Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos

Leonardo Eidi Okamoto Iwaki

**Nanofibras Eletrofiadas de Poliamida 6 e Polialilamina
Hidrociorada Funcionalizadas com Nanotubos de
Carbono e Nanopartículas de Ouro Aplicadas em
Sensores e Biossensores.**

São Carlos

2017

LEONARDO EIDI OKAMOTO IWAKI

**Nanofibras Eletrofiadas de Poliamida 6 e Polialilamina
Hidroclorada Funcionalizadas com Nanotubos de
Carbono e Nanopartículas de Ouro Aplicadas em
Sensores e Biossensores.**

Versão Corrigida (Original na Unidade)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr.

São Carlos

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

I97n Iwaki, Leonardo Eidi Okamoto
Nanofibras Eletrofiadas de Poliamida 6 e
Polialilamina Hidroclorada Funcionalizadas com
Nanotubos de Carbono e Nanopartículas de Ouro Aplicadas
em Sensores e Biossensores / Leonardo Eidi Okamoto
Iwaki; orientador Osvaldo Novaes de Oliveira Junior.
São Carlos, 2017.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Engenharia de Materiais e Área de
Concentração em Desenvolvimento, Caracterização e
Aplicação de Materiais -- Escola de Engenharia de São
Carlos da Universidade de São Paulo, 2017.

1. Nanofibras . 2. Eletrofiação. 3. Sensores. 4.
Nanotubos de carbono. 5. Nanopartículas de ouro. I.
Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: **LEONARDO EIDI OKAMOTO IWAKI**

Título da tese: "Nanofibras eletrofiadas de Poliamida 6 e polialilamina hidroclorada funcionalizadas com nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro aplicadas em sensores e biossensores"

Data da defesa: 05.09.2017

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Titular **Osvaldo Novais de Oliveira Junior**
(Orientador)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

APROVADO

Profª. Drª. **Marli Leite de Moraes**
(Universidade Federal de São Paulo/Unifesp – São José dos Campos)

APROVADO

Profª. Associada **Débora Gonçalves**
(Instituto de Física de São Carlos/IFSC)

APROVADO

Dr. **Luiz Henrique Capparelli Mattoso**
(Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Embrapa)

APROVADO

Draª. **Ligia Maria Manzine Costa**
(Pós-doutoranda/Capes)

APROVADO

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais:

Prof. Titular **Antonio José Felix de Carvalho**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Associado **Luis Fernando Costa Alberto**

Dedico esta Tese aos meus pais e irmãos que sempre me apoiaram.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr. (Chu) por aceitar a me orientar e a acreditar no meu trabalho e seguir me apoiando na realização de todas as etapas deste doutoramento.

Ao Dr. Daniel Corrêa por me oferecer todo suporte e orientação na obtenção das nanofibras e na fabricação dos sensores.

Ao Prof. Dr. Valtencir Zucolotto (Xuxa) por me ter me ensinado sobre os biossensores e os nanomateriais.

Aos técnicos e amigos do Grupo de Polímeros Bernhard Gross pelos muitos auxílios e discussões descontraídas que contribuíram em muito para minha formação acadêmica e pessoal: Débora, Bruno, Marcos, Bertho, Níbio, Ademir, Si, Rô, Felipe, Analine, Andrey, Juliana, Val, Vana, Olívia, Cris, Makoto, Lorena, Simone, Jorge, Heveline, Diogo, Adriano, Josi, Livia, Fran e Daniel Roger.

Aos técnicos e amigos da Embrapa Instrumentação que sempre se prontificaram a me ajudar mesmo eu não estando presente diariamente: Adriana, Viviane, Silvine, Alice, Mattêo, Ferrazini, Luiza, Murilo, Danilo, Fernanda, Kel, Alexandra, Idelma, Drika, Rafa Sanfelice, Rafa Silveira, Rafa Takehara, Stanley, Vanessa, Marcos, Jéssica, Camila e Geraldine.

Aos amigos do Laboratório de Nanomedicina e Nanotoxicologia (GNano): Juliana, Fabrício, Camilo, Ieda, Edson, Nirton, Lilian, Valéria, Henrique e Cris.

Aos técnicos do Laboratório de Biofísica Molecular “Sergio Mascarenhas”, Andrezza, Fernando e Bel.

À galera de Sanca: Dilleys, Keiko, Kaori, Yu, Rô, Javier, Maria

À Thereza e o Jorge por apoiarem e me ajudarem tanto em Sorocaba.

Aos irmãos de república: Janderson, Yu, Vitor, Juliano, Henrique e Daniel.

À USP e à Embrapa pela excelente infraestrutura cedida, corpo de docentes, pesquisadores e funcionários que juntos permitiram que este trabalho se realizasse.

Ao Hospital de Câncer de Barretos em ceder as amostras de células de pacientes.

Ao Victor Barioto da secretaria do PGrCEM pela paciência e grande ajuda

A todos do Laboratório de Materiais Nucleares (LABMAT) do Centro Tecnológico da Marinha em São Paulo (CTMSP) pela oportunidade de realizar este trabalho e em especial aos membros do laboratório químico que tiveram de cobrir minha ausência das atividades do laboratório durante as sextas-feiras: Ieda, Luís, Dri, Nilton, Flor, Fran, Talita e Erica.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP

A Todos que contribuíram com este trabalho direta e indiretamente.

Aquele que luta com monstros deve acautelar-se;
para não tornar-se também um monstro.
Quando se olha muito tempo para um abismo,
o abismo olha para você.
-Friedrich Wilhelm Nietzsche “*Além do Bem e do Mal.*”

Resumo

IWAKI, L. E. O. **Nanofibras Eletrofiadas de Poliamida 6 e Polialilamina Hidroclorada Funcionalizadas com Nanotubos de Carbono e Nanopartículas de Ouro Aplicadas em Sensores e Biossensores.** 99 p. Tese de Doutorado – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2017.

Nanofibras poliméricas obtidas por eletrofiação possuem alta relação superfície-volume, e podem ser recobertas com nanomateriais que interajam com os grupos funcionais dos polímeros. Neste trabalho, nanofibras de poliamida 6/ polialilamina hidroclorada (PA6/PAH) com diâmetro da ordem de 100 nm e sem defeitos foram recobertas com nanotubos de carbono (CNTs) e nanopartículas de ouro (AuNPs) para produzir sensores e biossensores. A versatilidade da plataforma com as nanofibras foi demonstrada com três aplicações distintas. A adsorção de CNTs sobre as nanofibras permitiu a detecção do neurotransmissor dopamina com medidas de voltametria de pulso diferencial com sensibilidade na faixa de 1 a 70 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e limite de detecção de 0,15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, sem interferência do ácido úrico e ácido ascórbico. Nos imunossensores para detectar o antígeno CA 19-9, biomarcador para câncer de pâncreas, as nanofibras de PA6/PAH recobertas com CNTs ou AuNPs receberam camada adicional do anticorpo anti-CA 19-9. Usando medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica, esses imunossensores puderam detectar CA 19-9 em tampão e em soro de sangue de pacientes de câncer com diferentes probabilidades de desenvolver câncer de pâncreas. A seletividade dos imunossensores também foi testada com possíveis interferentes no sangue. Na terceira aplicação, obteve-se sinergia com a codeposição de CNTs e AuNPs sobre as nanofibras para a formação de um biossensor contendo uma camada da enzima tirosinase. Imagens de microscopia eletrônica mostraram uma estrutura 3D interconectada, formada pelas nanofibras de PA6/PAH, AuNPs e CNTs. O biossensor foi usado para detectar bisfenol A com cronoamperometria na faixa de 0,05 a 1,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e limite de detecção de 8 nmol.L^{-1} . Conclui-se que nanofibras poliméricas constituem excelente plataforma para sensores e biossensores pela possibilidade de incorporação de outros nanomateriais para aplicações específicas.

Palavras-Chave: Nanofibras, Eletrofiação, Sensores, Nanotubos de Carbono, Nanopartículas de Ouro

Abstract

IWAKI, L. E. O. **Electrospun Polyamide 6/Poly(allylamine hydrochloride) Nanofibers Functionalized with Carbon Nanotubes and Gold Nanoparticles Applied in Sensing and Biosensing.** 99 p. – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2017.

Electrospun polymer nanofibers have a high surface-volume ratio, and can be coated with nanomaterials that interact with the functional groups of the polymers. In this work, defect-free nanofibers of polyamide 6/polyallylamine hydrochloride (PA6/PAH) with a diameter of ca. 100 nm were coated with carbon nanotubes (CNTs) and gold nanoparticles (AuNPs) to produce sensors and biosensors. The versatility of the platform with nanofibers has been demonstrated with three distinct applications. The adsorption of CNTs on the nanofibers allowed the detection of the neurotransmitter dopamine with differential pulse voltammetry measurements with sensitivity in the range of 1 to 70 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ and detection limit of 0.15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, without interference of uric acid and ascorbic acid. In the immunosensors to detect CA 19-9 antigen, biomarker for pancreatic cancer, PA6/PAH nanofibers coated with CNTs or gold nanoparticles (AuNPs) received an additional layer of anti-CA 19-9 antibody. Using electrochemical impedance spectroscopy measurements, these immunosensors were able to detect CA 19-9 in buffer and in blood serum from cancer patients with different probabilities of developing pancreatic cancer. The selectivity of the immunosensors was also tested with possible interferents in the blood. In the third application, synergy was obtained with co-deposition of CNTs and AuNPs on the nanofibers for the formation of a biosensor containing a layer of the enzyme tyrosinase. Electron microscopy images showed an interconnected 3D structure, formed by PA6/PAH nanofibers, AuNPs and CNTs. The biosensor was used to detect bisphenol A with chronoamperometry in the range of 0.05 to 1.1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ and detection limit of 8 nmol.L^{-1} . It is concluded that polymer nanofibers are an excellent platform for sensors and biosensors because of the possible incorporation of other nanomaterials for specific applications.

Keywords: Nanofibers, Electrospinning, Sensors, Carbon Nanotubes, Gold Nanoparticles

Lista de Abreviações

AuNps.....	Nanopartículas de Ouro
AFM	Microscopia de Força Atômica
BPA.....	Bisfenol A
BSA.....	Proteína albumina do soro bovino
DA.....	Dopamina
DSC.....	Calorimetria Diferencial de Varredura
EIE.....	Espectroscopia de Impedância Elétrica
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
EDC.....	1-etil-3-(3–dimetilaminopropil) carbodiimida
HFIP.....	Hexafluoro-2-propanol
MWCNTS.....	Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas
MUA.....	Ácido 11-mercaptoundecanóico
NHS.....	N-hidroxissuccinimida
PA6.....	Poliamida 6
PAH.....	Polialilamina hidrocloreada
PLA.....	Poliácido láctico
PMMA.....	Polimetilmetacrilato
PM-IRRAS.....	Espectroscopia de Reflexão-Absorção na Região do Infravermelho com Modulação da Polarização
PVA	Álcool polivinílico
PVC.....	Policloreto de vinila
PS.....	Poliestireno
TGA.....	Análise Termogravimétrica

Lista de Figuras

Figura 1 Principais componentes de aparato de eletrofiação. Modificado de [27]....	32
Figura 2 Etapas de formação do jato polimérico: a) Tensão superficial b) e c) gota polimérica carregada pelo campo elétrico d) distorção da gota e formação do Cone de Taylor e) Cone de Taylor e jato ejetado a partir da extremidade do Cone. a,b,c e d modificado de [30], figura e retirada de [31]	33
Figura 3 Nanofibras contendo defeitos tipo gota (do inglês “beads”) [35]	34
Figura 4 Representação esquemática das regiões de formação da fibra a partir da agulha do capilar. Processo de formação do jato polimérico a partir do cone de Taylor (inset). Modificado de [36] e [37]	35
Figura 5 Diferentes tipos de nanofibras por eletrofiação: coaxiais (<i>core-shell</i>) (a) [61], porosas [3] (b), poliméricas (c) [62], alinhadas (d) [63].	41
Figura 6 Principais elementos de um biossensor e alguns dos seus componentes [110].	43
Figura 7. CNTs de parede simples (SWCNT) e Múltiplas paredes (MWCNT)	44
Figura 8. Estruturas dos CNTs: <i>Armchair</i> (a) <i>Zig-Zag</i> (b) e Quiral (c).[116]	45
Figura 9 Estrutura Química do Bisfenol A (BPA)	48
Figura 10. Imagens de MEV das nanofibras de PA6/PAH obtidas com variação da tensão aplicada e da distância da agulha ao coletor. Condições: a) 15 kV e 3 cm, b) 15 kV e 10 cm, c) 20 kV e 3 cm, d) 20 kV e 10 cm, e) 25 kV e 3 cm e f) 25 kV e 10 cm. A taxa de ejeção e o diâmetro interno da agulha foram mantidos constantes ...	58
Figura 11. Imagem de MEV das nanofibras de PA6. Condições: d = 10 cm, tensão de 25 kV, vazão = 0,01 mL/h.	59
Figura 12. Espectro na região do infravermelho das nanofibras de PA6 (linha contínua) e de PA6/PAH (linha tracejada).	60
Figura 13. (a) Termogramas e (b) curvas de DSC das nanofibras de PA6 (linha contínua) e de PA6/PAH (linha tracejada).	61
Figura 14. Imagens de MEV-FEG das nanofibras de PA6/PAH após a modificação da superfície com nanotubos de carbono ((a) e (b))	62
Figura 15. a) Voltamogramas Cíclicos e b) Curvas de Nyquist dos eletrodos de ITO, PA6 e PA6/PAH-MWCNTs em solução $5 \text{ mmol.L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$	64
Figura 16. Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de ITO, PA6/PAH e PA6/PAH-MWCNTs na presença de $50 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ de DA em tampão fosfato pH 7.0.	65

Figura 17. Mecanismo de oxidação da DA no eletrodo [130].	66
Figura 18. (a) Voltamogramas cíclicos em velocidades de varredura de 20 a 300mV/s em solução DA 0,05 mmol.L ⁻¹ . (b) Grafico I vs $v^{1/2}$	67
Figura 19. Curvas VPD para várias concentrações de DA e curva de calibração (<i>inset</i>).	68
Figura 20. Curvas VPD para detecção individual e simultânea de 0,05 mmol.L ⁻¹ DA, 0,1 mmol.L ⁻¹ UA e 0,1 mmol.L ⁻¹ AA (a) Detecção simultânea de DA e UA em concentrações na faixa da 0,05 a 0,2 mmol.L ⁻¹ (b) no eletrodo de PA6/PAH-MWCNTs.	70
Figura 21. Teste de estabilidade do eletrodo de PA6/PAH-MWCNTs em tampão fosfato (pH 7.0) contendo 0,05 mmol.L ⁻¹ DA.	71
Figura 22. Imagens de MEV-FEG das nanofibras de PA6/PAH após modificação da superfície com nanopartículas de ouro (AuNps) ((a) e (b))	72
Figura 23. Diagrama de Bode Z vs f para os eletrodos de PA6/PAH-MWCNT@anti CA 19-9 em diferentes concentrações de antígeno CA 19-9 (a). Módulo da Impedância Relativa (sinal do analito descontado do sinal do branco) em função da concentração do antígeno CA19-9 (b)	73
Figura 24. Diagrama de Bode Z vs f para os eletrodos de PA6/PAH-AuNps@anti CA 19-9 em diferentes concentrações de antígeno CA 19-9 (a). Módulo da Impedância Relativa (sinal do analito descontado do sinal do branco) em função da concentração do antígeno CA19-9 (b)	74
Figura 25. IDMAP obtido a partir da curvas de Impedância Relativa (sinal do analito descontado do sinal do branco) vs Frequência do antígeno CA 19-9 para os biossensores nas arquiteturas de PA6/PAH-MWCNT (azul) e PA6/PAH-AuNps (vermelho)	75
Figura 26. Imagens de AFM: (a) PA6/PAH-AuNps@anti Ca 19-9 + 5 U/mL CA 19-9 e (b) PA6/PAH-MWCNTs@anti CA 19-9 + 40 U/mL CA 19-9	76
Figura 27 IDMAP obtido de 4 amostras reais de sangue de pacientes do Hospital de Câncer de Barretos PA6/PAH-MWCNT@anti CA 19-9 (a) e PA6/PAH-AuNps@anti CA 19-9 (b)	78
Figura 28. Resposta dos eletrodos de PA6/PAH-MWCNTS (a) e PA6/PAH-AuNps (b), a diferentes interferentes	79

Figura 29. Imagens de MEV-FEG das nanofibras de PA6/PAH após modificação da superfície com Nanotubos de Carbono (MWCNT) e nanopartículas de ouro (AuNps) ((a) e (b)).....	80
Figura 30. Voltamogramas cíclicos para eletrodos PA6/PAH-MWCNTs-Tyr (preto), PA6/PAH-AuNps-Tyr (vermelho) PA6/PAH-MWCNTs-AuNps-Tyr (azul) em solução 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ BPA em tampão fosfato pH 7,0, velocidade de varredura 100 mV.s^{-1} . ..	81
Figura 31. Curvas de Nyquist do eletrodo de PA6/PAH-MWCNTs-AuNPs-Tyr em cada etapa de modificação, solução 5 mmol.L^{-1} $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$	82
Figura 32 Espectro PM-IRRAS das nanofibras de PA6/PA (preto) PA6/PAH-CNTs-AuNps (verde) e PA6/PAH-CNTs-AunPs-Tyr (marron) na região de 1500 a 1800 cm^{-1}	83
Figura 33 Voltamogramas Cíclicos (VCs) do eletrodo PA6/PAH-MWCNTs-AuNps-Tyr em Tampão Fosfato (pH 7.0) e 0, 10 20 e 30 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de BPA.	84
Figura 34. Cronoamperometria para o eletrodo PA6/PAH-MWCNTs-AuNps-Tyr em várias concentrações de BPA em tampão fosfato pH 7.0. Potencial 0,2 V por 60 s (a), Curva de Calibração (b)	85
Figura 35. Cronoamperometria para o eletrodo PA6/PAH-MWCNTs-AuNps-Tyr e os seguintes interferentes: 4-metoxifenol (1) 4-aminofenol (2) 4-etilfenol (3) BPA (4) fenol (5) 4-nitrofenol (6) em tampão fosfato pH 7.0. Potencial 0,2 V. Concentração BPA: 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, Interferentes: 30 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	86

Lista de Tabelas

Tabela 1 Parâmetros do Processo de Eletrofiação	36
Tabela 2 Diâmetro médio das nanofibras de PA6/PAH obtidas com eletrofiação variando-se os parâmetros tensão aplicada e distância agulha-coletor.....	57
Tabela 3. Comparação de alguns tipos de eletrodos modificados utilizados na detecção da DA	69

Sumário

1. Introdução/Motivação	29
2. Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica	31
2.1 Eletrofiação	31
2.2 Processo de Formação da Fibra	32
2.3 Parâmetros da Eletrofiação	36
2.3.1 Viscosidade e Concentração Polimérica	36
2.3.2 Condutividade Elétrica	37
2.3.3 Tensão Superficial	37
2.3.4 Taxa de Alimentação	37
2.3.5 Distância de Trabalho	37
2.3.6 Tensão Elétrica	38
2.3.7 Umidade e Temperatura	38
2.4 Tipos de Nanofibras	39
2.5 Aplicações e Usos das Nanofibras Eletrofiadas	41
2.7 Sensores e Biossensores	43
2.8 Nanomateriais	44
2.8.1 Nanotubos de Carbono	44
2.8.2 Nanopartículas de Ouro	45
2.9 Analitos	46
2.9.1 Dopamina (DA)	46
2.9.2 CA 19-9	47
2.9.3 Bisfenol A (BPA)	47
3. Objetivos	49
3.1 Gerais	49
3.2 Específicos	49
4. Materiais e Métodos	51

4.1 Materiais	51
4.2 Parte I - Desenvolvimento das mantas de PA6/PAH	51
4.2.1 Preparo das Soluções Poliméricas de PA6 e PA6/PAH	51
4.2.2 Eletrofiação das soluções de PA6 e PA6/PAH	51
4.2.3 Caracterização das Nanofibras	52
4.3 Parte II – Modificação das mantas de PA6/PAH com MWCNTs e detecção do neurotransmissor dopamina (DA).....	52
4.4 Parte III –Mantas de PA6/PAH modificadas com MWCNTs ou AuNps para detecção do biomarcador tumoral CA 19-9	53
4.5 Parte IV – Modificação das mantas de PA6/PAH com MWCNTs/ AuNps e imobilização da enzima tirosinase (Tyr) para detecção do bisfenol A (BPA)	55
5. Resultados e Discussão.....	57
5.1 Parte I - Desenvolvimento das mantas de PA6/PAH	57
5.2 Parte II – Modificação das mantas de PA6/PAH com MWCNTs e detecção do neurotransmissor dopamina (DA).....	61
5.2.1 Modificação das Mantas de PA6/PAH com os MWCNTs	61
5.2.2 Caracterização Eletroquímica dos eletrodos de PA6/PAH-MWCNTs.....	62
5.2.3 Determinação Eletroquímica da dopamina (DA)	64
5.3 Parte III – Biossensores para detecção do biomarcador CA 19-9 utilizando Nanofibras de PA6/PAH modificadas com MWCNTs ou AuNps.....	72
5.3.1 Modificação das Mantas de PA6/PAH com as AuNps.....	72
5.3.2 Detecção de Amostras Sintéticas de Antígeno CA 19-9.....	72
5.3.3 Detecção com Amostras Reais de Antígeno CA 19-9	77
5.3.4 Estudo de Interferentes	78
5.4 Parte IV – Modificação das mantas de PA6/PAH com MWCNTs/ AuNps e imobilização da enzima tirosinase para detecção do bisfenol A (BPA).....	80
5.4.1 Modificação das mantas de PA6/PAH com MWCNTs e AuNps	80
5.4.2 Caracterização Eletroquímica dos eletrodos de PA6/PAH-MWCNTs – AuNps.....	81

5.4.3 Espectroscopia vibracional PM-IRRAS dos eletrodos PA6/PAH-MWCNTS – AuNps- Tyr	83
5.2.4 Determinação Eletroquímica do Bisfenol A (BPA).....	84
6. Conclusões e Perspectivas	87
7. Referências	89

1. Introdução/Motivação

A nanociência e a nanotecnologia desenvolveram e utilizaram materiais com, pelo menos, uma de suas três dimensões na escala até 100nm [1,2]. A manipulação nessa escala gerou grande variedade de materiais com características exclusivas, dentre os quais se destacam mantas contendo nanofibras produzidas a partir de polímeros sintéticos e naturais e obtidas por eletrofiação (*electrospinning*) [3]. Nesta técnica, fibras com diâmetro de micrômetros ou nanômetros são produzidas aplicando-se uma alta tensão entre uma solução polimérica ejetada e um coletor metálico. Esta elevada tensão resulta na formação de campo elétrico que induz a formação das fibras entre a agulha da seringa contendo a solução polimérica e o coletor metálico num processo eletrohidrodinâmico. Os parâmetros do processo de fiação permitem controlar a morfologia e tamanho das fibras, enquanto a solução polimérica permite que as fibras formadas possuam um alto controle da composição, estrutura e funcionalidade. As nanofibras possuem alta razão superfície-volume e; como consequência as propriedades da superfície da manta são influenciadas pelas propriedades da fibra. Assim, mantas contendo nanofibras podem ter funcionalidades não encontradas em outras com fibras de diâmetros maiores [4, 5].

A utilização das nanofibras pode ser ampliada explorando-se os grupos químicos funcionais nos polímeros utilizados na eletrofiação, alterando-se sua superfície com métodos químicos ou físicos. Isso permite incorporar outros tipos de materiais, como nanotubos de carbono [6], nanopartículas metálicas [7,8], nanopartículas de óxidos metálico, complexos organo-metálicos [9] e moléculas biológicas (enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos e bactérias) [10-12]. Com essa modificação superficial, podem ser combinadas propriedades desses materiais com as das nanofibras, resultando em nanocompósitos com funcionalidades variadas. Pode-se explorar a grande área superficial das nanofibras com propriedades dos materiais imobilizados sobre a manta. As nanofibras modificadas são interessantes, por exemplo, para aplicação em sensores [13-16], biossensores [17-20] e em catálise [21,22]. Vários materiais podem ser adsorvidos sobre as nanofibras de modo a proporcionar interação com analitos, ou mesmo obter efeitos sinérgicos com outros componentes do sensor ou biossensor.

Neste trabalho, nanofibras de poliamida 6 (PA6) e polialilamina hidroclorada (PAH) foram produzidas por eletrofiação. As mantas de PA6/PAH foram modificadas com adsorção de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) e/ou nanopartículas de ouro. Estas mantas modificadas foram empregadas na construção de três plataformas para sensores eletroquímicos com arquiteturas distintas: para detectar o neurotransmissor dopamina (DA), o antígeno CA 19-9, um biomarcador de câncer de pâncreas, e o disruptor endócrino bisfenol A (BPA).

2. Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica

2.1 Eletrofiação

A eletrofiação é usada para produzir fibras na escala micro e nanométrica, baseada em fenômenos eletrohidrodinâmicos. Os fundamentos teóricos que serviram de base para a eletrofiação foram estabelecidos por Zeleny em 1914, com trabalhos mostrando o comportamento de líquidos na extremidade de um capilar metálico submetidos a um alto campo elétrico [23]. Entre 1964 e 1969, Geoffrey Taylor propôs um modelo matemático para a forma de cone que as gotas adquiriam na ponta do capilar metálico sob efeito do campo elétrico [24]. Em 1971 Baumgarten mostrou, com câmeras de alta velocidade, que a eletrofiação é dividida em dois estágios: (1) distorção da geometria da gota devido à ação do campo elétrico e (2) formação de um jato contínuo a partir da extremidade da gota [25]. A eletrofiação foi redescoberta em 1995 por Doshi e Reneker para produzir materiais nanoestruturados [26]. Atualmente, é usada para se obter nanofibras de materiais, com grande área superficial, flexibilidade e com controle da morfologia, tornando-as excelentes para aplicações tecnológicas.

Para se obter nanofibras poliméricas emprega-se um aparato mostrado na figura 1, composto basicamente por: (1) uma fonte de alta tensão (2) uma seringa com uma solução polimérica ligada a uma bomba ejetora e (3) um coletor metálico. A alta tensão é aplicada para o carregamento da solução polimérica e formação do campo elétrico que induzirá da ponta da agulha da seringa, um fio da solução polimérica, que dará origem às nanofibras. A seringa fixada a uma bomba ejetora fornece a solução polimérica numa taxa constante e controlável. O coletor metálico é aterrado e posicionado por uma distância fixa da agulha da seringa e é conectado ao polo negativo (ou positivo) da fonte de alta tensão .

Figura 1 Principais componentes de aparato de eletrofiação. Modificado de [27].

2.2 Processo de Formação da Fibra

O processo eletrohidrodinâmico da eletrofiação prevê a geração de cargas na solução, o que permite com que esta possa responder à presença do campo elétrico externo. Estas cargas são quase sempre iônicas, portanto, possuem mobilidade na solução [28]. Sob ação do campo elétrico, estas cargas tendem a se acumular na interface da gota/ar e se mover na direção do campo. Em oposição a este movimento, há a viscosidade da solução que, por causa disto, também adquire resistência ao movimento na direção contrária ao campo [5,28,29]. Quando a bomba ejetora inicia o bombeamento da solução polimérica, forma-se uma gota na ponta da agulha (capilar). Inicialmente a gota é mantida por forças coesivas da tensão superficial (figura 2a). A aplicação do campo elétrico entre a gota polimérica e o coletor torna a gota carregada. A repulsão das cargas de mesmo sinal na gota e a tendência de migração das cargas no sentido do coletor geram uma força oposta à resultante da tensão superficial [26], como mostram as figuras 2b e 2c. Com o aumento da tensão elétrica, a gota se distorce e adquire o formato de cone (Cone de Taylor) [24], conforme ilustrado na figura 2d. Quando o campo elétrico é

suficientemente intenso para que forças eletrostáticas superem a tensão superficial, um jato polimérico é ejetado da solução a partir da extremidade do cone em direção ao coletor (figura 2e).

Figura 2 Etapas de formação do jato polimérico: a) Tensão superficial b) e c) gota polimérica carregada pelo campo elétrico d) distorção da gota e formação do Cone de Taylor e) Cone de Taylor e jato ejetado a partir da extremidade do Cone. **a,b,c e d** modificado de [30], figura **e** retirada de [31]

O caminho percorrido pelo jato até o coletor é dividido em duas regiões. A primeira é estável, de baixa aceleração, localizada logo após o cone de Taylor e com jato polimérico laminar e alongado (figura 2). A segunda região é instável ou de alta aceleração, onde o jato polimérico começa a se solidificar e assume um perfil cônico e em espiral com movimentos rápidos, similar ao efeito de um “chicoteamento” (*whipping instability*) [32]. Shin e colaboradores [33,34] desenvolveram modelos 3D que explicam dados experimentais do perfil do jato polimérico no processo de

eletrofiação, com três tipos de instabilidade: duas axissimétricas e uma instabilidade não axissimétrica (figura 4).

O primeiro modo axissimétrico, chamado de instabilidade de Rayleigh, define a formação da fibra, sendo governado pela viscosidade. Quando não se formam fibras, aparecem defeitos em forma de vesículas ou contas chamados de defeitos do tipo gota (*beads*), como mostrado na figura 3. É um processo similar à eletrofiação, chamado eletrospray, que ocorre se a viscosidade da solução polimérica for menor do que um valor ótimo. Ou seja, a quantidade de emaranhamentos das cadeias não é suficiente para manter a resistência ao campo elétrico ou a densidade de carga na solução/campo elétrico não é suficientemente forte para romper a tensão superficial e formar o jato polimérico. Se a viscosidade da solução e a tensão forem suficientes para gerar eletrofiação, o jato entra no regime de eletrofiação [28]. O jato é linear, inicialmente na região de baixa aceleração, e torna-se cônico, por seu desmembramento na região de alta aceleração, como ilustrado na figura 4.

Figura 3 Nanofibras contendo defeitos tipo gota (do inglês “beads”) [35]

A trajetória e o tamanho dos jatos e, por consequência, o tamanho e a morfologia das fibras, são determinados pelas duas outras instabilidades. A instabilidade axissimétrica e não-axissimétrica são modos de flexão que causam alongamento, e as espirais diminuem de tamanho até que o jato se solidifique. Nesta fase ocorre grande parte da evaporação do solvente e a aceleração do jato polimérico é alta. Este jato também é estirado, tendo seu diâmetro diminuído da ordem de micrômetros e podendo chegar a nanômetros. Estas instabilidades são

resultado do acoplamento das forças eletrostáticas do jato com o campo elétrico. A variação na densidade de carga ao longo da fibra recém-formada cria distribuição não uniforme de cargas, gerando dipolos orientados perpendicularmente ao jato. Sob campo elétrico, estes dipolos proporcionam torque para curvar o jato, dando origem à instabilidade não-axissimétrica, responsável pelo efeito de “chicoteamento” do jato polimérico. No trajeto do jato polimérico, da ponta do cone de Taylor até o coletor, ocorre evaporação do solvente e o polímero é solidificado. As fibras coletadas desta maneira são alinhadas na direção do filamento e, geralmente, são dispostas aleatoriamente no coletor, formando mantas de não-tecido (*nonwoven*), não trançadas, como em um tecido verdadeiro.

Figura 4 Representação esquemática das regiões de formação da fibra a partir da agulha do capilar. Processo de formação do jato polimérico a partir do cone de Taylor (inset). Modificado de [36] e [37]

2.3 Parâmetros da Eletrofiação

Muitos são os parâmetros relevantes para o processo de eletrofiação dentro de três categorias: (1) propriedades da solução, (2) parâmetros do processo e (3) condições ambientais. A tabela 1 traz um sumário dos parâmetros que podem ser ajustados em cada uma das 3 categorias. As propriedades da solução são ajustadas pela escolha do solvente, do polímero solubilizado e sua concentração. Os parâmetros de processo são alterados no equipamento de eletrofiação. As condições ambientais influenciam a solução polimérica na eletrofiação, sendo geralmente controladas, como é o caso de temperatura e umidade.

Tabela 1 Parâmetros do Processo de Eletrofiação

Propriedades da Solução	Parâmetros de Processo	Condições Ambientais
Concentração	Tensão Aplicada	Temperatura
Viscosidade	Distância da agulha ao coletor	Umidade
Tensão Superficial	Diâmetro da agulha	
Condutividade	Taxa de alimentação da bomba	
Constante Dielétrica	Coletor	
Pressão de Vapor do Solvente		

2.3.1 Viscosidade e Concentração Polimérica

A viscosidade é importante para a eletrofiação, existindo uma faixa ideal para cada polímero, dependendo de sua massa molar [26]. Polímeros com menor massa podem ser eletrofiados desde que as interações intermoleculares sejam suficientes para compensar o menor entrelaçamento entre cadeias, em comparação a polímeros de maior massa molecular [28, 38]. A viscosidade também é relevante para definir a faixa de concentração da solução polimérica. Em soluções pouco concentradas, pode não haver material suficiente para formar uma fibra contínua, gerando fibras quebradiças e/ou contendo beads. Por outro lado, soluções muito concentradas podem causar entupimento na agulha da seringa, e a bomba pode não ser capaz de ejetar a solução devido ao aumento da viscosidade.

2.3.2 Condutividade Elétrica

A maior quantidade de carga em polímeros com maior condutividade facilita a fiação pela interação mais forte com o campo elétrico. O aumento das forças eletrostáticas favorece a repulsão eletrostática, aumentando a distorção da gota no capilar e diminuindo o diâmetro das nanofibras [39]. Por este motivo, é comum utilizar uma mistura de solventes na solubilização dos polímeros. Solventes com alta constante dielétrica, como metanol, etanol e dimetilformamida (DMF), são adicionados para aumentar a condutividade elétrica [39-41]. Também são usados sais e tensoativos iônicos, que facilitam a fiação por diminuir a tensão superficial e aumentar a condutividade da solução [42]. Por outro lado, se a condutividade for muito alta, observam-se fenômenos indesejáveis como formação de múltiplos jatos a partir da gota ou mesmo a inibição da formação do cone de Taylor, devido ao esgotamento do campo elétrico tangencial ao longo da superfície da gota.

2.3.3 Tensão Superficial

Soluções com alta tensão superficial tendem a desfavorecer as instabilidades de Rayleigh responsáveis pela formação do jato polimérico. Portanto, geralmente a eletrofiação é realizada com soluções com menor tensão superficial.

2.3.4 Taxa de Alimentação

A taxa de alimentação da bomba ejetora (vazão) e a concentração de solução polimérica injetada definem a quantidade de material disponível na ponta da agulha para eletrofiação. Se a vazão ejetada for muito alta, pode não haver tempo para evaporação total do solvente, depositando no coletor fibras úmidas e com morfologia alterada. Quando são utilizadas altas taxas de ejeção tendem a formar fibras de maior diâmetro [43].

2.3.5 Distância de Trabalho

A distância de trabalho, ou a distância da ponta da agulha ao coletor, é outro parâmetro ajustado na eletrofiação. Juntamente com a geometria do coletor, ela define o formato das linhas de campo elétrico, as quais dependem da concentração ou dispersão das fibras sobre o coletor [44]. Em distâncias muito curtas, o aumento da densidade do campo elétrico favorece a formação das fibras, mas pode trazer o

inconveniente de não haver distância suficiente para total evaporação do solvente. Em distâncias muito grandes, o campo elétrico pode ser insuficiente para a eletrofiação.

2.3.6 Tensão Elétrica

A tensão elétrica, aplicada na ponta da agulha ou solução polimérica, é o parâmetro mais relevante para a eletrofiação, juntamente com a distância de trabalho, pois ambas determinam o campo elétrico [45,46]. Geralmente, são empregados campos elétricos da ordem de 1-5 kV/cm, o que significa aplicar tensões de 1 a 35 kV para distâncias de trabalho de 5 a 30 cm. É importante salientar que apesar deste ser o parâmetro mais estudado, não implica necessariamente que ocorrerá a formação da fibra, para isso devem ser analisados todos os outros parâmetros em conjunto.

2.3.7 Umidade e Temperatura

A temperatura influencia na taxa de evaporação e na viscosidade da solução. Com o aumento da temperatura, aumenta-se a taxa de evaporação e diminui-se a viscosidade, resultando na geração de fibras mais finas. Isto ocorre porque a menor viscosidade promove repulsão eletrostática e facilita formação de jatos mais finos, e a maior taxa de evaporação permite que o polímero seja esticado por tempo mais longo [47]. Medeiros e colaboradores [48] constataram que a porosidade das fibras de diversos polímeros é resultado do efeito dinâmico da separação de fases polímero-solvente e da taxa de evaporação do solvente. Em umidade alta para eletrofiação de um polímero hidrofóbico, a água age como um não solvente e uma fina película de água condensada é formada na interface ar-jato polimérico. São formadas ilhas de água, com poros em nanofibras de polimetilmetacrilato (PMMA), policloreto de vinila (PVC), poliestireno (PS) e poliácido láctico (PLA), enquanto o mesmo não ocorreu em polímeros hidrofílicos como o poliálcool vinílico (PVA). Num ambiente com baixa umidade pode ocorrer rápida evaporação de solventes muito voláteis, acarretando evaporação muito rápida sem tempo suficiente para o alongamento da fibra.

Em suma, muitos parâmetros influenciam a obtenção de nanofibras a partir de soluções poliméricas. A escolha dos parâmetros depende da aplicação das

nanofibras mas, em geral, almejam-se nanofibras contínuas, livre de defeitos e uniformes em sua extensão.

2.4 Tipos de Nanofibras

Com o ajuste do grande número de parâmetros, como já comentado, é possível se obter vários tipos de fibras, como as mostradas na figura 5. As nanofibras coaxiais (*core-shell*) da figura 5a têm miolo (*core*) de material diferente da casca (*shell*) [49-51]. Neste tipo de nanofibra, são empregadas duas possíveis modificações no sistema de eletrofiação: Na primeira, é utilizado um sistema de ejeção com seringa coaxial onde uma única bomba ejeta ambas as soluções. Na segunda, há duas bombas que ejetam a solução do miolo e da superfície da fibra independentemente. Com nanofibras coaxiais, pode-se combinar diferentes materiais na casca e no miolo, inclusive com a possibilidade de remover o miolo para obter nanotubos. Pode-se também usar esse tipo de eletrofiação para obter fibras de materiais que não são facilmente fiáveis, utilizando como solução da casca um polímero mais facilmente fiável para carrear a solução do miolo.

As nanofibras porosas da figura 5b são resultado da evaporação do solvente durante a eletrofiação, tornando a solução polimérica termodinamicamente instável. Isto ocorre pela formação de duas fases na nanofibra, uma rica em polímero e outra rica em solvente. A fase polimérica se solidifica durante a separação de fase e a fase rica em solvente se evapora, formando-se os poros. Este tipo de morfologia é afetado pela umidade, conforme já discutido [52]. Nanofitas poliméricas, como as da figura 5c, são outro tipo de morfologia obtido. Para polieterimida solubilizada em Hexafluoro - 2 -Propanol (HFIP), alterações na evaporação do solvente podem gerar estrutura com fina camada solidificada contendo um interior ainda líquido. A pressão atmosférica age colapsando a fina camada, dando origem à estrutura plana que caracteriza este tipo de fibra. Devido à geometria destas fibras, as cargas elétricas tendem a se concentrar nas bordas promovendo desequilíbrio eletromecânico com o campo elétrico, levando à torção ou mesmo rompimento das fitas [53].

Nanofibras alinhadas em uma única direção (figura 5d) são geralmente obtidas com modificações no coletor metálico. Nos primeiros equipamentos de

eletrofiação as fibras eram coletadas fora do coletor. Uma possível explicação seria que as fibras no coletor estariam carregadas eletrostaticamente e sofreriam repulsão eletrostática. Reneker e colaboradores [54] desenvolveram um coletor na forma de 3 anéis, submetidos à mesma tensão da agulha, para tentar moldar o campo elétrico e focalizar a deposição das fibras. Com outras variações na montagem do coletor, foram fabricadas fibras dispostas de diferentes maneiras, alinhadas num cilindro oco, torcionadas e entrecruzadas [55-58]. A estratégia mais usada para produzir fibras alinhadas emprega um coletor no formato de cilindro metálico girando em alta rotação. A tração exercida pelo movimento de rotação é responsável pelo alinhamento das fibras, e para tanto as fibras recém-formadas devem estar esticadas ao redor do cilindro. Ou seja, é necessário que o coletor tenha velocidade suficiente para se equiparar à velocidade do jato polimérico e conseguir estirar e alinhar as fibras. Em baixas velocidades, as fibras coletadas se assemelharão àquelas obtidas da maneira convencional, dispostas aleatoriamente como num coletor estático plano [59, 60].

Figura 5 Diferentes tipos de nanofibras por eletrofiação: coaxiais (*core-shell*) (a) [61], porosas [3] (b), poliméricas (c) [62], alinhadas (d) [63].

2.5 Aplicações e Usos das Nanofibras Eletrofiadas

Muitos materiais poliméricos podem ser empregados na eletrofiação, inclusive os utilizados em produtos plásticos, como poliestireno (PS) [64], policloreto de vinila (PVC) [65], poliacrilonitrila (PAN), policarbonato (PC), polimetilmetacrilato (PMMA) [65,66] e plásticos de engenharia como poliamidas [65,67], poliésteres [68] e polímidas [69]. Podem ser incluídos os polímeros solúveis em água, como o álcool polivinílico (PVA) [70] e o polióxido de etileno (PEO) [71,72] e os polímeros naturais como a quitosana [73], amido [74,75], celulose [76,77] e biomoléculas como colágeno [59], DNA [78,79] e fibrinogênio [80,81]. A produção não se limita a nanofibras poliméricas, pois outros materiais podem ser incorporados à solução polimérica e, conseqüentemente, às nanofibras. Exemplos são nanopartículas [7,82-84] e nanotubos de carbono [6,85,86], cerâmicas como dióxido de titânio (TiO_2) [87,88], dióxido de silício (SiO_2) [89,90], dióxido de zircônio (ZrO_2) [91,92], óxido de

alumínio (Al_2O_3) [93,94]. A título de ilustração, nanofibras de carbono são fabricadas pela carbonização de precursores como nanofibras de poliacrilonitrila (PAN) e piche derivado do petróleo [95]. Com essa diversidade de constituintes, as nanofibras são utilizadas em filtros de alta eficiência, carreadores de fármacos, suporte para cultura de tecidos, curativos, roupas de proteção contra agentes químicos e biológicos, dispositivos eletrônicos, mantas absorvedoras de som, atenuadores de ondas eletromagnéticas, sensores e biossensores e em biorreatores [96-101].

Mais especificamente para sensores e biossensores, as vantagens de mantas obtidas por eletrofiação incluem alta razão superfície-volume, controle preciso da composição da fibra, e estrutura tridimensional interconectada. O aumento da área superficial é desejável em qualquer tipo de sensor, pois a quantidade de sítios de reconhecimento do analito aumenta, ao passo que os espaços interconectados entre as fibras facilitam a difusão do analito. Também relevantes são os grupos funcionais das nanofibras poliméricas, através dos quais outros tipos de materiais podem ser adsorvidos, como nanopartículas [102], nanotubos de carbono [103] e moléculas biológicas como enzimas [104], proteínas [105] e DNA [106]. A modificação superficial das mantas pode ser realizada de várias maneiras: ligação química covalente, recobrimento da superfície por submersão (*Dip Coating*), método de deposição química a vapor (*Chemical Vapour Deposition* – CVD), uso de plasma.

Com as nanofibras de poliamida 6 (PA6) e polialilamina hidrocloreada (PAH) produzidas neste trabalho busca-se conciliar as propriedades mecânicas e resistência química do PA6 com as propriedades do polieletrólito polialilamina hidrocloreada (PAH) na produção de nanofibras eletrofiadas para serem utilizadas em sensores e biossensores. O PA6 facilita a formação de fibras, sendo amplamente utilizado na indústria têxtil. O PAH é um polieletrólito catiônico que ao ser incorporado ao PA6 permite que a condutividade da solução polimérica aumente, o que pode facilitar o processo de formação da fibra durante a eletrofiação, permitindo obter fibras de menor diâmetro. Os grupos carregados do PAH também podem posteriormente, com a fibra já formada, auxiliar o ancoramento de outros materiais e/ou biomateriais na sua superfície, possibilitando construir dispositivos sensores com alta sensibilidade e seletividade.

2.7 Sensores e Biossensores

Sensores são dispositivos que medem certa grandeza química ou física e a convertem em sinal mensurável. Biossensores, segundo a IUPAC, são dispositivos capazes de fornecer informações quantitativas ou semiquantitativas específicas utilizando um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) em contato direto com o elemento de transdução química. De modo geral, num biossensor o elemento biológico tem a função de reconhecer especificamente o analito, enquanto o elemento sensor traduz a interação com o analito em sinal. O papel do elemento biológico é aumentar a especificidade do sensor, evitando interferência de outras substâncias. Os elementos biológicos podem ser biomoléculas como antígenos, anticorpos, proteínas, ácidos nucleicos, enzimas, células animais e vegetais, e mesmo microorganismos como bactérias e fungos. Os elementos sensores estão relacionados à forma de detecção, que podem ser eletroquímicos (amperométricos, condutimétrico e potenciométrico), elétricos, magnéticos, óticos, térmicos, acústicos, e de massa, entre outros [107-109]. A figura 6 ilustra de forma esquemática os principais componentes de um biossensor .

Figura 6 Principais elementos de um biossensor e alguns dos seus componentes[110].

Os elementos biológicos combinados aos vários tipos de elementos sensores possibilitam obter grande variedade de biossensores, cujo desempenho depende da interação entre o elemento biológico e elemento sensor. Materiais nanoestruturados em geral, apresentam possuem propriedades catalíticas que melhoram a resposta

do sensor, e têm dimensões compatíveis com as moléculas biológicas empregadas para reconhecimento molecular.

2.8 Nanomateriais

2.8.1 Nanotubos de Carbono

Nanotubos de carbono (CNT) são nanoestruturas cilíndricas tubulares formadas somente por átomos de carbono. São uma forma alotrópica do carbono, assim como o diamante e grafite. Os CNTs foram descobertos em 1991 por Sumio Iijima [111] durante a pirólise do grafite para produzir fibras de carbono e fulerenos. Os CNTs possuem alta razão comprimento/diâmetro conferindo um aspecto unidimensional (1D) [112]. Podem ser divididos em dois grupos: nanotubos de parede simples (SWCNTs) e de paredes múltiplas (MWCNTs) [113], ambos mostrados na figura 7. Os SWCNTs são constituídos por um cilindro formado por uma folha de grafeno. Os MWCNTs são formados por dois ou mais cilindros concêntricos ou com duas ou mais folhas de grafeno enroladas, tendo múltiplas paredes.

Figura 7. CNTs de parede simples (SWCNT) e Múltiplas paredes (MWCNT)

A utilização dos CNTs em sensores se deve a duas de suas principais propriedades: grande área superficial, que permite forte interação com o analito e amplificação do sinal analítico, e transporte eletrônico. Também se destaca a possibilidade de funcionalização [114]. A condutividade dos CNTs depende da geometria que a rede carbono do grafeno adquire (quiralidade). As estruturas são definidas por um vetor quiral (C_h) e um ângulo de quiralidade (θ), obtendo-se 3

estruturas: *armchair*, *zig-zag* e quiral, ilustradas na figura 8. Os nanotubos *armchair* possuem condução metálica enquanto os *zig-zag* e quiral podem ser metálicos ou semicondutores [113,115].

Figura 8. Estruturas dos CNTS: *Armchair* (a) *Zig-Zag* (b) e Quiral (c).[116]

2.8.2 Nanopartículas de Ouro

As Nanopartículas de Ouro (AuNps) são os nanomateriais de dimensão 0 mais estudados. Seu tamanho e propriedades físico-químicas permitem uso como componentes em dispositivos bioeletrônicos, em mediadores eletroquímicos, auxiliando na transferência de elétrons entre proteínas redox e a superfície do eletrodo [117,118]. A utilização dos AuNps bioconjugados oferece microambiente similar a proteínas em sistemas nativos. Com AuNPs também é possível fabricar nanodispositivos, em que cada nanopartícula age como se fosse um nanoeletrodo [119]. Isto permite atingir limites de detecção menores que seus correspondentes macroscópicos devido à maior razão entre a corrente faradáica e corrente capacitiva.

2.9 Analitos

2.9.1 Dopamina (DA)

A dopamina (DA) é uma amina biogênica endógena produzida nos neurônios, que atua como neurotransmissor e age na comunicação entre células nervosas. Pertence à família das catecolaminas, assim como outros neurotransmissores, como a noradrenalina e a epinefrina, sendo precursora de ambas. A DA está presente em várias regiões do cérebro, com maiores quantidades na região do corpo estriado. Esta região se comunica diretamente com a região do corpo negro, onde se produz DA e é importante para coordenação dos movimentos. Por esse motivo, doentes de Parkinson, que têm neurônios dopaminérgicos da região do corpo negro degenerados, possuem sintomas de falta de coordenação motora. A DA também atua nos mecanismos de motivação, recompensa e prazer. Muitas drogas como a cocaína e até atividades como jogos, bebidas e sexo podem estimular a liberação da DA no cérebro. Como a ação da DA é rápida e tem curta duração (cerca de 10 minutos), é preciso que o viciado continue “consumindo” para manter o efeito de euforia. A DA também é utilizada clinicamente em tratamentos de choque e hipotensão grave após infarto agudo no miocárdio, pois em baixas concentrações atua como vaso dilatador das artérias renais por ativação dos receptores β -adrenérgicos do coração, dessa forma, aumentando o fluxo sanguíneo [120].

Há grande interesse na quantificação das catecolaminas para biomarcadores em doenças específicas ou monitoramento da eficácia de tratamentos. Por exemplo, catecolaminas e seus metabólitos na urina podem ser biomarcadores para avaliar o estado do sistema dopaminérgico nigroestatal em doentes com mal de Parkinson. Um desafio para determinar DA em baixas concentrações é evitar o efeito de interferentes, como o ácido úrico (AU) e ácido ascórbico (AA), que também são encontrados no organismo. Além disso, o AA e AU oxidam-se em potenciais próximos à DA [121]. Como esses ácidos participam de processos biológicos importantes, tem-se tentado detectar os três compostos simultaneamente [122]. Outro problema recorrente nestes tipos de sensores eletroquímicos é a formação de um filme polimérico ou adsorção dos subprodutos da reação na superfície do eletrodo, levando à passivação da superfície e limitando a utilização do eletrodo.

2.9.2 CA 19-9

O CA 19-9 é um marcador tumoral de massa molecular variando de 200 kD a 1000 kD, também conhecido com antígeno de Lewis. É um carboidrato liberado pela superfície da célula cancerosa, indo para a corrente sanguínea onde pode ser detectado. Seu valor de referência é 37 U/mL, ou seja, a esta concentração no sangue infere-se que o paciente tem risco de ter câncer de pâncreas. Sua especificidade média para este limite de concentração é de 91% e a sensibilidade é de 81% para o câncer de pâncreas. No entanto, deve-se tomar cuidado para utilizar este biomarcador no diagnóstico, pois aproximadamente 5 a 10% da população caucasiana não expressam o CA 19-9. Além disso, outros tipos de doenças como cânceres gastrointestinais, cirrose hepática, pancreatite, doenças inflamatórias intestinais e autoimunes podem elevar a concentração de CA 19-9, o que torna inviável sua utilização como teste único para o câncer de pâncreas [123].

A monitoração dos níveis de CA 19-9 é útil para avaliar a resposta dos tratamentos no combate ao câncer de pâncreas e evitar a remissão ou metástase vários meses depois de terminado o tratamento do paciente. O aumento nos níveis de CA19-9 em pacientes com câncer de pâncreas pode ser indicativo da recorrência da doença, progressão da doença e ineficácia no tratamento [123,124]. O CA 19-9 ainda é o biomarcador para o câncer de pâncreas mais utilizado, mas sua utilização em pessoas assintomáticas não deve ser realizada sem exames complementares [125].

2.9.3 Bisfenol A (BPA)

O 2,2 - bis(4-hidroxifenil) propano, conhecido como Bisfenol (BPA), é empregado em plásticos, especialmente policarbonato e resinas epóxi. As primeiras embalagens plásticas, sem BPA, apresentavam visual opaco e quebradiço. Com BPA obtêm-se hoje embalagens transparentes, leves, fortes e duradouras, servindo para revestimento interno de latas de alimentos e bebidas. O BPA é usado em produtos de policarbonatos, como mamadeiras, brinquedos, utensílios domésticos, embalagens retornáveis de água, cerveja e refrigerantes, frascos para alimentos infantis e em resinas de implantes médicos e dentários [126]. Sabe-se que o BPA é

um disruptor endócrino tendo estrutura química análoga aos hormônios endócrinos estradiol e dietilestilbestrol, como mostra a figura 9. Devido aos grupos fenólicos, tem afinidade com receptores de estrogênios [127]. A exposição ao BPA afeta funções do cérebro, tireoide, ovários e órgãos reprodutores. O aumento dos níveis de BPA nos homens é associado à disfunção sexual. O BPA está também associado a doenças cardíacas, obesidade, carcinogênese, neurotoxicidade e problemas de desenvolvimento [128].

Figura 9 Estrutura Química do Bisfenol A (BPA)

3. Objetivos

3.1 Gerais

- Desenvolver plataformas sensoriais contendo nanofibras eletrofiadas de PA6/PAH para aplicação em sensores e biossensores eletroquímicos por meio da funcionalização superficial das nanofibras com MWCNTs e/ou AuNps, gerando novas arquiteturas para detecção de analitos específicos.

3.2 Específicos

- Estudar, caracterizar e otimizar as nanofibras de PA6/PAH com nanotubos de carbono (MWCNTs) para detectar dopamina (DA)

- Estudar, caracterizar e otimizar plataformas sensoras contendo nanofibras de PA6/PAH com nanopartículas de ouro (AuNps) e PA6/PAH-MWCNTs, ambas imobilizadas com anticorpos anti-CA 19-9, e compará-las quanto à resposta na detecção do antígeno CA 19-9.

- Estudar, caracterizar e otimizar plataformas sensoras contendo nanofibras de PA6/PAH com nanotubos de carbono (MWCNTs) e nanopartículas de ouro (AuNps) imobilizadas com a enzima tirosinase (Tyr) e verificar a resposta para a detecção do disruptor endócrino bisfenol A (BPA).

4. Materiais e Métodos

4.1 Materiais

Os compostos químicos hidrocloreto de poli(alilamina) (PAH, $M_w = 56.000 \text{ g.mol}^{-1}$), poliamida 6 (PA6, $M_w = 20.000 \text{ g.mol}^{-1}$), ácido fórmico (HCOOH), o sal cloreto de ouro III (AuCl_3), o sal citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) funcionalizados com ácido carboxílico ($-\text{COOH}$), 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimina (EDC), ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA), N-hidroxisuccinimida (NHS) e as lâminas de vidro recobertas com óxido de estanho dopado com flúor (FTO), a enzima tirosinase (3130 U/mg), o bisfenol A (BPA) e a dopamina (DA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. As lâminas de vidro recobertas com óxido de estanho dopado com índio (ITO) foram adquiridas da Delta Technologies. As soluções de tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ foram preparadas a partir do sal Na_2HPO_4 e NaH_2PO_4 , ambos adquiridos da Sigma Aldrich. O anticorpo anti-CA19-9 e o antígeno CA19-9 foram adquiridos da Aviva System Biology.

4.2 Parte I - Desenvolvimento das mantas de PA6/PAH

4.2.1 Preparo das Soluções Poliméricas de PA6 e PA6/PAH

Para a produção das nanofibras de PA6, foi preparada uma solução polimérica contendo o PA6 e o PAH. O PA6 na concentração de 20% (m/v) foi solubilizado por 2 h em ácido fórmico sob agitação magnética. Em seguida adicionou-se na solução 30% (m/m) de PAH. A solução foi mantida em agitação magnética por mais 2 h até a completa solubilização de ambos os polímeros.

4.2.2 Eletrofiação das soluções de PA6 e PA6/PAH

As nanofibras de PA6/PAH foram produzidas por eletrofiação. Além da concentração da solução de PA6, variou-se a tensão aplicada (15, 20 e 25 kV) e a distância entre a ponta da agulha e o coletor (3 e 10 cm). As outras condições para eletrofiação das blendas foram: taxa de ejeção de $0,01 \text{ mL.h}^{-1}$ e diâmetro da agulha de 0.8 mm.

4.2.3 Caracterização das Nanofibras

A) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia e o diâmetro das fibras foram analisados utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura Jeol 6510, após recobrimento da superfície das amostras com ouro usando uma metalizadora (Laica, EM SCD050). Os diâmetros das fibras foram avaliados por meio de um software (Image J, versão 1.47a). Para cada amostra o diâmetro médio e sua distribuição foram determinados a partir da análise de aproximadamente 100 fibras.

B) Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

As nanofibras eletrofiadas sobre substrato de silício foram caracterizadas por FTIR no espectrômetro 1000 (Perkin-Elmer) na região espectral entre 4000 e 600 cm^{-1} , resolução de 2 cm^{-1} e 64 varreduras por espectro.

C) Análise Térmica

Experimentos de termogravimetria (TGA) foram realizados no equipamento Q500 TA Instruments em atmosfera de nitrogênio a um fluxo de 20 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. As amostras foram aquecidas a partir da temperatura ambiente até 600°C a uma taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. As análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram efetuadas com o equipamento Q100 TA Instruments em atmosfera de nitrogênio, a uma taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ entre 50°C e 250°C.

4.3 Parte II – Modificação das mantas de PA6/PAH com MWCNTs e detecção do neurotransmissor dopamina (DA)

A) Dispersão dos Nanotubos de Carbono (MWCNTs)

Os MWCNTs foram dispersos em água ultrapura (0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) sob ultrassom de ponta Branson Sonifier modelo S450, juntamente com o surfactante não-iônico Triton-X 100 (0,3% m/m) para auxiliar a dispersão. A mistura foi sonicada com inserção direta da ponteira (cônica de 1/8) à potência de 30W por 120 min em banho de gelo.

B) Modificação das Nanofibras de PA6/PAH com os MWCNTs

As nanofibras de PA6/PAH foram modificadas com imersão das mantas eletrofiadas na dispersão dos MWCNTs por 12h. As mantas foram então lavadas com água destilada e secas a temperatura ambiente. Para medidas eletroquímicas foram utilizados substratos de ITO.

D) Medidas Eletroanalíticas

As medidas eletroquímicas foram realizadas no potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 30 (Metrohm) com o software GPES, utilizando célula eletroquímica de 3 eletrodos com o substrato de ITO ($0,5 \text{ cm}^2$) com as mantas de PA6/PAH modificadas como eletrodo de trabalho, e a platina e o Ag/AgCl (KCl saturado) como contra eletrodo e eletrodo de referência, respectivamente. As medidas de EIS foram realizadas no intervalo de 0,1 Hz a 100 kHz com amplitude de 10mV em potencial de circuito aberto (OCP) numa cela eletroquímica contendo solução 50 mmol.L^{-1} de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ de KCl. Para as medidas de detecção da DA, foi utilizada a técnica de Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) numa janela de 0,2 a 0.6 V com amplitude de pulso de 50 mV, comprimento de pulso de 0,4 s e período do pulso de 0,5 s.

4.4 Parte III –Mantas de PA6/PAH modificadas com MWCNTs ou AuNps para detecção do biomarcador tumoral CA 19-9

A) Síntese das nanopartículas de ouro (AuNps)

A síntese das AuNps foi realizada seguindo o método de Turkevich (2006) [129], em que 20 mL de uma solução 1 mmol.L^{-1} do sal AuHCl_4 foram aquecidos em um balão acoplado a um sistema de refluxo, mantido em forte agitação magnética. Ao atingir a ebulição, foram adicionados ao meio reacional 2 mL de solução 1% de citrato de sódio. A agitação e o aquecimento foram mantidos até a solução adquirir coloração vermelha intensa, característica da formação das AuNps. O aquecimento foi interrompido mantendo-se a agitação até a solução atingir a temperatura ambiente. A solução então foi transferida para um frasco de vidro protegido da luz e guardado em refrigerador.

B) Modificação das Nanofibras de PA6/PAH com as AuNps

As nanofibras de PA6/PAH foram modificadas com imersão das mantas eletrofiadas na solução coloidal das AuNps por 12h, seguido de lavagem com água destilada e secas à temperatura ambiente.

C) Modificação das Nanofibras de PA6/PAH com os MWCNTs

A modificação foi realizada conforme o procedimento descrito na seção 4.3 nos itens A e B.

D) Imobilização do Anticorpo CA 19-9

As mantas modificadas com AuNps sobre o substrato FTO foram imersas por 1h em solução 1 mmol.L⁻¹ do ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) em etanol, para adsorção nas AuNps. As mantas foram então lavadas com água ultrapura e secas com jato de nitrogênio. Os eletrodos foram imersos por 24h numa mistura 0,1 mol.L⁻¹ de NHS e EDC na proporção (1:1) em tampão PBS 7,4. Para imobilização dos anticorpos, 25 µL da solução de anticorpos CA 19-9 (1:1000) foram colocados na superfície do eletrodo por 50 min a 37°C. Para evitar adsorção não específica de anticorpos CA 19-9, o filme foi imerso numa solução de proteína albumina do soro bovino (BSA) a 1% (m/v). Foi realizado o mesmo procedimento para as mantas de PA6/PAH com os MWCNTs, mas sem a etapa da imersão na solução de MUA.

E) Microscopia de Força Atômica (AFM)

Imagens de AFM foram obtidas utilizando um microscópio Bruker modelo dimension no modo *tapping* com força de 0,1 N e varredura de 0,6 Hz com as mantas depositadas em substrato de vidro.

F) Medidas Eletroanalíticas

As medidas eletroquímicas foram realizados no potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 204 (Metrohm) utilizando célula eletroquímica de 3 eletrodos com o substrato de FTO (0,5 cm²) com as mantas de PA6/PAH modificadas como eletrodo de trabalho, e a platina e o Ag/AgCl (KCl_{saturado}) como contra eletrodo e eletrodo de referência, respectivamente. As medidas de EIS foram realizadas no intervalo de 0,1 Hz a 100 kHz com amplitude de 10mV em potencial de circuito

aberto (OCP) numa cela eletroquímica contendo solução 5 mmol.L⁻¹ de K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆]. Para as medidas eletroquímicas, 50 µL da solução contendo os anticorpos anti-CA 19-9 foram adicionados sobre a superfície do eletrodo por 10 minutos. Após esse período, o eletrodo foi lavado com tampão e em seguida colocado na cela eletroquímica para a detecção.

4.5 Parte IV – Modificação das mantas de PA6/PAH com MWCNTs/AuNps e imobilização da enzima tirosinase (Tyr) para detecção do bisfenol A (BPA)

A) Modificação das Nanofibras de PA6/PAH com MWCNTs e AuNps

As nanofibras de PA6/PAH foram modificadas com imersão das mantas eletrofiadas na dispersão dos MWCNTs por 12h (item 4.2A), sendo as mantas então lavadas com água ultrapura, secas a temperatura ambiente e imersas na solução coloidal das AuNps (item 4.3A) por mais 12h. Em seguida, as mantas foram novamente lavadas com água ultrapura e secas à temperatura ambiente.

B) Imobilização da enzima tirosinase

As mantas modificadas com MWCNTs e AuNps sobre o substrato de FTO foram imersas por 1h em solução 1 mmol.L⁻¹ do ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) em etanol. Após o tempo de imersão as mantas foram lavadas com água ultrapura e secas com jato de nitrogênio. Para a imobilização da enzima tirosinase, uma mistura na proporção de (3:1) de 0,1 mmol.L⁻¹ de EDC e 0,1 mmol.L⁻¹ de NHS foi preparada com tampão fosfato em pH 7,0. 40 µL da mistura EDC/NHS e 10 µL de solução 1mg/mL da tirosinase foram depositadas na superfície das mantas e deixadas secar por 12 h em refrigerador a 4°C. Quando não em uso as nanofibras modificadas eram armazenadas nessas mesmas condições.

C) Espectroscopia de Reflexão-Absorção na Região do Infravermelho com Modulação da Polarização (PM-IRRAS)

A espectroscopia PM-IRRAS é uma variação da espectroscopia de infravermelho comum. É resultante da combinação da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e a modulação do feixe de luz incidente polarizada em alta frequência (50 kHz) entre a componente paralela (p) e

perpendicular (s) ao plano de incidência de luz. Com a modulação, pode-se obter informações sobre a orientação dos dipolos em filmes sobre a água ou em substratos refletivos. Para as condições de medida, quando a luz polarizada paralelamente sobre o plano de incidência é absorvido, observam-se dipolos orientados perpendicularmente ao plano do substrato, enquanto dipolos orientados paralelamente apresentam resposta a um feixe orientado perpendicularmente.

As medidas de PM-IRRAS foram realizadas em um espectrofotômetro KSV, modelo PMI 550 (KSV Instruments, Finlândia), com resolução espectral de 8 cm^{-1} e ângulo de incidência de 81° .

D) Medidas Eletroanalíticas

As medidas eletroquímicas foram executadas em potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 204 (Metrohm) utilizando célula eletroquímica de 3 eletrodos com o substrato de FTO ($0,5\text{ cm}^2$) com as mantas de PA6/PAH modificadas como eletrodo de trabalho, e a platina e o Ag/AgCl (KCl saturado) como contra eletrodo e eletrodo de referência, respectivamente. As medidas de EIS foram realizadas no intervalo de 0,1 Hz a 100 kHz com amplitude de 10mV em potencial de circuito aberto (OCP) numa cela eletroquímica contendo solução 5 mmol.L^{-1} de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

5. Resultados e Discussão

5.1 Parte I - Desenvolvimento das mantas de PA6/PAH

Para fabricar novos materiais para sensores, foram obtidas mantas com nanofibras eletrofiadas de PA6/PAH. Vários parâmetros podem influenciar a morfologia e o diâmetro das fibras, e por isso foram avaliados os efeitos da distância da agulha ao coletor (3 e 10 cm) e da tensão aplicada (15, 20 e 25 kV) sobre a eletrofiação da blenda PA6/PAH. As imagens de MEV da figura 10 mostram fibras homogêneas, sem porosidade e defeitos superficiais, em todas as condições experimentais utilizadas. O diâmetro médio das nanofibras, mostrado na Tabela 2, tende a diminuir com a distância agulha-coletor. Pois com o aumento da distância de trabalho, aumenta o tempo para evaporação do solvente durante o trajeto da ponta da agulha ao coletor, diminuindo o diâmetro das fibras. Observa-se também que a tensão aplicada afeta esse diâmetro. Na técnica de eletrofiação, a tensão aplicada e o campo elétrico resultante modificam o grau de alongação e a aceleração do jato, influenciando a morfologia das fibras. Na maioria dos casos, uma alta tensão induz maior grau de alongação do jato polimérico, resultando na diminuição do diâmetro médio das fibras.

Tabela 2 Diâmetro médio das nanofibras de PA6/PAH obtidas com eletrofiação variando-se os parâmetros tensão aplicada e distância agulha-coletor

Amostra	Distância agulha-coletor (cm)	Tensão (kV)	Diâmetro (nm)
1	3	15	109 ± 44
2	10	15	100 ± 32
3	3	20	105 ± 42
4	10	20	91 ± 31
5	3	25	96 ± 28
6	10	25	88 ± 24

Figura 10. Imagens de MEV das nanofibras de PA6/PAH obtidas com variação da tensão aplicada e da distância da agulha ao coletor. Condições: a) 15 kV e 3 cm, b) 15 kV e 10 cm, c) 20 kV e 3 cm, d) 20 kV e 10 cm, e) 25 kV e 3 cm e f) 25 kV e 10 cm. A taxa de ejeção e o diâmetro interno da agulha foram mantidos constantes

Após a determinação dos parâmetros experimentais otimizados ($d = 10$ cm e tensão de 25 kV) para a eletrofiação, nanofibras de PA6 foram obtidas com solução de 20% de PA6 em ácido fórmico. A imagem de MEV das nanofibras de PA6 está na

Figura 11, em que se verifica a obtenção de fibras com uma morfologia não homogênea (presença de *beads*) e com um diâmetro maior (226 ± 82 nm). Isto ocorre porque sem o PAH, que é um polieletrólito, a condutividade elétrica da solução é menor. Nas soluções com PAH, havia maior mobilidade das cargas, que associada ao campo elétrico externo aplicado, fazia com que a gota fosse mais facilmente alongada, espalhando-se em segmentos mais finos e resultando em fibras com menores diâmetros e morfologia mais homogênea.

Figura 11. Imagem de MEV das nanofibras de PA6. Condições: $d = 10$ cm, tensão de 25 kV, vazão = 0,01 mL/h.

As nanofibras de PA6 e PA6/PAH foram caracterizadas pela técnica de espectroscopia FTIR, cujos espectros estão na figura 12. Os dois espectros são semelhantes, destacando-se as bandas em 3300 cm^{-1} , característica da deformação axial da ligação N-H na estrutura nos dois polímeros, em 1640 cm^{-1} , correspondente à deformação axial da ligação C=O da amida do PA6.

Figura 12. Espectro na região do infravermelho das nanofibras de PA6 (linha contínua) e de PA6/PAH (linha tracejada).

As propriedades térmicas das nanofibras de PA6 e PA6/PAH foram avaliadas por TGA e DSC. A figura 13a mostra um único evento de perda de massa correspondente à decomposição térmica dos polímeros, para as duas amostras. Esta decomposição ocorre numa temperatura mais baixa para as nanofibras de blenda PA6/PAH. Das curvas de DSC na figura 13b, observa-se um pico endotérmico em torno de 220°C para as fibras de PA6, característico de fusão do polímero. A incorporação do PAH deslocou este pico para aproximadamente 200°C. A presença de um único processo nas curvas DSC e TGA das nanofibras da blenda indica a formação de uma única fase no material, evidenciando boa compatibilidade dos dois polímeros.

Figura 13. (a) Termogramas e (b) curvas de DSC das nanofibras de PA6 (linha contínua) e de PA6/PAH (linha tracejada).

5.2 Parte II – Modificação das mantas de PA6/PAH com MWCNTs e detecção do neurotransmissor dopamina (DA)

5.2.1 Modificação das Mantas de PA6/PAH com os MWCNTs

Para melhorar as propriedades elétricas das nanofibras de PA6/PAH visando a aplicações em sensores eletroquímicos, sua superfície foi modificada com nanotubos de carbono. As imagens de MEV-FEG da figura 14 indicam grande quantidade de nanotubos adsorvidos de forma homogênea na superfície das nanofibras, mesmos após várias lavagens com água destilada. A aderência deve ser resultado de ligações de hidrogênio entre os grupamentos N-H dos polímeros e as carboxilas dos nanotubos funcionalizados, além da interação eletrostática entre o PAH (polieletrólito catiônico) e grupos carboxilatos (carregados negativamente) nas paredes dos MWCNTs.

Figura 14. Imagens de MEV-FEG das nanofibras de PA6/PAH após a modificação da superfície com nanotubos de carbono ((a) e (b))

5.2.2 Caracterização Eletroquímica dos eletrodos de PA6/PAH-MWCNTs

As propriedades eletroquímicas dos eletrodos modificados foram estudadas por voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) em solução 5 mmol.L^{-1} $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ com $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de KCl. Os voltamogramas na figura 15a mostram perfil característico dos íons $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ com comportamento quasi-reversível para todos os eletrodos. A separação dos picos ($\Delta E = E_{pa} - E_{pc}$, onde E_{pa} e E_{pc} são os potenciais de pico anódico e catódico, respectivamente) foi 176 mV para o eletrodo de ITO sem modificação, 191 mV para o eletrodo PA6/PAH e 122 mV para o eletrodo PA6/PAH-MWCNTs. A incorporação das nanofibras de PA6/PAH também passivou parcialmente a superfície do eletrodo, causando diminuição na corrente anódica (I_{pa}), de 193 μA para o eletrodo de ITO para 177 μA para o eletrodo recoberto com PA6/PAH. Para o eletrodo de PA6/PAH-MWCNTs, I_{pa} aumenta para 262 μA . Os maiores valores de I_{pa} e menores de ΔE para os eletrodos de PAH/PA6-MWCNTs indicam transferência eletrônica mais favorável do que para os eletrodos de ITO não modificado e PA6/PAH.

Este comportamento pode ser comprovado com as curvas de Nyquist da figura 15b obtidas por EIE, em que os dados foram analisados utilizando um modelo de Randle para o circuito equivalente mostrado no encarte da figura. Os componentes do circuito são: R_s , relacionado à resistência da solução, C é a

capacitância na interface do eletrodo, R_{ct} é a resistência à transferência de carga (transferência eletrônica) e Z_w é a impedância de Warburg. A região semicircular em altas frequências é devida ao processo de transferência de carga interfacial, sendo seu diâmetro correspondente à resistência a transferência de carga (R_{ct}). A região linear a baixas frequências está relacionada ao processo difusional. Os eletrodos modificados com nanofibras PA6/PAH apresentaram os maiores valores de R_{ct} (214 Ω), pois as nanofibras impedem a transferência até a superfície do eletrodo de ITO. Para o eletrodo modificado com nanofibras de PA6/PAH-MWCNTs, $R_{ct} = 3\Omega$, muito abaixo do valor para o eletrodo de ITO não modificado (55 Ω). As nanofibras favorecem a dispersão dos nanotubos de carbono e aumentam a área superficial dos eletrodos, facilitando o transporte eletrônico em comparação com os eletrodos de ITO e ITO modificado somente com as nanofibras de PA6/PAH.

Figura 15. a) Voltamogramas Cíclicos e b) Curvas de Nyquist dos eletrodos de ITO, PA6 e PA6/PAH-MWCNTs em solução $5 \text{ mmol.L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4}$

5.2.3 Determinação Eletroquímica da dopamina (DA)

As propriedades eletroquímicas dos eletrodos de PA6/PAH-MWCNTs os tornam candidatos ideais para sensores. Isso foi confirmado com a detecção da dopamina (DA) ilustrada na figura 16 em que são mostrados os VCs dos eletrodos de ITO, PA6/PAH e PA6/PAH-MWCNTs, obtidos numa solução contendo $0,05 \text{ mmol.L}^{-1}$ DA em tampão fosfato (pH 7.0). Para o eletrodo de PA6/PAH-MWCNTs observa-se um par redox bem definido da DA. Entretanto, para os eletrodos de ITO não modificado e PA6/PAH não há pico no voltamograma, indicando que os MWCNTs atuam como sítios eletroativos para a oxidação da DA.

Figura 16. Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de ITO, PA6/PAH e PA6/PAH-MWCNTs na presença de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de DA em tampão fosfato pH 7.0.

O mecanismo proposto para oxidação da DA no eletrodo é constituído de três etapas exemplificadas na figura 17 [130]. No eletrodo ocorre oxidação da DA para dopaminaquinona (DQ) (1), que reage quimicamente para formar leucocromodopamina (LDC) (2) e é oxidada para cromodopamina (DC) (3).

Figura 17. Mecanismo de oxidação da DA no eletrodo [130].

Na figura 16 para o eletrodo de PA6/PAH-MWCNTs, os picos anódico e catódico da DA aparecem em 0,22 e 0,15 V, respectivamente, com $I_{pa} = 5,5 \mu\text{A}$ e $I_{pc} = 1,4 \mu\text{A}$ enquanto $\Delta E = 59 \text{ mV}$. Esse par redox é atribuído à oxidação da DA para DQ (pico anódico) e à redução da DQ para DA (pico catódico). Como a diferença entre I_{pa} e I_{pc} é grande, as reações eletroquímicas da DA nesse eletrodo são irreversíveis.

Para estudar o comportamento cinético da DA no eletrodo de PA6/PAH-MWCNTs, foram realizados VCs em velocidades de varredura de 20 a 300 mV/s numa solução tampão fosfato (pH 7.0) contendo $0,05 \text{ mmol.L}^{-1}$ DA (figura 18a). Da figura 18b observa-se que as correntes I_{pa} e I_{pc} aumentam linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura. Ou seja, o processo redox da DA no eletrodo de PA6/PAH-MWCNTs é controlado por difusão.

Figura 18. (a) Voltamogramas cíclicos em velocidades de varredura de 20 a 300mV/s em solução DA 0,05 mmol.L⁻¹. (b) Gráfico I vs $v^{1/2}$

A eficiência do eletrodo de PA6/PAH-MWCNTs na detecção da DA foi verificada empregando-se voltametria de pulso diferencial (VPD). Na VPD são usadas rampas de potencial em forma de pulsos programados, eliminando correntes não-faradáicas da VC, e aumentando a sensibilidade do eletrodo ao analito. A figura 19 mostra voltamogramas VPD para o eletrodo de PA6/PAH-MWCNTs. A corrente no pico de oxidação da DA (174 mV) varia linearmente, na faixa de 1 a 70 $\mu\text{mol/L}$ de DA, como observado na regressão linear no encarte da figura 19. O limite de detecção foi $0,15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ($S/N = 3$), similar ou melhor do que eletrodos encontrados na literatura indicados na Tabela 3.

Figura 19. Curvas VPD para várias concentrações de DA e curva de calibração (*inset*).

Tabela 3. Comparação de alguns tipos de eletrodos modificados utilizados na detecção da DA

Tipo de Eletrodo	Modificação	Limite de Detecção (LD)($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Faixa Linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Refs
GCE	Ag-Pt/p-CNFs	0.11	10-500	[131]
GCE	PANI-GO	0.50	2-18	[132]
GCE	SWCNH	0.06	0.2-3.8	[133]
GCE	PEDOT/PNMPy/ AuNPs	2.00-3.00	1-100	[134]
ITO	Nafion/MWCNT	0.20	0.1-10	[135]
ITO	PA6/PAH_MWCNTs	0.15	1-70	Este trabalho

CGE : (eletrodo de carbono vítreo), p-CNFs: (Nanofibras de carbono), GO: (óxido de grafeno), PANI: (polianilina), SWCNH: (Nanochifres de carbono parede simples), PEDOT: (poli(3,4-etilenodioxitiofeno), PNMPy: (polimetilpirrol).

Foi estudada para o eletrodo de PA6/PAH-MWCNTs a influência do ácido ascórbico (AA) e do ácido úrico (AU), dois possíveis interferentes em fluidos biológicos. A DA pode ser detectada em presença de AA e AU realizando-se dois experimentos. No primeiro, cujos resultados são mostrados na figura 20a, nota-se que o AA possui sinal desprezível mesmo para concentração ($0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$) maior que a encontrada normalmente no soro sanguíneo humano (cerca de $0,08 \text{ mmol.L}^{-1}$). Quando são adicionados simultaneamente AA, DA e AU na mesma amostra, novamente não há sinal do AA e observam-se dois picos separados do DA e AU. No segundo experimento (figura 20b), variou-se a concentração de DA e AU na faixa de $0,05$ a $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$, e, novamente observou-se a separação dos picos e a correlação das intensidades das correntes com a concentração de DA e AU adicionados.

Figura 20. Curvas VPD para detecção individual e simultânea de 0,05 mmol.L⁻¹ DA, 0,1 mmol.L⁻¹ UA e 0,1 mmol.L⁻¹ AA (a) Detecção simultânea de DA e UA em concentrações na faixa da 0,05 a 0,2 mmol.L⁻¹ (b) no eletrodo de PA6/PAH-MWCNTs

A reprodutibilidade do eletrodo de PA6/PAH-MWCNTs foi testada realizando-se repetidos VCs do eletrodo numa solução $0,05 \text{ mmol.L}^{-1}$ de DA em tampão fosfato (pH 7.0) em uma velocidade de varredura de 50 mV.s^{-1} . Nos voltamogramas da figura 21, nota-se que a corrente de oxidação da DA se mantém em 82% do valor inicial após 100 ciclos. Isso indica que o eletrodo de PA6/PAH-MWCNTs é estável, e os MWCNTs estão fortemente adsorvidos nas nanofibras de PA6/PAH.

Figura 21. Teste de estabilidade do eletrodo de PA6/PAH-MWCNTs em tampão fosfato (pH 7.0) contendo $0,05 \text{ mmol.L}^{-1}$ DA.

5.3 Parte III – Biossensores para detecção do biomarcador CA 19-9 utilizando Nanofibras de PA6/PAH modificadas com MWCNTs ou AuNps.

5.3.1 Modificação das Mantas de PA6/PAH com as AuNps

As imagens de MEV-FEG da figura 22 mostram as mantas de PA6/PAH após a modificação com as AuNps, com grande quantidade de esferas recobrindo as fibras. Assim, AuNps foram adsorvidas de forma homogênea na superfície das nanofibras, mesmos após várias lavagens com água ultrapura. A aderência, assim como nos MWCNTs (figura 14), deve-se às ligações de hidrogênio entre os grupamentos N-H dos polímeros e as carboxilas dos grupos citrato nas paredes das AuNps, e à interação eletrostática entre o PAH (polieletrólito catiônico) e AuNps estabilizadas com o grupo citrato carregado negativamente.

Figura 22. Imagens de MEV-FEG das nanofibras de PA6/PAH após modificação da superfície com nanopartículas de ouro (AuNps) ((a) e (b))

5.3.2 Detecção de Amostras Sintéticas de Antígeno CA 19-9

As figuras 23 e 24 mostram os diagramas de Bode (figura a) e os gráficos de impedância relativa (figura b) para várias concentrações de antígeno comercial do CA 19-9 para as nanofibras de PA6/PAH-MWCNTs@anti CA 19-9 e PA6/PAH-AuNps@anti CA19-9, respectivamente, ambas com o anticorpo CA 19-9 imobilizado. Pela análise visual dos gráficos observam-se diferentes capacidades de distinção

das concentrações do antígeno CA 19-9. Para a arquitetura das nanofibras de PA6/PAH-MWCNT, essa distinção ocorre até cerca de 40 U.mL^{-1} , enquanto na arquitetura com nanofibras de PA6/PAH-AuNps ela ocorre até cerca de 10 U.mL^{-1} .

Figura 23. Diagrama de Bode $|Z|$ vs f para os eletrodos de PA6/PAH-MWCNT@anti CA 19-9 em diferentes concentrações de antígeno CA 19-9 (a). Módulo da Impedância Relativa (sinal do analito descontado do sinal do branco) em função da concentração do antígeno CA19-9 (b)

Figura 24. Diagrama de Bode $|Z|$ vs f para os eletrodos de PA6/PAH-AuNps@anti CA 19-9 em diferentes concentrações de antígeno CA 19-9 (a). Módulo da Impedância Relativa (sinal do analito descontado do sinal do branco) em função da concentração do antígeno CA19-9 (b)

Para avaliar a eficiência de cada uma das arquiteturas na detecção do CA 19-9 foi empregada uma técnica que permite comparar qualitativamente o desempenho dos biossensores. Os espectros de impedância relativa vs frequência foram mapeados pela técnica de projeção multidimensional (IDMAP). Nesta técnica, cada espectro de impedância x frequência das figuras 23a e 24a é transformado em um ponto e mapeado em uma figura 2D (figura 25), em que se tenta manter a informação do espaço multidimensional original. Ou seja, espectros semelhantes (neste caso com concentrações próximas de CA 19-9) devem gerar pontos próximos no gráfico em 2D.

Figura 25. IDMAP obtido a partir das curvas de Impedância Relativa (sinal do analito descontado do sinal do branco) vs Frequência do antígeno CA 19-9 para os biossensores nas arquiteturas de PA6/PAH-MWCNT (azul) e PA6/PAH-AuNps (vermelho)

A comparação das arquiteturas pelo IDMAP da Figura 25 permite observar que a arquitetura PA6/PAH – MWCNT (azul) apresentou melhor distinção na separação entre as várias concentrações de CA 19-9. Enquanto as nanofibras contendo os CNTs apresentaram distinções nas suas respostas na concentração de CA 19-9 até 50 U.mL⁻¹, nas nanofibras contendo as AuNps essa distinção chegou a 14 U.mL⁻¹. Isto pode estar relacionado à maior área superficial proporcionada pelos CNTs devido a sua geometria alongada, o que permite um recobrimento das

nanofibras e a formação de um filme entre elas. Este filme pode ser observado na figura 14a, e permitiria explicar o maior ancoramento de moléculas grandes como o anticorpo anti CA 19-9. Tal efeito não seria observado nas nanofibras recobertas com as AuNps (figura 22b), onde as nanopartículas recobrem somente as nanofibras e a geometria da superfície não seria favorável para o ancoramento de proteínas maiores. Isto é visto nas imagens de AFM da figura 26, onde são mostradas as duas arquiteturas com o antígeno CA 19-9 depositados sobre a superfície. Para as nanofibras recobertas com as AuNps (figura 26a), observa-se que o CA 19-9 tende a se depositar ao longo das nanofibras, aumentando seu diâmetro. No caso das mantas contendo os CNTs (figura 26b), o antígeno CA 19-9 tende a se fixar sobre a superfície das mantas (regiões mais claras).

Figura 26. Imagens de AFM: (a) PA6/PAH-AuNps@anti Ca 19-9 + 5 U/mL CA 19-9 e (b) PA6/PAH-MWCNTs@anti CA 19-9 + 40 U/mL CA 19-9

5.3.3 Detecção com Amostras Reais de Antígeno CA 19-9

Após a avaliação da eficiência das arquiteturas na distinção das concentrações do antígeno CA 19-9, os eletrodos com cada uma das arquiteturas foram testados utilizando amostras reais de soro do sangue de 4 pacientes do Hospital de Câncer de Barretos (Comite de Ética número: 1.447.041, Brasil). Foram duas amostras de pacientes com câncer de pâncreas e duas amostras de pacientes com menores concentrações de CA 19-9, e portanto não tendo probabilidade de câncer de pâncreas. Das projeções de IDMAP na Figura 26, os eletrodos de PA6/PAH-MWCNT e PA6/PAH-AuNps reproduziram os resultados na detecção do CA 19-9 com excelente distinção entre as amostras, agrupando-as em duas regiões separadas. Isto indica que os imunossensores fabricados a partir da modificação das nanofibras de PA6/PAH com CNTs ou AuNps são bons candidatos a serem utilizados na distinção entre pacientes saudáveis e com alta probabilidade de ter câncer de pâncreas.

(b)

Figura 27 IDMAP obtido de 4 amostras reais de sangue de pacientes do Hospital de Câncer de Barretos PA6/PAH-MWCNT@anti CA 19-9 (a) e PA6/PAH-AuNps@anti CA 19-9 (b)

5.3.4 Estudo de Interferentes

O estudo dos interferentes foi realizado para avaliar se outras substâncias presentes no sangue podem interferir na resposta de detecção do antígeno CA 19-9, indicando alteração na ligação específica antígeno-anticorpo. Os interferentes testados foram a glicose e ácido ascórbico (AA), além do soro fetal bovino que simula uma situação de medida real com soro de sangue. As Figuras 27a e 27b mostram os gráficos de barras com os valores de impedância relativa para cada interferente para as arquiteturas PA6/PAH-MWCNT e PA6/PAH-AuNps, respectivamente. Não há variação maior na resposta de cada interferente em relação ao sinal do tampão PBS para ambas as arquiteturas, mostrando que os interferentes não modificam a superfície dos eletrodos porque os valores de impedância se mantêm similares aos do eletrodo modificado com o anticorpo anti

CA 19-9. A alteração dos valores só é observada na presença do antígeno CA 19-9, mostrando a alta especificidade do biossensor.

Figura 28. Resposta dos eletrodos de PA6/PAH-MWCNTS (a) e PA6/PAH-AuNps (b), a diferentes interferentes

5.4 Parte IV – Modificação das mantas de PA6/PAH com MWCNTs/ AuNps e imobilização da enzima tirosinase para detecção do bisfenol A (BPA)

5.4.1 Modificação das mantas de PA6/PAH com MWCNTs e AuNps

Assim como nas plataformas utilizadas na detecção da DA e do CA 19-9 (itens 5.2.1 e 5.3.1), ampliando as possibilidades de utilização das nanofibras de PA6/PAH, foi realizada uma nova modificação, desta vez incorporando os MWCNTs e as AuNps conjuntamente sobre as mantas. (Nas seções anteriores as plataformas utilizaram somente um dos materiais somente os MWCNTs ou AuNps). O resultado pode ser observado nas imagens de MEV-FEG da Figura 29, em que as mantas de PA6/PAH apresentaram grande mudança na morfologia. Quase não se observam mais as nanofibras dispostas de maneira aleatória umas sobre as outras. A incorporação dos MWCNTs e AuNPs sobre as nanofibras criou uma nova estrutura 3D formada por CNTs na regiões mais escuras e AuNps nas regiões mais claras. Esta nova estrutura é mais rugosa e se estende por toda extensão da manta, como pode ser visto na Figura 29. Devido a esta estrutura 3D que se interconecta ser formada predominantemente por MWCNT e AuNps, espera-se um aumento na capacidade sensora do eletrodo.

Figura 29. Imagens de MEV-FEG das nanofibras de PA6/PAH após modificação da superfície com Nanotubos de Carbono (MWCNT) e nanopartículas de ouro (AuNps) ((a) e (b))

5.4.2 Caracterização Eletroquímica dos eletrodos de PA6/PAH-MWCNTs – AuNps

A Figura 30 mostra os VCs em tampão fosfato (pH 7,0), contendo $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de BPA para os eletrodos de PA6/PAH-MWCNTs-Tyr, PA6/PAH-AuNps-Tyr e PA6/PAH-MWCNTs-AuNps-Tyr, todos com a enzima tirosinase (Tyr) imobilizada na superfície das mantas. Há um pico catódico em 17 mV e um anódico em 24 mV devido ao par redox Cu(II)/Cu(III) do sítio ativo da tirosinase. O eletrodo contendo mantas modificadas com AuNps e MWCNTs (PA6/PAH-MWCNTs-AuNps) apresentou picos redox mais definidos e com maiores correntes do que os modificados somente com CNTs ou AuNps (PA6/PAH-MWCNTs-Tyr e PA6/PAH-AuNps-Tyr). Ou seja, houve sinergia entre CNTs e AuNps na superfície da manta para aumentar a transferência de elétrons entre o sítio ativo da enzima e o FTO. Por isso, o eletrodo de PA6/PAH-MWCNTs-AuNps-Tyr foi escolhido para continuar os estudos do biossensor de BPA.

Figura 30. Voltamogramas cíclicos para eletrodos PA6/PAH-MWCNTs-Tyr (preto), PA6/PAH-AuNps-Tyr (vermelho) PA6/PAH-MWCNTs-AuNps-Tyr (azul) em solução $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ BPA em tampão fosfato pH 7,0, velocidade de varredura 100 mV.s^{-1} .

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foi empregada para investigar as mudanças causadas na modificação do eletrodo, desde o substrato de FTO puro até a incorporação das mantas de PA6/PAH-MWCNTs-AuNps e enzima Tyr imobilizada. A Figura 31 mostra diagramas de Nyquist em potencial de circuito aberto (OCP) em solução $5 \text{ mmol.L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ com $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de KCl. A resistência à transferência de carga (R_{ct}) do eletrodo modificado PA6/PAH-MWCNTs-AuNps (15Ω) é menor do que para FTO puro (40Ω). Isto é, mantas modificadas com CNTs e AuNps favorecem o transporte eletrônico e aumentam a área superficial do eletrodo. Também na Figura 31 observa-se que R_{ct} aumenta para 47Ω após a incorporação da enzima Tyr, confirmando a adsorção da enzima que aumenta a resistência à transferência de carga na superfície.

Figura 31. Curvas de Nyquist do eletrodo de PA6/PAH-MWCNTs-AuNPs-Tyr em cada etapa de modificação, solução $5 \text{ mmol.L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$

5.4.3 Espectroscopia vibracional PM-IRRAS dos eletrodos PA6/PAH-MWCNTS – AuNps- Tyr

A Figura 32 ilustra os espectros PM-IRRAS das mantas de PA6/PAH antes da adsorção dos MWCNTs e AuNps, e da enzima Tyr. Observam-se bandas típicas de grupos amida I (estiramento C=O em 1650 cm^{-1}) e amida II (flexão N-H e estiramento C-N em 1550 cm^{-1}) presentes tanto nas mantas de PA6/PAH como na enzima Tyr. A diminuição das intensidades das bandas de amida I e II, após a modificação das nanofibras com os MWCNTs e AuNps, indica que estes materiais recobrem boa parte da superfície das nanofibras. A imobilização da enzima Tyr pode ser comprovada pelo deslocamento das bandas de amida I (de 1650 para 1660 cm^{-1}) e II (de 1550 para 1563 cm^{-1}) e pelo alargamento da banda de amida I, típica de conformações do tipo folhas beta em proteínas.

Figura 32 Espectro PM-IRRAS das nanofibras de PA6/PA (preto) PA6/PAH-CNTs-AuNps (verde) e PA6/PAH-CNTs-AunPs-Tyr (marron) na região de 1500 a 1800 cm^{-1}

5.2.4 Determinação Eletroquímica do Bisfenol A (BPA)

Os VCs do eletrodo de PAH/PA6-MWCNTs-AuNps-Tyr na Figura 33 mostram que as correntes nos picos catódico e anódico aumentam com a concentração de BPA em tampão fosfato pH 7,0, indicando que a Tyr mantém a atividade catalítica mesmo após sua imobilização.

Figura 33 Voltamogramas Cíclicos (VCs) do eletrodo PA6/PAH-MWCNTs-AuNps-Tyr em Tampão Fosfato (pH 7.0) e 0, 10 20 e 30 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de BPA.

Para verificar a resposta do eletrodo de PA6/PAH-MWCNTs-AuNps na detecção do BPA, foi empregada a cronoamperometria, uma técnica voltamétrica mais sensível que a VC e mais indicada para realizar estudos analíticos nos biossensores. A Figura 34 mostra a curva de calibração para BPA. A corrente no potencial de 20 mV (pico catódico) varia linearmente no intervalo de 0,05 a 1,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de BPA como observado na regressão linear da Figura 34b, antes de mostrar uma tendência à saturação para concentrações maiores. O limite de detecção ($\text{LD} = 3 \sigma/S$) foi 8 nmol.L^{-1} com reprodutibilidade de 6,8 % ($n= 10$) e repetibilidade de 3,3 % ($n=3$).

Figura 34. Cronoamperometria para o eletrodo PA6/PAH-MWCNTs-AuNps-Tyr em várias concentrações de BPA em tampão fosfato pH 7.0. Potencial 0,2 V por 60 s (a), Curva de Calibração (b)

Foi realizado um estudo para determinar a seletividade do biossensor a diferentes interferentes fenólicos como o 4-metoxifenol, 4-etilfenol, fenol e o 4-nitrofenol, em comparação com a resposta catalítica do BPA. Os resultados de cronoamperometria da Figura 35 mostram que de todos os interferentes, somente o fenol apresenta um incremento de corrente de aproximadamente metade da corrente do BPA para concentrações 30 vezes maiores que o BPA. Para os outros interferentes não há variação significativa na corrente para concentrações 30 vezes maiores que o BPA. Isso demonstra a boa seletividade do biossensor na detecção do BPA.

Figura 35. Cronoamperometria para o eletrodo PA6/PAH-MWCNTs-AuNps-Tyr e os seguintes interferentes: 4-metoxifenol (1) 4-aminofenol (2) 4-etilfenol (3) BPA (4) fenol (5) 4-nitrofenol (6) em tampão fosfato pH 7.0. Potencial 0,2 V. Concentração BPA: $1 \mu\text{molL}^{-1}$, Interferentes: $30 \mu\text{molL}^{-1}$

6. Conclusões e Perspectivas

Neste trabalho foram obtidas blendas poliméricas formadas de nanofibras de Poliamida 6/Polialilamina hidroclorada (PA6/PAH) com a técnica de eletrofiação. Ajustes nos parâmetros de concentração, distância do coletor e tensão permitiram obter nanofibras com diâmetro na ordem de 100 nm, sem defeitos e com morfologia homogênea. A composição química da blenda polimérica, em conjunto com a alta área superficial das nanofibras de PA6/PAH, possibilitou que nanomateriais como nanotubos de carbono (MWCNT) e nanopartículas de ouro (AuNps) fossem incorporados à superfície das mantas, com consequente utilização em sensores e biossensores.

A combinação das nanofibras de PA6/PAH com os MWCNTs mostrou que a incorporação deste nanomaterial melhorou a transferência eletrônica dos eletrodos e permitiu construir um sensor para a detecção da dopamina (DA) com limite de detecção de $0,15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ com alta reprodutibilidade e estabilidade. O sensor foi seletivo para a determinação da DA na presença de interferentes, como o ácido ascórbico (AA) e o ácido úrico (AU). As nanofibras de PA6/PAH também puderam ser modificadas com nanopartículas de ouro (PA6/PAH-AUNps). Assim, foram produzidas duas arquiteturas em imunossensores para detectar o biomarcador CA 19-9, um antígeno presente em células de câncer de pâncreas. Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e a técnica de projeção multidimensional (IDMAP) mostraram que ambas as arquiteturas apresentaram capacidade de distinção para o antígeno CA 19-9, com saturação em 40 U.mL^{-1} para a arquitetura PA6/PAH-MWCNT e 10 U.mL^{-1} para PA6/PAH-AuNps. Análises de IDMAP em amostras de sangue de pacientes mostraram que ambas arquiteturas puderam distinguir dois grupos: pacientes com pouca e muita probabilidade de desenvolver câncer de pâncreas. A arquitetura PA6-/PAH-MWCNTS apresentou maior capacidade de distinção entre as amostras reais, com melhor separação dos dois grupos.

As nanofibras de PA6/PAH foram combinadas com os MWCTS e AuNps e utilizadas no biossensoriamento do disruptor endócrino Bisfenol A (BPA). Medidas de cronoamperometria possibilitaram a detecção de pequenas concentrações de BPA na faixa de $0,05$ a $1,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ com LD de 8 nmol.L^{-1} . O estudo com diversos

compostos fenólicos mostrou que somente o fenol interfere na resposta do eletrodo em concentrações 30 vezes maiores que o BPA.

Em suma, a fabricação de mantas de nanofibras com diâmetro na escala nanométrica e a incorporação de nanomateriais e biomoléculas na sua superfície permitem criar novas funcionalidades, inclusive em plataformas para a construção de sensores e biossensores mais eficientes. Dos resultados apresentados nesta tese, abrem-se perspectivas de produzir mantas eletrofiadas a partir de outros polímeros, para diferentes funcionalidades. Além disso, novos nanomateriais e biomoléculas podem ser incorporados sobre estas mantas, criando-se plataformas sensoras mais sensíveis e seletivas.

7. Referências

1. Martínez-Máñez, K.R.a.R., *The Supramolecular chemistry of organic – inorganic hybrid materials*, ed. Willey. 2010.
2. DURÁN, N.M., L.H.C.; MORAIS, P.C, *Nanotecnologia*. 2006: Artliber.
3. Seeram Ramakrishna, K.F., Wee -Eong Teo, Teik Cheng Lim, Zuwei Ma, *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*. 2005: World Scientific.
4. Bhardwaj, N. and S.C. Kundu, *Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique*. Biotechnology Advances, 2010. **28**(3): p. 325-347.
5. Subbiah, T., et al., *Electrospinning of nanofibers*. Journal of Applied Polymer Science, 2005. **96**(2): p. 557-569.
6. Miao, F., et al., *Electrospun Carbon Nanofibers/Carbon Nanotubes/Polyaniline Ternary Composites with Enhanced Electrochemical Performance for Flexible Solid-State Supercapacitors*. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2016. **4**(3): p. 1689-1696.
7. Jung, D., et al., *Incorporation of functionalized gold nanoparticles into nanofibers for enhanced attachment and differentiation of mammalian cells*. Journal of Nanobiotechnology, 2012. **10**: p. 23-23.
8. Shi, Y., et al., *Electrospun polyacrylonitrile nanofibers loaded with silver nanoparticles by silver mirror reaction*. Materials Science and Engineering: C, 2015. **51**: p. 346-355.
9. Gokceoren, A.T., E. Kaplan, and Y. Arsalanoglu, *Electrochemical Analysis of Phthalocyanine Grafted Polymer Nanofibers*. Meeting Abstracts, 2014. **MA2014-01**(35): p. 1350-1350.
10. Jia, H., et al., *Enzyme-Carrying Polymeric Nanofibers Prepared via Electrospinning for Use as Unique Biocatalysts*. Biotechnology Progress, 2002. **18**(5): p. 1027-1032.
11. Olubi, O., et al., *Fabrication of electroactive composite nanofibers of functionalized polymer and CNT capable of specifically binding with the IgE (Immunoglobulin E) antibody*. Surface and Interface Analysis, 2014. **46**(4): p. 237-242.
12. Matthew, R.A., et al., *Synthesis of electrospun silica nanofibers for protein/DNA binding*. Materials Letters, 2016. **184**: p. 5-8.

13. Aussawasathien, D., J.H. Dong, and L. Dai, *Electrospun polymer nanofiber sensors*. Synthetic Metals, 2005. **154**(1): p. 37-40.
14. Camposeo, A., M. Moffa, and L. Persano, *Electrospun Fluorescent Nanofibers and Their Application in Optical Sensing*, in *Electrospinning for High Performance Sensors*, A. Macagnano, E. Zampetti, and E. Kny, Editors. 2015, Springer International Publishing: Cham. p. 129-155.
15. Han, L., et al., *Electrospun Composite Nanofibers for Sensor Applications*. MRS Proceedings, 2011. **1240**.
16. Silva, A.N.R.d., et al., *Electrostatic deposition of nanofibers for sensor application*. Materials Research, 2005. **8**: p. 105-108.
17. Marx, S., et al., *Electrospun gold nanofiber electrodes for biosensors*. Biosensors and Bioelectronics, 2011. **26**(6): p. 2981-2986.
18. Li, D., M.W. Frey, and A.J. Baeumner, *Electrospun polylactic acid nanofiber membranes as substrates for biosensor assemblies*. Journal of Membrane Science, 2006. **279**(1-2): p. 354-363.
19. Modesti, M., C. Boaretti, and M. Roso, *Electrospun Nanofiber Membrane for Biosensors*, in *Encyclopedia of Membranes*, E. Drioli and L. Giorno, Editors. 2015, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1-4.
20. Li, D., et al., *A catechol biosensor based on electrospun carbon nanofibers*. Beilstein Journal of Nanotechnology, 2014. **5**: p. 346-354.
21. Shi, X., et al., *Electrospinning of Nanofibers and Their Applications for Energy Devices*. Journal of Nanomaterials, 2015. **2015**: p. 20.
22. Coşkuner Filiz, B. and A. Kantürk Figen, *Fabrication of electrospun nanofiber catalysts and ammonia borane hydrogen release efficiency*. International Journal of Hydrogen Energy, 2016. **41**(34): p. 15433-15442.
23. Zeleny, J., *The Electrical Discharge from Liquid Points, and a Hydrostatic Method of Measuring the Electric Intensity at Their Surfaces*. Physical Review, 1914. **3**(2): p. 69-91.
24. Taylor, G., *Electrically Driven Jets*. Proceedings of the Royal Society of London. A. Mathematical and Physical Sciences, 1969. **313**(1515): p. 453.
25. Baumgarten, P.K., *Electrostatic spinning of acrylic microfibers*. Journal of Colloid and Interface Science, 1971. **36**(1): p. 71-79.
26. Doshi, J. and D.H. Reneker, *Electrospinning process and applications of electrospun fibers*. Journal of Electrostatics, 1995. **35**(2): p. 151-160.

27. Li, D. and Y. Xia, *Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel?* Advanced Materials, 2004. **16**(14): p. 1151-1170.
28. Collins, G., et al., *Charge generation, charge transport, and residual charge in the electrospinning of polymers: A review of issues and complications.* Journal of Applied Physics, 2012. **111**(4): p. 044701.
29. Reneker, D.H. and A.L. Yarin, *Electrospinning jets and polymer nanofibers.* Polymer, 2008. **49**(10): p. 2387-2425.
30. Available from: <http://spinaid.weebly.com/electrospinning.html>.
31. Khalil, A., et al., *Electrospun metallic nanowires: Synthesis, characterization, and applications.* Journal of Applied Physics, 2013. **114**(17): p. 171301.
32. He, J.-H., Y. Wu, and W.-W. Zuo, *Critical length of straight jet in electrospinning.* Polymer, 2005. **46**(26): p. 12637-12640.
33. Shin, Y.M., et al., *Electrospinning: A whipping fluid jet generates submicron polymer fibers.* Applied Physics Letters, 2001. **78**(8): p. 1149-1151.
34. Shin, Y.M., et al., *Experimental characterization of electrospinning: the electrically forced jet and instabilities.* Polymer, 2001. **42**(25): p. 09955-09967.
35. Retirado da Pagina Web <http://faculty.washington.edu/woodrow/> em: dez/2016.
36. Retirado da Pagina Web : <https://sites.google.com/site/nurfaizey/home> em dez/2015.
37. Retirado da Pagina Web: <https://en.wikipedia.org/wiki/Electrospinning> em dez/2015.
38. Gupta, P., et al., *Electrospinning of linear homopolymers of poly(methyl methacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent.* Polymer, 2005. **46**(13): p. 4799-4810.
39. Tan, S.H., et al., *Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process.* Polymer, 2005. **46**(16): p. 6128-6134.
40. Zhu, Y., et al., *Macro-alignment of electrospun fibers for vascular tissue engineering.* Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2010. **92B**(2): p. 508-516.
41. Yang, F., et al., *Electrospinning of nano/micro scale poly(l-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering.* Biomaterials, 2005. **26**(15): p. 2603-2610.

42. Lin, K., et al., *Reducing electrospun nanofiber diameter and variability using cationic amphiphiles*. Polymer, 2007. **48**(21): p. 6384-6394.
43. Huang, Z.-M., et al., *A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites*. Composites Science and Technology, 2003. **63**(15): p. 2223-2253.
44. Ki, C.S., et al., *Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin-formic acid solution*. Polymer, 2005. **46**(14): p. 5094-5102.
45. Kim, B., et al., *Poly(acrylic acid) nanofibers by electrospinning*. Materials Letters, 2005. **59**(7): p. 829-832.
46. Demir, M.M., et al., *Electrospinning of polyurethane fibers*. Polymer, 2002. **43**(11): p. 3303-3309.
47. Mit-uppatham, C., M. Nithitanakul, and P. Supaphol, *Ultrafine Electrospun Polyamide-6 Fibers: Effect of Solution Conditions on Morphology and Average Fiber Diameter*. Macromolecular Chemistry and Physics, 2004. **205**(17): p. 2327-2338.
48. Medeiros, E.S., et al., *Effect of relative humidity on the morphology of electrospun polymer fibers*. Canadian Journal of Chemistry, 2008. **86**(6): p. 590-599.
49. Sun, Z., et al., *Compound Core-Shell Polymer Nanofibers by Co-Electrospinning*. Advanced Materials, 2003. **15**(22): p. 1929-1932.
50. Zhang, Y., et al., *Preparation of Core-Shell Structured PCL-r-Gelatin Bi-Component Nanofibers by Coaxial Electrospinning*. Chemistry of Materials, 2004. **16**(18): p. 3406-3409.
51. Wang, M., et al., *Production of Submicron Diameter Silk Fibers under Benign Processing Conditions by Two-Fluid Electrospinning*. Macromolecules, 2006. **39**(3): p. 1102-1107.
52. Megelski, S., et al., *Micro- and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers*. Macromolecules, 2002. **35**(22): p. 8456-8466.
53. Koombhongse, S., W. Liu, and D.H. Reneker, *Flat polymer ribbons and other shapes by electrospinning*. Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 2001. **39**(21): p. 2598-2606.
54. Deitzel, J.M., et al., *Controlled deposition of electrospun poly(ethylene oxide) fibers*. Polymer, 2001. **42**(19): p. 8163-8170.

55. Li, D., Y. Wang, and Y. Xia, *Electrospinning of Polymeric and Ceramic Nanofibers as Uniaxially Aligned Arrays*. Nano Letters, 2003. **3**(8): p. 1167-1171.
56. Buttafoco, L., et al., *Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications*. Biomaterials, 2006. **27**(5): p. 724-734.
57. Kim, Y.-t., et al., *The role of aligned polymer fiber-based constructs in the bridging of long peripheral nerve gaps*. Biomaterials, 2008. **29**(21): p. 3117-3127.
58. Theron, A., E. Zussman, and A.L. Yarin, *Electrostatic field-assisted alignment of electrospun nanofibres*. Nanotechnology, 2001. **12**(3): p. 384.
59. Matthews, J.A., et al., *Electrospinning of Collagen Nanofibers*. Biomacromolecules, 2002. **3**(2): p. 232-238.
60. Kim, K.W., et al., *The effect of molecular weight and the linear velocity of drum surface on the properties of electrospun poly(ethylene terephthalate) nonwovens*. Fibers and Polymers, 2004. **5**(2): p. 122-127.
61. Li, D. and Y. Xia, *Direct Fabrication of Composite and Ceramic Hollow Nanofibers by Electrospinning*. Nano Letters, 2004. **4**(5): p. 933-938.
62. Stanishevsky, A., et al., *Ribbon-like and spontaneously folded structures of tungsten oxide nanofibers fabricated via electrospinning*. RSC Advances, 2015. **5**(85): p. 69534-69542.
63. Kiselev, P. and J. Rosell-Llompart, *Highly aligned electrospun nanofibers by elimination of the whipping motion*. Journal of Applied Polymer Science, 2012. **125**(3): p. 2433-2441.
64. Lee, M.W., et al., *Electrospun Polystyrene Nanofiber Membrane with Superhydrophobicity and Superoleophilicity for Selective Separation of Water and Low Viscous Oil*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2013. **5**(21): p. 10597-10604.
65. Carrizales, C., et al., *Thermal and mechanical properties of electrospun PMMA, PVC, Nylon 6, and Nylon 6,6*. Polymers for Advanced Technologies, 2008. **19**(2): p. 124-130.
66. Piperno, S., et al., *PMMA nanofibers production by electrospinning*. Applied Surface Science, 2006. **252**(15): p. 5583-5586.
67. Götze, M., et al., *Processing of Polyamide Electrospun Nanofibers with Picosecond Uv-laser Irradiation*. Physics Procedia, 2016. **83**: p. 147-156.

68. Kayaci, F., Z. Aytac, and T. Uyar, *Surface modification of electrospun polyester nanofibers with cyclodextrin polymer for the removal of phenanthrene from aqueous solution*. Journal of Hazardous Materials, 2013. **261**: p. 286-294.
69. Jiang, S., et al., *Polyimide Nanofibers by "Green" Electrospinning via Aqueous Solution for Filtration Applications*. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2016. **4**(9): p. 4797-4804.
70. Park, J.-C., et al., *Electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibers: effects of degree of hydrolysis and enhanced water stability*. Polym J, 2010. **42**(3): p. 273-276.
71. Saquing, C.D., et al., *Alginate–Polyethylene Oxide Blend Nanofibers and the Role of the Carrier Polymer in Electrospinning*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2013. **52**(26): p. 8692-8704.
72. Dubey, P. and P. Gopinath, *Fabrication of electrospun poly(ethylene oxide)-poly(capro lactone) composite nanofibers for co-delivery of niclosamide and silver nanoparticles exhibits enhanced anti-cancer effects in vitro*. Journal of Materials Chemistry B, 2016. **4**(4): p. 726-742.
73. Homayoni, H., S.A.H. Ravandi, and M. Valizadeh, *Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization*. Carbohydrate Polymers, 2009. **77**(3): p. 656-661.
74. Murase, S.K., et al., *Amino acid-based poly(ester amide) nanofibers for tailored enzymatic degradation prepared by miniemulsion-electrospinning*. RSC Advances, 2015. **5**(68): p. 55006-55014.
75. del Valle, L.J., et al., *Electrospun nanofibers of a degradable poly(ester amide). Scaffolds loaded with antimicrobial agents*. Journal of Polymer Research, 2012. **19**(2): p. 9792.
76. Kim, C.-W., et al., *Structural studies of electrospun cellulose nanofibers*. Polymer, 2006. **47**(14): p. 5097-5107.
77. Han, S.O., et al., *Electrospinning of cellulose acetate nanofibers using a mixed solvent of acetic acid/water: Effects of solvent composition on the fiber diameter*. Materials Letters, 2008. **62**(4–5): p. 759-762.
78. Bellan, L.M., E.A. Strychalski, and H.G. Craighead, *Electrospun DNA nanofibers*. Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures Processing, Measurement, and Phenomena, 2007. **25**(6): p. 2255-2257.

79. Ner, Y., et al., *Enhanced fluorescence in electrospun dye-doped DNA nanofibers*. *Soft Matter*, 2008. **4**(7): p. 1448-1453.
80. Wnek, G.E., et al., *Electrospinning of Nanofiber Fibrinogen Structures*. *Nano Letters*, 2003. **3**(2): p. 213-216.
81. Haider, A., S. Haider, and I.-K. Kang, *A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology*. *Arabian Journal of Chemistry*.
82. Li, D., et al., *Photocatalytic deposition of gold nanoparticles on electrospun nanofibers of titania*. *Chemical Physics Letters*, 2004. **394**(4–6): p. 387-391.
83. Nartker, S., et al., *Electrospinning and Characterization of Polyvinyl Alcohol Nanofibers with Gold Nanoparticles*. *Nanoscience and Nanotechnology Letters*, 2015. **7**(9): p. 718-722.
84. Zhuang, X., et al., *Electrospun chitosan/gelatin nanofibers containing silver nanoparticles*. *Carbohydrate Polymers*, 2010. **82**(2): p. 524-527.
85. Saeed, K., et al., *Preparation of electrospun nanofibers of carbon nanotube/polycaprolactone nanocomposite*. *Polymer*, 2006. **47**(23): p. 8019-8025.
86. Dror, Y., et al., *Carbon Nanotubes Embedded in Oriented Polymer Nanofibers by Electrospinning*. *Langmuir*, 2003. **19**(17): p. 7012-7020.
87. Doh, S.J., et al., *Development of photocatalytic TiO₂ nanofibers by electrospinning and its application to degradation of dye pollutants*. *Journal of Hazardous Materials*, 2008. **154**(1–3): p. 118-127.
88. Vahtrus, M., et al., *Mechanical characterization of TiO₂ nanofibers produced by different electrospinning techniques*. *Materials Characterization*, 2015. **100**: p. 98-103.
89. Wen, S., et al., *Hierarchical electrospun SiO₂ nanofibers containing SiO₂ nanoparticles with controllable surface-roughness and/or porosity*. *Materials Letters*, 2010. **64**(13): p. 1517-1520.
90. Ganesh, V.A., et al., *Electrospun SiO₂ nanofibers as a template to fabricate a robust and transparent superamphiphobic coating*. *RSC Advances*, 2013. **3**(12): p. 3819-3824.
91. Shao, C., et al., *A novel method for making ZrO₂ nanofibres via an electrospinning technique*. *Journal of Crystal Growth*, 2004. **267**(1–2): p. 380-384.

92. Azad, A.-M., *Fabrication of yttria-stabilized zirconia nanofibers by electrospinning*. Materials Letters, 2006. **60**(1): p. 67-72.
93. Azad, A.-M., *Fabrication of transparent alumina (Al₂O₃) nanofibers by electrospinning*. Materials Science and Engineering: A, 2006. **435–436**: p. 468-473.
94. Ren, B., et al., *Electrospinning synthesis of porous Al₂O₃ nanofibers by pluronic P123 triblock copolymer surfactant and properties of uranium (VI)-sorption*. Materials Chemistry and Physics, 2016. **177**: p. 190-197.
95. Arshad, S.N., M. Naraghi, and I. Chasiotis, *Strong carbon nanofibers from electrospun polyacrylonitrile*. Carbon, 2011. **49**(5): p. 1710-1719.
96. Fang, J., et al., *Applications of electrospun nanofibers*. Chinese Science Bulletin, 2008. **53**(15): p. 2265.
97. Ramakrishna, S., et al., *Electrospun nanofibers: solving global issues*. Materials Today, 2006. **9**(3): p. 40-50.
98. Bagherzadeh, R., et al., *18 - Electrospun conductive nanofibers for electronics A2 - Afshari, Mehdi*, in *Electrospun Nanofibers*. 2017, Woodhead Publishing. p. 467-519.
99. Chae, T. and F. Ko, *19 - Electrospun nanofibrous tissue scaffolds A2 - Afshari, Mehdi*, in *Electrospun Nanofibers*. 2017, Woodhead Publishing. p. 521-550.
100. Gorji, M., R. Bagherzadeh, and H. Fashandi, *21 - Electrospun nanofibers in protective clothing A2 - Afshari, Mehdi*, in *Electrospun Nanofibers*. 2017, Woodhead Publishing. p. 571-598.
101. Qin, X. and S. Subianto, *17 - Electrospun nanofibers for filtration applications A2 - Afshari, Mehdi*, in *Electrospun Nanofibers*. 2017, Woodhead Publishing. p. 449-466.
102. Carla, M., et al., *Polyvinyl alcohol electrospun nanofibers containing Ag nanoparticles used as sensors for the detection of biogenic amines*. Nanotechnology, 2015. **26**(7): p. 075501.
103. Guan, X., et al., *Carbon Nanotubes-Adsorbed Electrospun PA66 Nanofiber Bundles with Improved Conductivity and Robust Flexibility*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2016. **8**(22): p. 14150-14159.
104. Mondal, K. and A. Sharma, *Recent advances in electrospun metal-oxide nanofiber based interfaces for electrochemical biosensing*. RSC Advances, 2016. **6**(97): p. 94595-94616.

105. Luo, Y., et al., *Novel Biosensor Based on Electrospun Nanofiber and Magnetic Nanoparticles for the Detection of E. coli O157:H7*. IEEE Transactions on Nanotechnology, 2012. **11**(4): p. 676-681.
106. Yeh, C.-T. and C.-Y. Chen, *pH-Responsive and pyrene based electrospun nanofibers for DNA adsorption and detection*. RSC Advances, 2017. **7**(10): p. 6023-6030.
107. Mehrotra, P., *Biosensors and their applications – A review*. Journal of Oral Biology and Craniofacial Research, 2016. **6**(2): p. 153-159.
108. Turner, A.P.F., *Biosensors: sense and sensibility*. Chemical Society Reviews, 2013. **42**(8): p. 3184-3196.
109. Mohanty, S.P. and E. Kougiannos, *Biosensors: a tutorial review*. IEEE Potentials, 2006. **25**(2): p. 35-40.
110. Oliveira, C. P. *Desenvolvimento de uma camada de reconhecimento biológico de ligação universal para utilização em imunoensaios*, Universidade Técnico de Lisboa. Dissertação , 2013. p.11
111. Iijima, S., *Helical microtubules of graphitic carbon*. Nature, 1991. **354**(6348): p. 56-58.
112. Terrones, M., *Carbon nanotubes: synthesis and properties, electronic devices and other emerging applications*. International Materials Reviews, 2004. **49**(6): p. 325-377.
113. Popov, V.N., *Carbon nanotubes: properties and application*. Materials Science and Engineering: R: Reports, 2004. **43**(3): p. 61-102.
114. Souza Filho, A.G.d. and S.B. Fagan, *Funcionalização de nanotubos de Carbono*. Química Nova, 2007. **30**: p. 1695-1703.
115. Charlier, J.C., *Defects in Carbon Nanotubes*. Accounts of Chemical Research, 2002. **35**(12): p. 1063-1069.
116. Journet, C. and P. Bernier, *Production of carbon nanotubes*. Applied Physics A, 1998. **67**(1): p. 1-9.
117. Rubio-Bollinger, G., et al., *Mechanical Properties and Formation Mechanisms of a Wire of Single Gold Atoms*. Physical Review Letters, 2001. **87**(2): p. 026101.
118. Dawson, K., et al., *Single Nanoskived Nanowires for Electrochemical Applications*. Analytical Chemistry, 2011. **83**(14): p. 5535-5540.

119. Welch, C.M. and R.G. Compton, *The use of nanoparticles in electroanalysis: a review*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006. **384**(3): p. 601-619.
120. Wise, R.A., *Dopamine, learning and motivation*. Nat Rev Neurosci, 2004. **5**(6): p. 483-494.
121. Ribeiro, J.A., et al., *Electrochemical sensors and biosensors for determination of catecholamine neurotransmitters: A review*. Talanta, 2016. **160**: p. 653-679.
122. Jiang, J. and X. Du, *Sensitive electrochemical sensors for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid based on Au@Pd-reduced graphene oxide nanocomposites*. Nanoscale, 2014. **6**(19): p. 11303-11309.
123. Zheng Wu, M., PhD, Anne I. Kuntz, RN, OCN, and Robert G. Wadleigh, MD, *CA 19-9 Tumor Marker: Is It Reliable? A Case Report in a Patient With Pancreatic Cancer*. Clinical Advances in Hematology & Oncology, 2013.
124. Haab, B.B., et al., *Definitive Characterization of CA 19-9 in Resectable Pancreatic Cancer Using a Reference Set of Serum and Plasma Specimens*. PLOS ONE, 2015. **10**(10): p. e0139049.
125. Poruk, K.E., et al., *The Clinical Utility of CA 19-9 in Pancreatic Adenocarcinoma: Diagnostic and Prognostic Updates*. Current molecular medicine, 2013. **13**(3): p. 340-351.
126. Goodson, A., et al., *Migration of bisphenol A from can coatings—effects of damage, storage conditions and heating*. Food Additives & Contaminants, 2004. **21**(10): p. 1015-1026.
127. Rubin, B.S., *Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2011. **127**(1–2): p. 27-34.
128. Geens, T., et al., *A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A*. Food and Chemical Toxicology, 2012. **50**(10): p. 3725-3740.
129. Kimling, J., et al., *Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited*. The Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(32): p. 15700-15707.
130. Yuan, D., et al., *N-Doped carbon nanorods as ultrasensitive electrochemical sensors for the determination of dopamine*. RSC Advances, 2012. **2**(21): p. 8157-8163.

131. Jiang, G., et al., *Preparation of N-doped carbon quantum dots for highly sensitive detection of dopamine by an electrochemical method*. RSC Advances, 2015. **5**(12): p. 9064-9068.
132. Zhu, S., et al., *Simultaneous electrochemical determination of uric acid, dopamine, and ascorbic acid at single-walled carbon nanohorn modified glassy carbon electrode*. Biosensors and Bioelectronics, 2009. **25**(4): p. 940-943.
133. Fabregat, G., E. Armelin, and C. Alemán, *Selective Detection of Dopamine Combining Multilayers of Conducting Polymers with Gold Nanoparticles*. The Journal of Physical Chemistry B, 2014. **118**(17): p. 4669-4682.
134. Zhao, J., et al., *Sensitive and selective dopamine determination in human serum with inkjet printed Nafion/MWCNT chips*. Electrochemistry Communications, 2013. **37**(0): p. 32-35.
135. Chauhan, N., J. Narang, and C.S. Pundir, *Fabrication of multiwalled carbon nanotubes/polyaniline modified Au electrode for ascorbic acid determination*. Analyst, 2011. **136**(9): p. 1938-1945.