Li, G., Duan, G., Zhang L., 2006. One-step synthesis of spherical α -Ni(OH)₂ nanoarchitectures. *Nanotechnology* 17, 4278-4283.

Luo, Z., Yin, S., Wang, K., Li, H., Wang, L., Xu, H., Xia, J., 2012. Synthesis of one-dimensional beta-Ni(OH)₂ nanostructure and their application as nonenzymatic glucose sensors. *Materials Chemistry and Physics* 132(2-3), 387-394.

Luppa, P.B., Sokoll, L.J., Chan, D.W., 2001. Immunosensors - principles and applications to clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta* 314(1-2), 1-26.

Mark, D., Haeberle, S., Roth, G., von Stetten, F., Zengerle, R., 2010. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. *Chemical Society Reviews* 39(3), 1153-1182.

Martinez, A.W., Phillips, S.T., Butte, M.J., Whitesides, G.M., 2007. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angewandte Chemie-International Edition* 46(8), 1318-1320.

Martinez, A.W., Phillips, S.T., Nie, Z., Cheng, C.-M., Carrilho, E., Wiley, B.J., Whitesides, G.M., 2010. Programmable diagnostic devices made from paper and tape. *Lab on a Chip* 10(19), 2499-2504.

Matsui, J., Akamatsu, K., Nishiguchi, S., Miyoshi, D., Nawafune, H., Tamaki, K., Sugimoto, N., 2004. Composite of Au nanoparticles and molecularly imprinted polymer as a sensing material. *Analytical Chemistry* 76(5), 1310-1315.

Mendes, R., Carvalhal, R., Stach-Machado, D., Kubota, L., 2009a. Surface plasmon resonance immunosensor for early diagnosis of Asian rust on soybean leaves. *Biosensors & Bioelectronics* 24(8), 2483-2487.

Mendes, R., Ferreira, D., Carvalhal, R., Peroni, L., Stach-Machado, D., Kubota, L., 2009b. Development of an Electrochemical Immunosensor for *Phakopsora pachyrhizi* Detection in the Early Diagnosis of Soybean Rust. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 20(4), 795-801.

Mendes, R.K., Laschi, S., Stach-Machado, D.R., Kubota, L.T., Marrazza, G., 2012. A disposable voltammetric immunosensor based on magnetic beads for early diagnosis of soybean rust. *Sensors and Actuators B-Chemical* 166, 135-140.

Merkoçi A., 2010. Nanoparticles-based strategies for DNA, protein and cell sensors. *Biosensors and Bioelectronics* 26(4), 1164-1177.

Morales-Narvaez, E., Merkoci, A., 2012. Graphene Oxide as an Optical Biosensing Platform. *Advanced Materials* 24(25).

Ojani, R., Raoof, J.-B., Fathi, S., 2008. Electrocatalytic oxidation of some carbohydrates by nickel/poly(o-aminophenol) modified carbon paste electrode. *Electroanalysis* 20(16), 1825-1830.

Oliva, P., Leonardi, J., Laurent, J.F., Delmas, C., Braconnier, J.J., Figlarz, M., Fievet, F., Deguibert, A., 1982. Review of the structure and the electrochemistry of nickel hydroxides and oxy-hydroxides. *Journal of Power Sources* 8(2-3), 229-255.

Parolo, C., Merkoçi, A., 2013. Paper-based nanobiosensors for diagnostics. *Chemical Society Reviews* 42, 450-457.

Peeling, R.W., Mabey, D., 2010. Point-of-care tests for diagnosing infections in the developing world. *Clinical Microbiology and Infection* 16(8), 1062-1069.

Pensa, E., Cortes, E., Corthey, G., Carro, P., Vericat, C., Fonticelli, M.H., Benitez, G., Rubert, A.A., Salvarezza, R.C., 2012. The Chemistry of the Sulfur-Gold Interface: In Search of a Unified Model. *Accounts of Chemical Research* 45(8).

Perez-Lopez, B., Merkoçi, A., 2012. Carbon nanotubes and graphene in analytical sciences. *Microchimica Acta* 179(1-2).

Perfezou, M., Turner, A., Merkoçi, A., 2012. Cancer detection using nanoparticle-based sensors. *Chemical Society Reviews* 41(7).

Pingarron, J.M., Yanez-Sedeno, P., Gonzalez-Cortes, A., 2008. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Electrochimica Acta* 53(19).

Pumera, M., Ambrosi, A., Bonanni, A., Chng, E.L.K., Poh, H.L., 2010. Graphene for electrochemical sensing and biosensing. *Trends in Analytical Chemistry* 29(9), 954-965.

Qi, J., Xu, P., Lv, Z., Liu, X., Wen, A., 2008. Effect of crystallinity on the electrochemical performance of nanometer Al-stabilized alpha-nickel hydroxide. *Journal of Alloys and Compounds* 462(1-2), 164-169.

Qiao, N., Zheng, J., 2012. Nonenzymatic glucose sensor based on glassy carbon electrode modified with a nanocomposite composed of nickel hydroxide and graphene. *Microchimica Acta* 177(1-2), 103-109.

Ribeiro, A.S., Moreira, J.U.V., Pierozzi, P.H.B., Rachid, B.F., De Toledo, J.F.F., Arias, C.A.A., Soares, R.M., Godoy, C.V., 2007. Genetic control of Asian rust in soybean. *Euphytica* 157(1-2), 15-25.

Safavi, A., Maleki, N., Farjami, E., 2009. Fabrication of a glucose sensor based on a novel nanocomposite electrode. *Biosensors & Bioelectronics* 24(6), 1655-1660.

Salvati-Niasari, M., Seyghalkar, H., Amiri, O., Davar, F., 2013. Simple Hydrothermal Synthesis of Nickel Hydroxide Flower-Like Nanostructures. *Journal of Cluster Science* 24, 365-376.

Scherm, H., Christiano, R.S.C., Esker, P.D., Del Ponte, E.M., Godoy, C.V., 2009. Quantitative review of fungicide efficacy trials for managing soybean rust in Brazil. *Crop Protection* 28(9), 774-782.

Schnepf, R., 2005. *The Library of Congress* 32225, 1–11

Skottrup, P.D., Nicolaisen, M., Justesen, A.F., 2008. Towards on-site pathogen detection using antibody-based sensors. *Biosensors & Bioelectronics* 24(3), 339-348.

Smart, L.E. and Moore E.A.; *Solid State Chemistry: an introduction*, Taylor and Francis, Boca Raton, 2005.

Vidotti, M., Cerri, C., Carvalhal, R., Dias, J., Mendes, R., de Torresi, S., Kubota, L., 2009a. Nickel hydroxide electrodes as amperometric detectors for carbohydrates in flow injection analysis and liquid chromatography. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 636(1-2), 18-23.

Vidotti, M., Salvador, R.P., de Torresi, S.I.C., 2009b. Synthesis and characterization of stable Co and Cd doped nickel hydroxide nanoparticles for electrochemical applications. *Ultrasonics Sonochemistry* 16(1), 35-40.

Vidotti, M., Torresi, R., Cordoba de Torresi, S.I., 2010. Nickel hydroxide modified electrodes: a review study concerning its structural and electrochemical properties aiming the application in electrocatalysis, electrochromism and secondary batteries. *Quimica Nova* 33(10), 2176-2186.

Wang, J., 2005. Nanomaterial-based electrochemical biosensors. *The Analyst* 130, 421-426.

Wang J., Pang, H., Yin, J., Guan, L., Lu, Q., Gao, F., 2010. Controlled fabrication and property studies of nickel hydroxide and nickel oxide nanostructures. *CrystEngComm* 12, 1404-1409.

Wang, Y., Zhu, Q., Zhang, H., 2005. Fabrication of b-Ni(OH)₂ and NiO hollow spheres by a facile template- free process. *Chemical Communications* 5231-5233.

Síntese e emprego de nanomateriais visando o desenvolvimento de sensores – Referências

West, A.R.; Basic Solid State Chemistry; 2^a ed, Chichester, John Wiley, 1999.

West, Donald M.; Holler, F. James; Skoog, Douglas; Fundamentos de Química Analítica; 8^a ed, Thomson, 2006.

West, J.L., Halas, N.J., 2003. Engineered nanomaterials for biophotonics applications: Improving sensing, imaging, and therapeutics. Annual Review of Biomedical Engineering 5, 285-292.

Xie, X., Xu, W., Liu, X., 2012. Improving Colorimetric Assays through Protein Enzyme-Assisted Gold Nanoparticle Amplification. Accounts of Chemical Research 45(9).

Yang, L.-X., Zhu, Y.-J., Tong, H., Liang, Z.-H., Li, L., Zhang, L., 2007. Hydrothermal synthesis of nickel hydroxide nanostructures in mixed solvents of water and alcohol. Journal of Solid State Chemistry 180(7), 2095-2101.

Yi, Q., Huang, W., Yu, W., Li, L., Liu, X., 2008. Hydrothermal synthesis of titanium-supported nickel nanoflakes for electrochemical oxidation of glucose. Electroanalysis 20(18), 2016-2022.

Yu, M., Liu, J., Li, S., 2006. Preparation and characterization of highly ordered NiO nanowire arrays by sol-gel template method. Materials 13(2) 169-173.

Zhang, L., Blom, D.A., Wang, H., 2011. Au-Cu₂O Core-Shell Nanoparticles: A Hybrid Metal-Semiconductor Heteronanostructure with Geometrically Tunable Optical Properties. Chemistry of Materials 23(20), 4587-4598.