



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

VITÓRIA SOARES DIBO

**MONOCAMADA DE 1,4-BENZENODITIOL SOBRE OURO CONTENDO
NANOPARTÍCULAS DE OURO FUNCIONALIZADAS COM UM DERIVADO DE
MANOSE: UMA PROPOSTA PARA DETECÇÃO DE *Escherichia coli***

FORTALEZA

2022

VITÓRIA SOARES DIBO

MONOCAMADA DE 1,4-BENZENODITIOL SOBRE OURO CONTENDO
NANOPARTÍCULAS DE OURO FUNCIONALIZADAS COM UM DERIVADO DE
MANOSE: UMA PROPOSTA PARA DETECÇÃO DE *Escherichia coli*

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Físico-Química.

Orientadora: Prof^a Dr^a Izaura Cirino Nogueira Diógenes

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D539m Dibo, Vitória Soares.

Monocamada de 1,4-benzenoditiol sobre ouro contendo nanopartículas de ouro funcionalizadas com um derivado de manose: uma proposta para detecção de *Escherichia coli* / Vitória Soares Dibo. – 2022.
73 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Izaura Cirino Nogueira Diógenes.

1. Monocamada automontada. 2. Benzenoditiol. 3. Nanopartículas de ouro. 4. Detecção de *E. coli*. I. Título.

CDD 540

VITÓRIA SOARES DIBO

MONOCAMADA DE 1,4-BENZENODITIOL SOBRE OURO CONTENDO
NANOPARTÍCULAS DE OURO FUNCIONALIZADAS COM UM DERIVADO DE
MANOSE: UMA PROPOSTA PARA DETECÇÃO DE *Escherichia coli*

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Físico-Química.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Izaura Cirino Nogueira Diógenes

Aprovada em: 10/03/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Izaura Cirino Nogueira Diogenes (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Norberto De Kassio Vieira Monteiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Dieric Dos Santos De Abreu
Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dr. Luiz Henrique Dall'antonia
Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Aos meus pais, Paulo e Renata.

À minha companheira, Luiza.

AGRADECIMENTOS

Aos órgãos de fomento (CNPq, CAPES e Funcap) pelo auxílio financeiro no desenvolvimento desse projeto.

Ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará e a todos que trabalham em sua administração pela disponibilidade e apoio institucional prestado.

À Prof^a Izaura Diógenes, pelo apoio e orientação durante os sete anos em que estive na pesquisa (Iniciação Científica e Mestrado). Através de seus ensinamentos pude me tornar uma profissional melhor, além de ter crescido muito como pessoa. Agradeço-a também pela oportunidade de ter trabalhado no Laboratório de Bioinorgânica, em que pude desenvolver trabalhos enriquecedores para a minha formação.

Ao Dr. Dieric Abreu, que esteve em contato direto comigo durante todos esses anos que estive no Laboratório de Bioinorgânica, sendo crucial para o meu desenvolvimento profissional e pessoal. Agradeço-o pelos ensinamentos que tive tanto dentro como fora do ambiente profissional.

Ao Dr. Adolfo Romo, que também esteve comigo durante a minha caminhada profissional, em que pudemos trabalhar em conjunto em alguns projetos, além de ter aprendido bastante tanto dentro como fora do laboratório.

Aos membros da banca avaliadora, Prof. Dr. Luiz Henrique, Dr. Dieric Abreu, Prof. Dr. Norberto Monteiro e Prof^a Dr^a Izaura Diógenes pela disposição em participar da avaliação deste trabalho e pelas valiosas sugestões que serão apresentadas para torná-lo mais concreto.

Ao Laboratório de Bioinorgânica e a todos os alunos e professores que fazem parte desse grande grupo, que de forma direta ou indireta contribuíram tanto o desenvolvimento desse projeto como também para a minha formação profissional e pessoal. Em especial, gostaria de agradecer ao Wellinson, Dr. Dieric Abreu e ao Dr. Adolfo Romo que se disponibilizaram em me auxiliar nesse projeto.

Aos meus pais, Paulo e Renata, pelo imenso suporte que deram a mim durante toda a minha vida, me incentivando a estudar e ser uma pessoa cada vez melhor.

À Luiza, que esteve ao meu lado a todo momento, me incentivando a pensar grande e nunca desistir, sendo fundamental para o meu desenvolvimento.

RESUMO

Este trabalho apresenta os resultados sobre a formação de uma plataforma constituída de uma monocamada automontada (SAMs, *Self-Assembled Monolayers*) de moléculas de 1,4-benzenoditiol (BDT) em ouro (Au/BDT) sobre a qual foi incorporada nanopartículas de ouro (AuNPs) funcionalizadas com 4-tiolbenzeno aminomanose (PTAM), resultando no eletrodo Au/BDT/AuNPs/PTAM. O processo de modificação da superfície de ouro foi realizado em etapas sequenciais, todas de forma espontânea, sendo os eletrodos produzidos caracterizados por voltametria cíclica, espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e espectroscopia vibracional Raman intensificada por superfície (SERS). Na primeira etapa (Au/BDT), o eletrodo de ouro foi imerso em solução de dimetilformamida contendo BDT por diferentes tempos de imersão chegando-se a um tempo otimizado de 2h, conforme dados de recobrimento superficial ($\theta \cong 0,95$ para tempos igual ou superior a 2h) determinados por EIE. Os espectros SERS do eletrodo Au/BDT indicaram que as moléculas de BDT experimentam adsorção sobre ouro através de um dos átomos de enxofre assumindo uma configuração próxima à perpendicular em relação à superfície. O espectro SERS do eletrodo Au/BDT/AuNPs apresentou sinal de espalhamento Raman intenso devido à alta concentração de campo elétrico formado entre nanopartículas (*hot spots*) sendo um indicativo da incorporação das AuNPs por meio da ligação dos fragmentos tióis, como ponte, aos substratos. Após funcionalização com moléculas de PTAM, o espectro SERS indicou a presença do açúcar, uma vez que o perfil espectral observado foi similar àquele obtido para o composto no estado sólido. Os diagramas de *Nyquist* do eletrodo Au/BDT/AuNPs/PTAM apresentaram um aumento substancial de resistência de transferência de carga ($R_{CT} = 99,80 \Omega \text{ cm}^2$) em relação aos eletrodos Au/BDT/AuNPs ($R_{CT} = 63,50 \Omega \text{ cm}^2$) e Au/BDT ($R_{CT} = 50,00 \Omega \text{ cm}^2$). A variação de R_{CT} (ΔR_{CT}) do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ foi utilizada como parâmetro para determinar, quantitativamente, as bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) pelo eletrodo Au/BDT/AuNPs/PTAM. Os diagramas de *Nyquist* obtidos após imersão em soluções de diferentes concentrações de *E. coli* (*[E. coli]*), permitiram a construção do gráfico de ΔR_{CT} vs $\log[\text{E. coli}]$ a partir do qual se determinou o limite de detecção (LOD) em $8,0 \times 10^5$ UFC/mL para essa plataforma sensora, sendo 11 vezes menor do que o LOD do eletrodo Au/PTAM ($8,8 \times 10^6$ UFC/mL).

Palavras-chave: monocamada automontada; benzenoditiol; nanopartículas de ouro; detecção de *E. coli*.

ABSTRACT

This work deals with the results on the formation of a platform composed of a self-assembled monolayer (SAM) of 1,4-benzenedithiol (BDT) molecules on gold (Au/BDT) on which it was immobilized gold nanoparticles (AuNPs) functionalized with 4-thiobenzene aminomanose (PTAM) producing the electrode Au/BDT/AuNPs/PTAM. The modification process of the gold surface was performed in subsequent steps, all of them spontaneous, with the produced electrodes being characterized by cyclic voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and surface-enhanced Raman scattering (SERS). At the first step (Au/BDT), a gold electrode was immersed in a dimethyl formamide solution containing BDT for different times reaching an optimum time of 2h according to the surface coverage data ($\theta \cong 0.95$ for immersion times of 2h or higher) determined by EIS. The SERS spectra of Au/BDT indicated the BDT molecules undergo adsorption on gold through one of the sulfur atoms assuming a configuration close to perpendicular in respect to the surface. For the Au/BDT/AuNPs electrode, the SERS spectra showed an intense Raman scattering signal due to the high concentration of electric field formed by the hot spots, indicating the incorporation of AuNPs through the binding of thiol fragments to substrates. After the functionalization with PTAM, the SERS spectrum of Au/BDT/AuNPs/PTAM indicated the presence of the sugar based on the similarity with the spectrum of the molecule in the solid state. The Nyquist diagram of Au/BDT/AuNPs/PTAM showed a meaningful increase of the charge transfer resistance ($R_{CT} = 99.80 \Omega \text{ cm}^2$) in respect to the electrodes Au/BDT/AuNPs ($R_{CT} = 63.50 \Omega \text{ cm}^2$) and Au/BDT ($R_{CT} = 50.00 \Omega \text{ cm}^2$). The variation of R_{CT} (ΔR_{CT}) of the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ redox pair was used as parameter to determine the ability of Au/BDT/AuNPs/PTAM to quantitatively detect the *Escherichia coli* (*E. coli*) bacterium. The Nyquist diagrams obtained after immersion of Au/BDT/AuNPs/PTAM in solutions of different concentrations of *E. coli* (*[E. coli]*), allowed the construction of the ΔR_{CT} vs $\log[\textit{E. coli}]$ plot from which the limit of detection (LOD) was determined as 8.0×10^5 UFC/mL, which is 11 times lower than the Au/PTAM biosensor ($8,8 \times 10^6$ CFU/mL).

Keywords: self-assembled monolayers; benzenedithiol; gold nanoparticles; detection of *E. coli*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Representação genérica de um biossensor.	14
Figura 2	– Ilustração de analitos, biorreceptores, transdutores e sinais analíticos associados a biossensores genéricos.....	15
Figura 3	– (A) Representação geral das regiões constituintes das SAMs; (B) SAM da molécula de 1,4-benzenoditiol (BDT) sobre ouro.	18
Figura 4	– Estrutura da molécula 4-tiolbenzeno aminomanose (PTAM).	22
Figura 5	– Esquema da plataforma de detecção proposta nesse trabalho.	23
Figura 6	– Esquema genérico de redução e formação das nanopartículas de ouro (AuNPs).	25
Figura 7	– Ilustração de uma célula eletroquímica contendo: (1) eletrodo de referência; (2) eletrodo de trabalho; (3) tubo para gás inerte e (4) eletrodo auxiliar.	26
Figura 8	– Voltamograma cíclico a $0,1 \text{ V s}^{-1}$ do eletrodo de ouro policristalino (área geométrica = $0,07 \text{ cm}^2$) em solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ à $T= 25 \text{ }^\circ\text{C}$	27
Figura 9	– Esquema de modificação do substrato de ouro.	29
Figura 10	– Esquema ilustrativo das etapas (1-4) de formação da plataforma sensora para detecção de bactérias <i>E. coli</i> baseado no filme molecular de PTAM em AuNP ancorado na SAM de BDT sobre substrato macroscópico de ouro.	30
Figura 11	– Voltamograma cíclico do eletrodo de ouro a $0,1 \text{ V s}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	31
Figura 12	– Esquema simplificado de síntese da molécula 4-tiolbenzeno aminomanose (PTAM).	32
Figura 13	– Esquema do procedimento de cultivo da bactéria <i>Escherichia coli</i>	35
Figura 14	– Esquema de imobilização da bactéria <i>E. coli</i> sobre o eletrodo Au/BDT/AuNPs/PTAM.	36
Figura 15	– Espectros de espalhamento Raman: (A) BDT e (C) PTAM; e Raman intensificado por superfície: (B) Au/BDT, (C) Au/BDT/AuNPs, (D) PTAM em AuNP e (E) Au/BDT/AuNPs/PTAM. $\lambda_0= 632,8 \text{ nm}$	37
Figura 16	– Representação ilustrativa da região hot spot.	38
Figura 17	– Voltamograma linear a 50 mVs^{-1} do eletrodo de ouro após 4h de imersão solução $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de BDT. Solução eletrolítica: KOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$	40

Figura 18	– Esquema da interação de uma SAM genérica com moléculas de prova aniônicas ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) em soluções de diferentes valores de pH (R refere-se a uma cadeia carbônica genérica).	42
Figura 19	– Curva ilustrativa i vs pH.	43
Figura 20	– (A) Voltamogramas cíclicos do eletrodo Au/BDT a 15 mVs^{-1} em solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KF de diferentes valores de pH contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ à $25 \text{ }^\circ\text{C}$, (B) curva de pKa experimental (\bullet) e simulada (—).	43
Figura 21	– (A) Voltamogramas cíclicos a 100 mV s^{-1} e (B) diagramas de <i>Nyquist</i> do eletrodo modificado (Au/BDT) em diferentes tempos de imersão (0 até 4h). Medidas realizadas em solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KF contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ à $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} \approx 6$	45
Figura 22	– Espectros de absorção eletrônica nas regiões do UV-Vis de uma solução $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de HAuCl_4 (a) e coloidal de AuNPs (b).	47
Figura 23	– (A) Diagramas de <i>Nyquist</i> e (B) Voltamogramas cíclicos a 100 mVs^{-1} do eletrodo de ouro (—) e dos eletrodos Au/BDT (—) e Au/BDT/AuNPs (—). Medidas realizadas em solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KF contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ à $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} \approx 6$	48
Figura 24	– (A) Diagramas de <i>Nyquist</i> e (B) Voltamogramas cíclicos a 100 mVs^{-1} do eletrodo de ouro (—) e dos eletrodos Au/BDT (—) e Au/BDT/AuNPs (—). Medidas realizadas em solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KF contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ à $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} \approx 6$	50
Figura 25	– Ilustração genérica das hipóteses 1 e 2.	52
Figura 26	– Espectro de massa da molécula PTAM ionizada ($\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{NO}_5\text{S}^+$).	53
Figura 27	– Espectro de RMN H^1 a 500 MHz em $1:1 \text{ D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{COOD}$ para o composto 4-tiolbenzeno aminomanose.	53
Figura 28	– (A) Diagramas de <i>Nyquist</i> do eletrodo de ouro, Au/BDT, Au/BDT/AuNPs, Au/BDT/AuNPs/PTAM e Au/BDT/AuNPs/PTAM/E.coli. (B) Circuito equivalente para ajuste das curvas impedimétricas. Medidas realizadas em solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KF contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ à $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} \approx 6$. Os símbolos correspondem aos resultados experimentais e as curvas sólidas aos resultados de ajuste teórico com o circuito equivalente.	55

- Figura 29 – Diagramas de *Nyquist* do eletrodo Au/BDT/AuNPs/PTAM/*E.coli* em diferentes concentrações de *E. coli* em solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ e NaCl 1 g L⁻¹. Medidas impedimétricas realizadas em solução 0,5 mol L⁻¹ de KF contendo [Fe(CN)₆]^{4-/3-} 2,5 mmol L⁻¹ à 25 °C, pH ≈ 6. 57
- Figura 30 – Curva de calibração do eletrodo Au/BDT/AuNPs/PTAM em resposta à variação de concentração da *E. coli* no meio. Gráfico de Δ_{RCT} vs log[*E. coli*] (n = 3). O símbolo (●) corresponde ao resultado experimental e a linha sólida (—) ao ajuste linear dos pontos. 58
- Figura 31 – Proposta de configuração do eletrodo Au/BDT/AuNPs/PTAM ressaltando as ligações de hidrogênio entre as espécies PTAM imobilizadas sobre as nanopartículas de ouro. 59
- Figura 32 – Comparação das curvas de calibração dos eletrodos (a) Au/BDT/AuNPs/PTAM e (b) Au/PTAM em resposta à variação de concentração da *E. coli* no meio. Gráfico de Δ_{RCT} vs log[*E. coli*] (n = 3). Os símbolos (●) e (●) correspondem aos resultados experimentais e as linhas sólidas (—) e (—) ao ajuste linear dos pontos. 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Listagem de alguns biossensores eletroquímicos utilizados para a detecção de <i>E. coli</i>	21
Tabela 2	– Parâmetros eletroquímicos e impedimétricos do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ em função do tempo de imersão do eletrodo de ouro em uma solução 1,0 mmol L ⁻¹ BDT. Dados obtidos a partir dos resultados apresentados na Figura 21.	46
Tabela 3	– Parâmetros eletroquímicos e impedimétricos do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ em função da modificação do eletrodo de ouro. Condição 1 - dados obtidos a partir dos resultados apresentados na Figura 23; Condição 2 – dados obtidos a partir dos resultados apresentados na Figura 24.	49
Tabela 4	– Elementos de circuito ajustados às respostas impedimétricas da Figura 28 (A).	56
Tabela 5	– Parâmetros impedimétricos do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ em função da modificação do eletrodo Au/BDT/AuNPs/PTAM em diferentes concentrações de <i>E. coli</i> . Dados obtidos a partir dos resultados apresentados na Figura 29.	57
Tabela 6	– Valores de deslocamentos Raman (cm ⁻¹) dos compostos BDT e PTAM no estado sólido, dos eletrodos Au/BDT, Au/BDT/AuNPs e Au/BDT/AuNPs/PTAM e da suspensão coloidal funcionalizada com a molécula PTAM (AuNPs/PTAM). $\lambda_0 = 632,8$ nm.	72
Tabela 7	– Preço dos principais reagentes utilizados nesse projeto.	73

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Detecção de bactérias	13
1.2	Biossensores eletroquímicos	14
1.3	Monocamada Automontada	17
1.4	Nanopartículas de ouro	19
1.5	Detecção da bactéria <i>Escherichia coli</i>	20
2	OBJETIVOS	24
3	METODOLOGIA	25
3.1	Reagentes	25
3.2	Síntese das nanopartículas de ouro	25
3.3	Materiais e acessórios eletroquímicos	26
3.4	Limpeza do eletrodo de ouro policristalino	27
3.5	Determinação da área eletroativa do eletrodo de ouro	27
3.6	Modificação do eletrodo de ouro	28
3.7	Caracterização da SAM de 1,4-benzenoditiol (BDT)	29
3.7.1	<i>Determinação do valor de pKa da molécula BDT em superfície</i>	29
3.7.2	<i>Espectroscopia vibracional Raman e SERS</i>	29
3.7.3	<i>Ativação do substrato SERS</i>	31
3.8	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)	31
3.9	Síntese da molécula 4-tiolbenzeno aminomanose – PTAM	32
3.10	Cultivo da bactéria <i>Escherichia coli</i>	33
3.11	Imobilização da bactéria <i>E. coli</i> sobre a superfície da plataforma sensora	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1	Espectroscopia Raman e SERS	36
4.2	Dessorção redutiva em meio alcalino	40
4.3	pKa da monocamada automontada	41

4.4	Cinética de adsorção das moléculas de BDT sobre ouro.....	44
4.5	Caracterização das AuNPs.....	47
4.6	Incorporação das AuNPs sobre a SAM de 1,4-benzenoditiol	48
4.7	Caracterização 4-tiolbenzeno aminomanose – PTAM	52
4.8	Funcionalização do eletrodo Au/BDT/AuNPs com a molécula PTAM e detecção da <i>Escherichia coli</i>	54
4.9	Sensibilidade analítica	60
5	CONCLUSÕES.....	62
	REFERÊNCIAS.....	64
	ANEXO A – TABELA DE ATRIBUIÇÕES.....	72
	ANEXO B – PREÇO DOS PRINCIPAIS REAGENTES	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 Detecção de bactérias

As bactérias são seres microscópicos essenciais para o meio ambiente e para a vida humana. Milhares desses microrganismos estão presentes no corpo humano, sendo importantes para manter o bom funcionamento e o equilíbrio do organismo hospedeiro. Apesar da grande relevância para os humanos, as infecções bacterianas são as principais causas de mortalidade no mundo [1, 2]. Estima-se que em 2050 haverá mais de 10 milhões de mortes causadas pela resistência a antibióticos [1]. Dentre as milhares de bactérias conhecidas, contudo, apenas aproximadamente 20 causam infecções graves aos humanos [2].

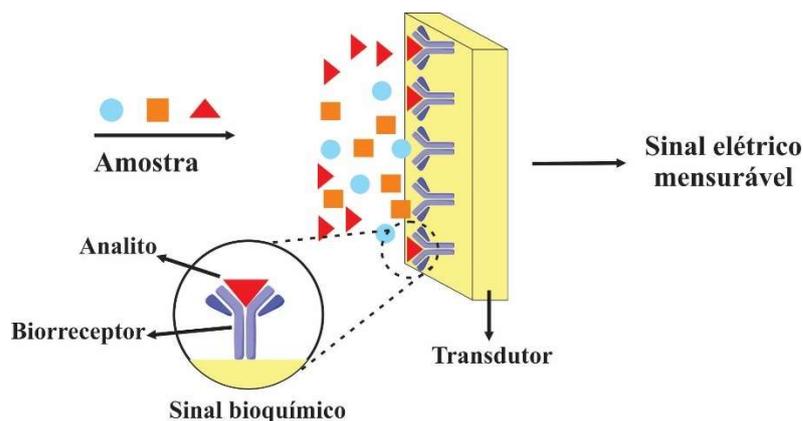
Para combater as bactérias patogênicas, os desafios científicos vão desde a criação de novas vacinas e antibióticos – sendo essa uma área de grande engajamento científico e financeiro – à detecção precoce nos alimentos, na água de consumo e nos pontos de atendimento de saúde básica [2–9]. A identificação precoce desses microrganismos pode evitar o contágio entre as pessoas e, conseqüentemente, diminuir o número de infecções graves. Mesmo relevante, a detecção de patógenos é um campo que apresenta algumas dificuldades práticas e científicas. Apesar disso, o desenvolvimento de métodos eficazes e baratos vem sendo aprimorado ao longo dos anos [2, 4, 8].

Vários métodos de detecção analítica são usados para identificar e quantificar bactérias patogênicas, como o método padrão de cultura em placa, as técnicas moleculares (análise de material genético baseado em substâncias fluorescentes e na reação de cadeia de polimerase) e os ensaios enzimológicos, com o uso do método ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays*) [2, 10]. Apesar de sensíveis e confiáveis, esses métodos apresentam algumas desvantagens, tais como o alto custo, elevados tempos de análise e exigência de pessoas qualificadas para os procedimentos laboratoriais [2]. Assim, um grande desafio enfrentado por cientistas é o desenvolvimento de um método analítico de baixo custo, rápido, sensível, específico, reutilizável e miniaturizado [2, 9]. Nesse intuito, vários trabalhos na literatura apontam para o uso de biossensores que são artefatos que satisfazem os requisitos citados acima para a detecção de bactérias ou de biomoléculas de modo a otimizar o processo [2–9].

1.2 Biossensores eletroquímicos

Os biossensores são dispositivos de detecção biológica que utilizam o mesmo princípio de funcionamento dos sensores químicos, ou seja, em que o sinal de uma reação química é convertido em um sinal elétrico mensurável [11,12]. Nesses artefatos, duas componentes importantes estão presentes: (i) o sistema de reconhecimento (receptor) que irá identificar e/ou capturar o analito e (ii) o transdutor, material responsável por converter o sinal da reação química em um sinal elétrico mensurável e proporcional à concentração do analito a ser detectado [11]. No caso dos biossensores, como o propósito é a detecção de uma espécie biológica, a reação que ocorre é bioquímica e, portanto, o sistema de reconhecimento é denominado receptor biológico (biorreceptor) [11,12]. A Figura 1 mostra uma representação das componentes de um biossensor.

Figura 1 – Representação genérica de um biossensor.

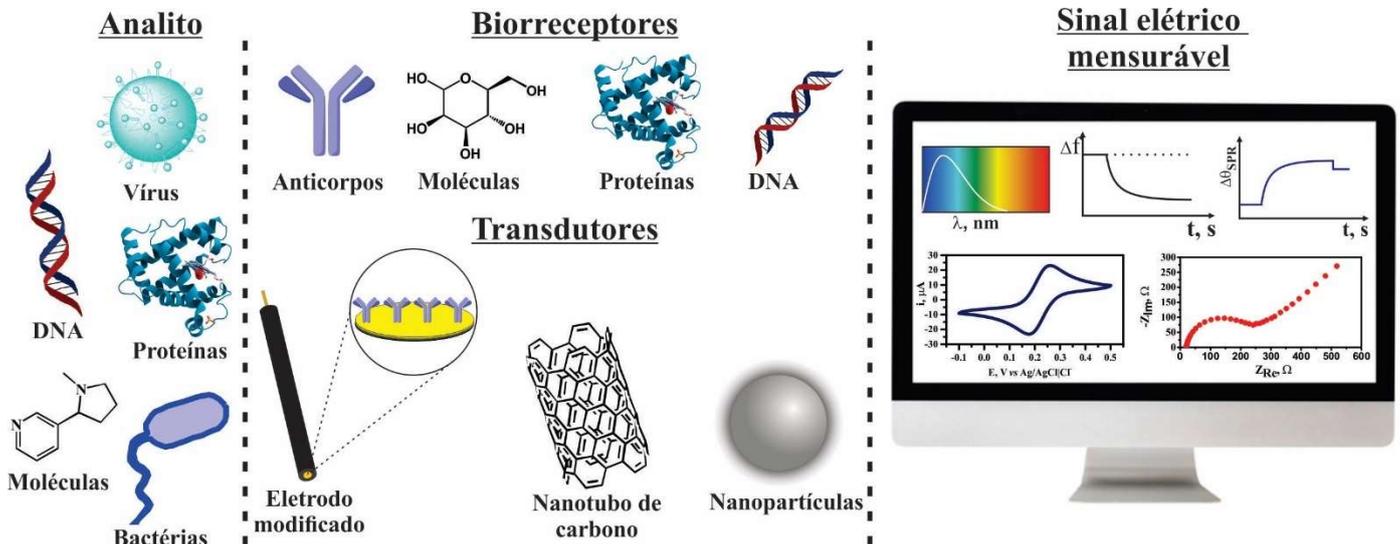


Fonte: Elaborado pelo autor.

Os biorreceptores são biomoléculas (proteínas, enzimas, anticorpos, material genético e carboidratos), ilustrados na Figura 2, capazes, idealmente, de detectar e/ou capturar a espécie de interesse, apresentando alta sensibilidade e especificidade devido a uma interação específica biorreceptor-analito [2,11–13]. Dessa forma, os biossensores podem ser classificados quanto ao mecanismo de interação entre o biorreceptor e o analito e a resposta bioquímica, sendo nomeados de biocatalítico ou de bioafinidade. Nos biossensores biocatalíticos, utiliza-se um biorreceptor capaz de catalisar uma reação química, sendo definida pelo consumo e pela transformação da espécie de interesse em subprodutos. Já os biossensores de bioafinidade, utilizam um outro mecanismo de ação, em que é formado um complexo estável (biorreceptor-analito) sobre o transdutor, sem que haja o consumo de analito, sendo gerado um sinal de

transdução. Alguns exemplos de sistemas que utilizam o funcionamento da bioafinidade são: antígeno-anticorpo e lectina-carboidrato [11].

Figura 2 – Ilustração de analitos, biorreceptores, transdutores e sinais analíticos associados a biossensores genéricos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Diversos trabalhos na literatura classificam os biossensores em relação a natureza do biorreceptor em: (i) enzimáticos – utilizam enzimas como sistema de reconhecimento biológico e atuam na catálise de uma reação bioquímica específica [14]; (ii) imunossensores – baseiam-se na reação imunológica resultante da interação específica anticorpo-antígeno, podendo ser imobilizado tanto o antígeno ou o anticorpo sobre a superfície do transdutor [15]; (iii) genossensores – utilizam, como biorreceptor, sequências de oligonucleotídeos oriundos de material genético (DNA ou RNA) capazes de desempenhar uma interação específica de hibridação genética [16,17]; e (iv) carboidrato-proteína – formados pela imobilização de mono/oligossacarídeos ou proteínas sobre a superfície do transdutor, ocorrendo o reconhecimento específico entre essas duas espécies [18–22].

Em relação aos transdutores (também chamados de detectores ou eletrodos), eles podem ser de diversos materiais, podendo-se citar: eletrodos de metais nobres (ouro, platina, prata), de carbono (carbono vítreo, grafeno), semicondutores, fotodetectores e cristais piezoelétricos, dentre outros [2,11–13]. Os transdutores são escolhidos de acordo com a técnica de detecção analítica, a seletividade e a sensibilidade. A Figura 2 ilustra alguns transdutores e sinais analíticos (sinais elétricos mensuráveis) associados ao uso de biossensores. Os

biossensores também podem ser classificados conforme o sistema de transdução de sinal e a técnica analítica, sendo categorizados em biossensores:

- (i) Ópticos: que se fundamentam nas mudanças das propriedades ópticas (absorbância, índice de refração, fluorescência, refletividade) com o intuito de acompanhar o processo de construção do biossensor e monitorar a concentração do analito. Um exemplo de técnica que está ganhando bastante relevância é a ressonância de plásmon de superfície (SPR, do inglês, *Surface Plasmon Resonance*) que analisa a interação biorreceptor-analito baseado na mudança do índice de refração da luz incidida no sistema [23,24];
- (ii) Piezoelétricos: que se fundamentam no princípio da piezoelectricidade, em que são utilizados cristais anisotrópicos (exemplo, cristal de quartzo) como transdutor. Ao utilizar esse sistema, no início, é aplicada uma tensão alternada sobre o cristal de modo a induzir oscilações em frequências associadas às características mecânicas do cristal e à massa que o compõe [25]. Assim, ao ocorrer a imobilização do biorreceptor sobre o transdutor e, posteriormente, a interação biorreceptor-analito, que resulta na variação de massa sobre o transdutor, tem-se alterações de frequência em decorrência do mecanismo de oscilação do transdutor. Essa variação de frequência é que torna possível acompanhar o processo de construção do biossensor e a sua aplicação. Um exemplo de técnica é a microbalança de cristal de quartzo (QCM, do inglês, *Quartz Crystal Microbalance*) [26,27];
- (iii) Eletroquímicos: são capazes de fornecer informações sobre corrente, potencial, carga e resistência de transferência de carga sobre a construção do biossensor e a interação biorreceptor-analito. De acordo com a propriedade avaliada durante o processo, o biossensor eletroquímico pode ser subclassificado em: amperométrico, potenciométrico, condutimétrico e impedimétrico [2–9,12]. Em relação a esse último, utiliza-se a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) que fornece informações a respeito da resistência de transferência carga (R_{CT}) entre o transdutor e um composto redox ativo (ex.: $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$) presente na fase em contato [28–30]. Assim, quando o transdutor é modificado com um biorreceptor, esta espécie, em geral, dificulta a transferência de carga entre o eletrodo e as espécies redox em solução resultando em aumento do valor de R_{CT} [28]. O mesmo efeito ocorre quando é formado o complexo biorreceptor/analito sobre a

superfície do eletrodo. Os diferentes valores de resistência de transferência de carga permitem, portanto, avaliar a construção e aplicação de um biossensor impedimétrico [21,22,28,29].

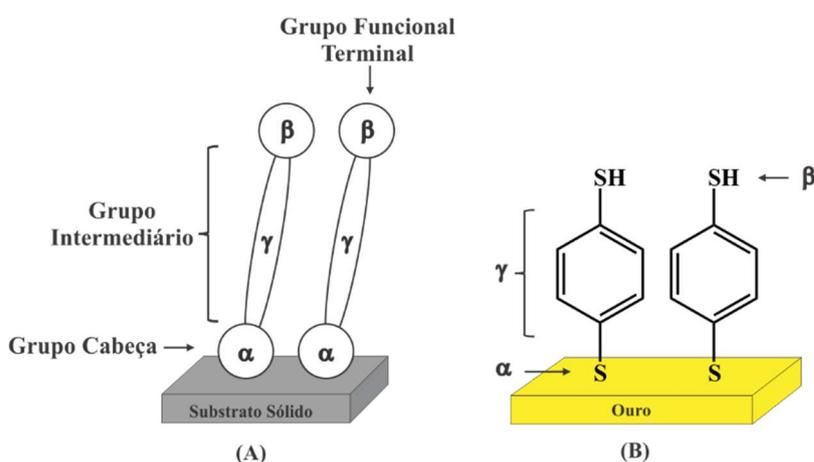
É importante ressaltar que entre as diversas técnicas analíticas utilizadas para caracterizar a construção dos biossensores e, também, a sua aplicação, aquelas que utilizam a transdução eletroquímica de sinal vêm se destacando pois podem ser portáteis, robustos, de baixo custo e permitir análises rápidas, além de apresentar boa eficácia de detecção e de monitoramento dos parâmetros elétricos em função da concentração do analito [12]. Mesmo apresentando características promissoras, os biossensores eletroquímicos, para serem eficientes, exigem o controle de dois fatores determinantes: a amostra que contém o analito e o tipo de transdutor. Esse último, além de apresentar as características citadas, deve permitir a imobilização do biorreceptor sobre sua superfície para um melhor desempenho do artefato [12], ou seja, aumento de sensibilidade e especificidade com diminuição concomitante de possíveis interações não específicas do analito e/ou de espécies interferentes [2,13]. Assim, vários métodos de modificação de substratos (transdutores) são abordados na literatura, como eletrodeposição de polímeros, nanomateriais, monocamadas automontadas (SAMs, do inglês Self-Assembled Monolayers), dentre outras [2,11,13].

1.3 Monocamada Automontada

Dentre os métodos de modificação de superfície citados anteriormente, as SAMs são as que mais se destacam devido a sua estrutura bem ordenada e empacotada, além do processo simples de formação. As monocamadas automontadas são aglomerados moleculares nanoestruturados resultantes de processos espontâneos de adsorção de moléculas orgânicas ou inorgânicas sobre superfícies, geralmente, sólidas [31–33]. As SAMs são formadas pela imersão do substrato sólido (adsorvente) em uma solução líquida ou gasosa contendo as moléculas do adsorbato que apresentam grupos funcionais com forte afinidade pelo substrato [31–33]. A estabilidade química e a estrutura ordenada das SAMs dependem do tipo de interação que ocorre entre substrato-adsorbato, podendo ser fisissorção ou quimissorção. A fisissorção (adsorção física) apresenta entalpia de adsorção baixa ($\Delta H_{\text{ads}} < 10 \text{ kcal mol}^{-1}$) ocorrendo, principalmente, pela interação intermolecular de van der Waals. A quimissorção (adsorção química), por outro lado, apresenta valores mais elevados de entalpia de adsorção ($\Delta H_{\text{ads}} > 10 \text{ kcal mol}^{-1}$) em decorrência de interações químicas (covalentes ou iônicas) entre o substrato e o adsorbato [33].

A estrutura das SAMs pode ser dividida, genericamente, em três regiões principais, como descrito na Figura 3 (A) [13,31,32]. A primeira região, denominado grupo cabeça (α), tem grande afinidade pelo substrato, local onde ocorre a adsorção. A segunda região, formada por grupos intermediários (γ), permite interações intermoleculares laterais entre as moléculas adsorvidas vizinhas, contribuindo para a formação de uma estrutura organizada e empacotada. A terceira região, a mais externa, é constituída por grupos terminais (β) que proporciona novas propriedades físicas e químicas à superfície [31,32], tais como a hidrofilicidade/hidrofobicidade, a reatividade, sendo suscetível a realização de reações químicas, como a imobilização de outras espécies químicas.

Figura 3 – (A) Representação geral das regiões constituintes das SAMs; (B) SAM da molécula de 1,4-benzenoditiol (BDT) sobre ouro.



Fonte: Adaptada da referência [32]. (Fora de escala).

As SAMs podem ser formadas por diferentes substratos e adsorbatos de acordo com o objetivo e a aplicação da superfície modificada. Os substratos podem ser metálicos (Au, Pt, Pd, Ag), semicondutores (ZnSe, InP, GaAs) e óxidos (Al_2O_3 , ITO, TiO_2 , SiO_2). Já os adsorbatos podem apresentar diferentes grupos funcionais na região α , como R-SH, R-COOH, R-OH, R-NH₂, R-CN dentre outros [31,33]. Vários trabalhos na literatura abrangem a formação das SAMs através da adsorção de moléculas organossulfuradas (R-SH) sobre a superfície de metais nobres [13,28,32,34–36]. Entre eles, destaca-se o ouro, visto que é um metal relativamente inerte (não reage com O_2 e nem oxida em temperaturas abaixo do seu ponto de ebulição), de fácil obtenção e comumente utilizado como substrato em várias técnicas analíticas e espectroscópicas — SPR, QCM, SERS (do inglês, *Surface-Enhanced Raman Scattering*) — [13,32]. Adicionalmente, os átomos de ouro da superfície formam ligações covalentes

(quimissorção, $\Delta H_{\text{ads}} \approx 40 \text{ kcal mol}^{-1}$ [31,33]) com compostos que contêm átomos de enxofre (grupo cabeça) para formar a ligação Au–S resultando em SAMs estáveis e reprodutíveis [13,31,32].

O grupo funcional terminal da SAM confere novas propriedades à interface eletrodo/solução. Dependendo do grupo terminal (por exemplo, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$), o substrato funcionalizado pode ser utilizado em diversas áreas da química, tais como catálise, corrosão, reação de transferência de elétrons e no desenvolvimento de sensores químicos e bioquímicos [28,34,37–39]. Dando enfoque a esse último campo científico, o tipo do grupo terminal é de extrema importância para a imobilização de espécies químicas (biomoléculas, nanopartículas, dentre outras) que constituirão a interface de reconhecimento do biossensor com o analito [13,32].

A molécula 1,4-benzenoditiol (BDT), utilizada neste trabalho (Figura 3 (B)), apresenta dois grupos tióis nas extremidades. Devido às razões citadas anteriormente, essa espécie é utilizada para a formação da SAM sobre ouro, sendo esperado que ocorra a formação de uma ligação covalente (Au–S) entre um dos átomos de enxofre da molécula BDT e átomos de ouro da superfície [32,40]. Além disso, o átomo de enxofre da porção terminal da molécula proporciona características funcionais diferentes à superfície permitindo, por exemplo, interações com nanopartículas de ouro.

1.4 Nanopartículas de ouro

As nanopartículas (NPs) de metais nobres são materiais que apresentam tamanho entre 1–100 nm e vêm ganhando destaque em diferentes áreas (medicina, química, física) devido às suas propriedades ópticas, magnéticas, eletrônicas e superficiais [41,42]. As nanopartículas de ouro (AuNPs), em particular, têm sido empregadas em várias pesquisas, notadamente no tratamento de câncer, como *drug delivery*, e no desenvolvimento de sensores químicos e bioquímicos [43–46]. Algumas das características mais marcantes das AuNPs são: baixa toxicidade, fácil preparação da solução coloidal, boa biocompatibilidade (quando modificada apropriadamente) e elevada razão superfície/volume [13,43,46,47]. A motivação para incluir AuNPs sobre SAMs utilizadas em sensores eletroquímicos tem origem na sua área superficial, pois permite a imobilização de um maior número de espécies químicas sobre a sua superfície, ou seja, pode melhorar a sensibilidade analítica [13].

A fim de atuarem na construção de um biossensor, as AuNPs devem ser funcionalizadas com biorreceptores apropriados para a detecção de espécies biológicas, como bactérias. Lin e colaboradores [29] utilizaram AuNPs com o intuito de aumentar a sensibilidade do biossensor produzido, fornecendo um menor valor de limite de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*) da bactéria *Escherichia coli*. Os autores desenvolveram duas plataformas sensoras utilizando o anticorpo anti-*E.coli* O157 IgG como biorreceptor e eletrodos de ouro como transdutores. Na primeira plataforma sensora, sem AuNPs, o valor de LOD foi determinado em 140 UFC mL⁻¹. Após a imobilização das AuNPs funcionalizadas com moléculas biorreceptores (anti-*E.coli* IgG), o valor de LOD baixou para 48 UFC mL⁻¹ demonstrando o aumento de sensibilidade analítica do sistema.

1.5 Detecção da bactéria *Escherichia coli*

Dentre as poucas bactérias patogênicas aos humanos, podem ser mencionadas a *Salmonella*, *Listeria*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (*E. coli*), entre outras [9]. Dando ênfase à *E. coli*, é importante ressaltar que não são todas as cepas que são prejudiciais à saúde, visto que compõem e são essenciais para o funcionamento do aparelho digestivo de humanos. Algumas cepas, porém, podem causar infecções. A forma de contágio mais comum, nesses casos, ocorre pela ingestão de alimentos e/ou água contaminada. Além disso, a detecção de *E. coli* em alimentos e água, mesmo que de cepas não patógenas, é um indício de contaminação por coliformes termotolerantes, tornando a comida e a bebida impróprias para consumo.

Dessa forma, vários biossensores são desenvolvidos com o intuito de detectar quantitativamente e/ou qualitativamente a presença desse microrganismo. A Tabela 1 mostra alguns trabalhos na literatura de biossensores eletroquímicos construídos para a detecção da *E. coli*, utilizando as técnicas de impedância eletroquímica, voltametria de onda quadrada e de pulso diferencial.

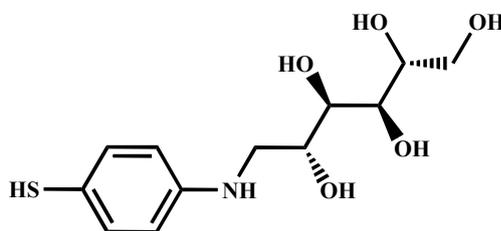
Tabela 1 – Listagem de alguns biossensores eletroquímicos utilizados para a detecção de *E. coli*.

Plataforma Sensora	Biorreceptor	Método eletroquímico e molécula de prova	Limite de detecção (UFC/mL)	Referência
Eletrodo de Au/ α -mannoside_Etilenoglicol-SH	Derivado da D-(+)manose (α -mannoside)	EIE, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$	$2,3 \times 10^2$	48
Eletrodo de Au/SM_TQ	(α -mannoside)	VOQ	$8,0 \times 10^2$	49
Eletrodo de Au/SM_TQ/Concanavalina A	Concanavalina A	VOQ	25	49
Eletrodo de Au/11-MUA_DTT/Concanavalina A	Concanavalina A	EIE, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$	75	21
Eletrodo de Au modificado com a eletrodeposição de óxido de grafeno/polietilamina	Anticorpo (anti-fimbrial <i>E.coli</i>)	VPD, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$	10	50
Eletrodo de Au/1,6-hexanoditiol/AuNPs/Proteína-G-SH/Anti- <i>E.coli</i>	Anticorpo (anti- <i>E.coli</i> O157 IgG)	EIE, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$	48	29
Eletrodo serigrafado de carbono/AuNPs/Anti- <i>E.coli</i>	Anticorpo (anti- <i>E.coli</i> O157 IgG policlonal)	EIE, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$	15	51

VDP: Voltametria de Pulso Diferencial; VOQ: Voltametria de Onda Quadrada; EIE: Espectroscopia de Impedância Eletroquímica; 11-MUA: ácido 11-mercaptopundecanóico; DTT: 1,4-ditiotreitol; SM: α -D-Manopiranosose-2-[2-(2-mercaptoetoxi)etoxi]etil; TQ: 3-((2,5-dimetoxifenil)etil)tiofeno.

Muitos trabalhos na literatura propõem biossensores a base de anticorpos como biorreceptores, visto que essas espécies têm um sistema de reconhecimento específico em relação à bactéria de interesse (complexo anticorpo-antígeno) [29,50,51]. Novas plataformas alternativas, porém, estão sendo desenvolvidas a base de carboidratos [18,48,49,52]. Os trabalhos nessa linha sugerem que carboidratos simples, como D-manose e L-fucose, interagem de forma específica com proteínas presentes na parede celular [18,53]. Para a bactéria *E. coli*, tem sido demonstrado que o açúcar D-(+)manose apresenta afinidade pela lectina presente na superfície da bactéria. A proteína lectina apresenta na sua estrutura um sítio denominado Domínio de Reconhecimento de Carboidrato (DRC) [54] que possibilita uma interação específica com açúcares, como a D-(+)manose. A interação lectina/D-(+)manose ocorre, principalmente, pelas interações intermoleculares, como ligação de hidrogênio e van der Waals [54] entre os aminoácidos e as hidroxilas do açúcar. Além disso, quando adicionado resíduos hidrofóbicos à estrutura do açúcar (ex.: compostos aromáticos), a afinidade lectina-D-manose aumenta devido às interações π - π com os anéis aromáticos de alguns aminoácidos [18,48,54]. A Figura 4 ilustra a estrutura da molécula 4-tiolbenzeno aminomanose (PTAM) que apresenta boa afinidade por lectina [18].

Figura 4 – Estrutura da molécula 4-tiolbenzeno aminomanose (PTAM).

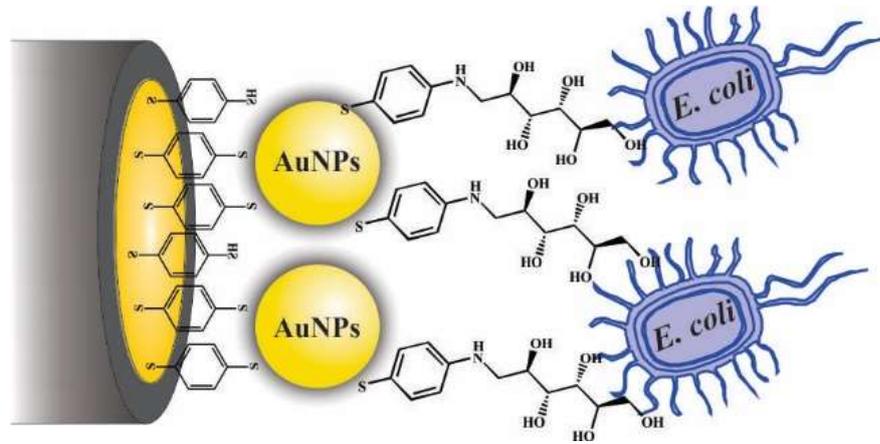


IUPAC: 6-((4-mercaptofenil)amino)hexano-1,2,3,4,5-pentaol
4-tiolbenzeno aminomanose (PTAM)

Fonte: Adaptação da referência [18].

Neste trabalho, é proposto a construção de um biossensor impedimétrico em que o biorreceptor é uma molécula derivada do carboidrato D-(+)manose (4-tiolbenzeno aminomanose – PTAM) imobilizada sobre as nanopartículas de ouro, formando a plataforma representada na Figura 5.

Figura 5 – Esquema da plataforma de detecção proposta nesse trabalho.



Fonte: Elaborado pelo autor. (Fora de escala).

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi a construção de um biossensor eletroquímico para detecção da bactéria *Escherichia coli*. Para tanto, foi proposta a modificação de eletrodos de ouro com moléculas de 1,4-benzenoditiol (BDT) ligadas às nanopartículas de ouro funcionalizadas com a espécie 4-tiolbenzeno aminomanose (PTAM), molécula derivada do carboidrato D-(+)manose. A transdução do sinal relativo à detecção da bactéria foi feita por voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).

Os objetivos específicos encontram-se listados abaixo:

- modificar e caracterizar o eletrodo de ouro com moléculas de BDT (Au/BDT) usando as técnicas de VC, EIE e SERS;
- sintetizar e caracterizar as nanopartículas de ouro (AuNPs) por espectroscopia de absorção eletrônica nas regiões do ultravioleta e visível (UV-Vis);
- sintetizar e caracterizar a espécie 4-tiolbenzeno aminomanose (PTAM) por espectrometrias de massa e ressonância magnética nuclear (RMN);
- modificar o eletrodo Au/BDT com AuNPs e PTAM (Au/BDT/AuNPs/PTAM) e caracterizar usando as técnicas de VC, EIE e SERS;
- detectar a bactéria *E. coli* sobre o eletrodo Au/BDT/AuNPs/PTAM usando as técnicas de VC e EIE;
- determinar a curva de calibração e o limite de detecção do biossensor (Au/BDT/AuNPs/PTAM) eletroquímico frente a *E. coli* utilizando a técnica de EIE;
- determinar a curva de calibração e o limite de detecção do biossensor Au/PTAM frente a *E. coli* utilizando a técnica de EIE;
- comparar as curvas de calibração e os limites de detecção da *E. coli*.

3 METODOLOGIA

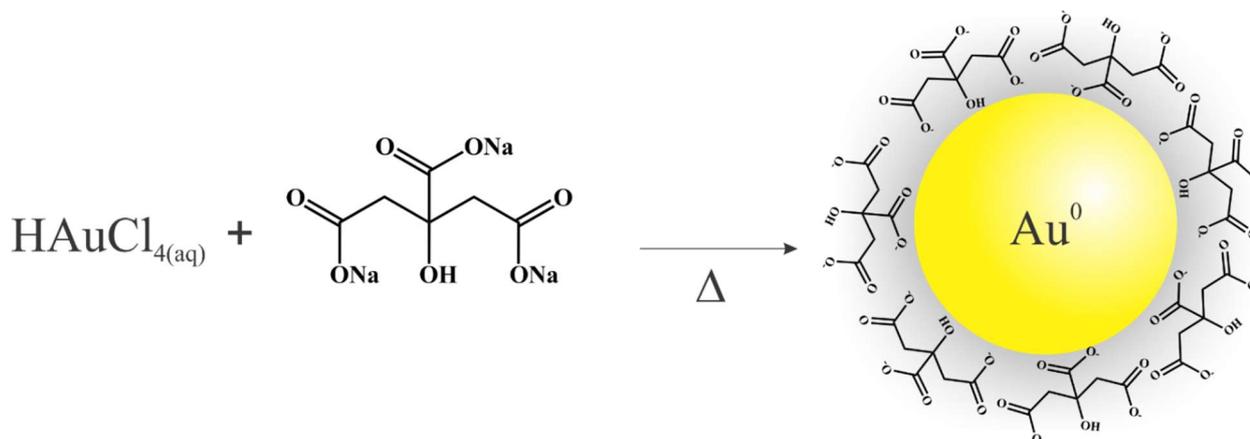
3.1 Reagentes

Água deionizada (18,2 MΩ cm a 25 °C, Milli-Q®) foi utilizada para preparar todas as soluções aquosas. N, N-dimetilformamida (DMF, 98%, Tedia-Brasil), cloreto e fluoreto de potássio (KCl e KF, 99%, Sigma-Aldrich), cloreto de sódio (NaCl, 99%, Synth), hidróxido de potássio (KOH, grau semiconductor 99,99% Sigma-Adrich), ácido sulfúrico (H₂SO₄, 99,99%, Sigma-Aldrich), hexacianoferrato(II) de potássio (K₄[Fe(CN)₆], 98,5%, Acros Organics), hexacianoferrato(III) de potássio (K₃[Fe(CN)₆], 99+%, Acros Organics), meio de cultura LB Broth Miller (Luria-Bertani – BD Difco™), meio de cultura sólido LB Agar (Lennox L Agar – Invitrogen), fosfato de potássio monobásico e dibásico (H₂KO₄P 99% e HK₂O₄P 98%, Sigma-Aldrich), 4,4'-ditiodianilina ((H₂NC₆H₄S-) ₂, 99,0%, Sigma-Aldrich), ácido acético glacial (CH₃COOH, 99,7%, Synth), ácido acético deuterado (CD₃CO₂D, 99,9%, Sigma-Aldrich), tetracloreto de ouro(III) (HAuCl₄.4H₂O, Merck), citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇, 99% Sigma-Aldrich) e 1,4-benzenoditiol (BDT, 99%, Sigma-Aldrich) foram utilizados sem purificação prévia.

3.2 Síntese das nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro (AuNPs) foram produzidas a partir da redução do composto tetracloreto áurico (HAuCl₄) (Au^{III} → Au⁰) utilizando citrato de sódio aquoso (Na₃C₆H₅O₇) como agente redutor, de acordo com o método desenvolvido por Turkevich *et al.* [55] e aprimorado por Frens [56]. O esquema de redução e formação das AuNPs encontra-se representado na Figura 6.

Figura 6 – Esquema genérico de redução e formação das nanopartículas de ouro (AuNPs).



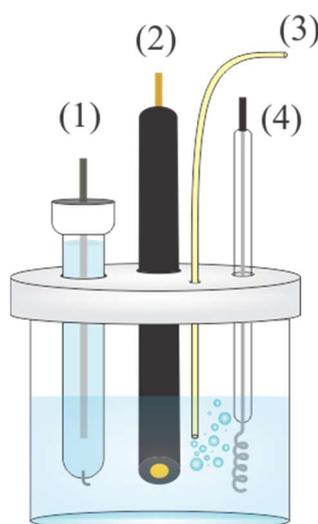
Fonte: adaptada da referência [42].

Uma solução aquosa de HAuCl_4 $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ (50 mL) contida em um balão de fundo redondo (100 mL) foi submetida à agitação constante em uma chapa de aquecimento a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ quando, então, foram adicionados 0,5 mL de uma solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$. O sistema permaneceu sob agitação por mais 10 minutos até se observar uma coloração vermelha indicando a formação das nanopartículas. Em seguida, a solução foi deixada em repouso até atingir a temperatura ambiente e foi armazenada a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. A solução coloidal de AuNPs foi analisada por espectroscopia eletrônica de absorção UV-Vis, utilizando o espectrofotômetro *Hewlett-Packard*, modelo 8453 *Diode-Array*.

3.3 Materiais e acessórios eletroquímicos

Os experimentos de eletroquímica foram realizados utilizando-se um potenciostato Autolab PGSTAT 302N (*Echo Chemie*, Utrecht, The Netherlands) controlado pelo software Nova v. 1.11 equipado com o módulo FRA2 para obtenção dos dados de impedância (EIE). As medidas foram conduzidas em uma célula eletroquímica de vidro com tampa de teflon contendo quatro orifícios para acomodação do eletrodo auxiliar de platina, em forma de espiral, eletrodo de trabalho, ouro policristalino ($A_{\text{Geométrica}} = 0,070 \text{ cm}^2$, BAS), e eletrodo de referência $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$ em KCl saturado. Todos os potenciais citados nesse trabalho serão em referência ao eletrodo $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$. No quarto orifício, inseriu-se um tubo de tygon® para saturação da solução com gás inerte (argônio). A Figura 7 ilustra a célula eletroquímica utilizada neste trabalho.

Figura 7 – Ilustração de uma célula eletroquímica contendo: (1) eletrodo de referência; (2) eletrodo de trabalho; (3) tubo para gás inerte e (4) eletrodo auxiliar.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4 Limpeza do eletrodo de ouro policristalino

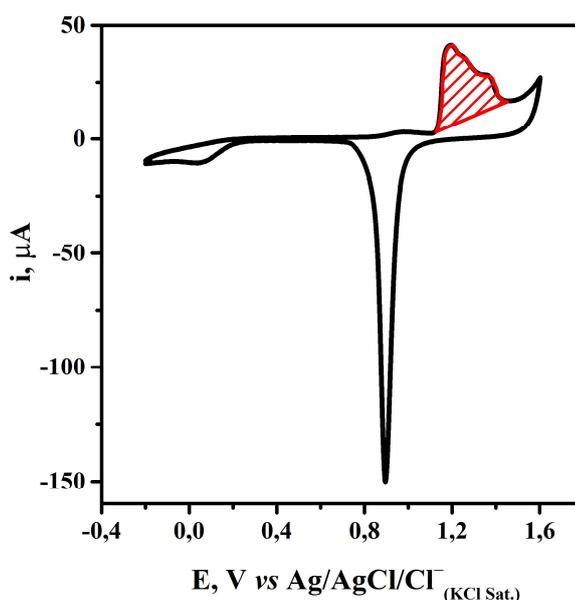
O eletrodo de ouro policristalino foi submetido a três procedimentos de limpeza na respectiva ordem de execução:

- limpeza química: imersão do eletrodo em solução “piranha” (3v H₂SO₄ / 1v H₂O₂) por 30 segundos;
- limpeza mecânica: polimento em alumina com granulação 0,05 μm seguido de banho ultrassônico por 2 minutos em um becker contendo água deionizada para remoção de resíduos de alumina;
- limpeza eletroquímica: varreduras cíclicas (20 ciclos a 0,5 V s⁻¹) de -0,4 a -1,8 V em solução 0,5 mol L⁻¹ de KOH. Em seguida, foram realizadas varreduras cíclicas (50 ciclos a 0,5 V s⁻¹) de -0,4 a 1,8 V em meio ácido, H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹, a fim de proporcionar uma superfície morfologicamente reprodutível.

3.5 Determinação da área eletroativa do eletrodo de ouro

Após realização dos procedimentos de limpeza, o eletrodo foi submetido a uma varredura cíclica (1 ciclo a 0,1 V s⁻¹) em solução 0,5 mol L⁻¹ de H₂SO₄ na faixa de -0,2 a +1,6 V. Nessa região, são observados os processos característicos da formação de óxidos de ouro [57] como ilustrado na Figura 8.

Figura 8 – Voltamograma cíclico a 0,1 V s⁻¹ do eletrodo de ouro policristalino (área geométrica = 0,07 cm²) em solução de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹ à T= 25 °C.



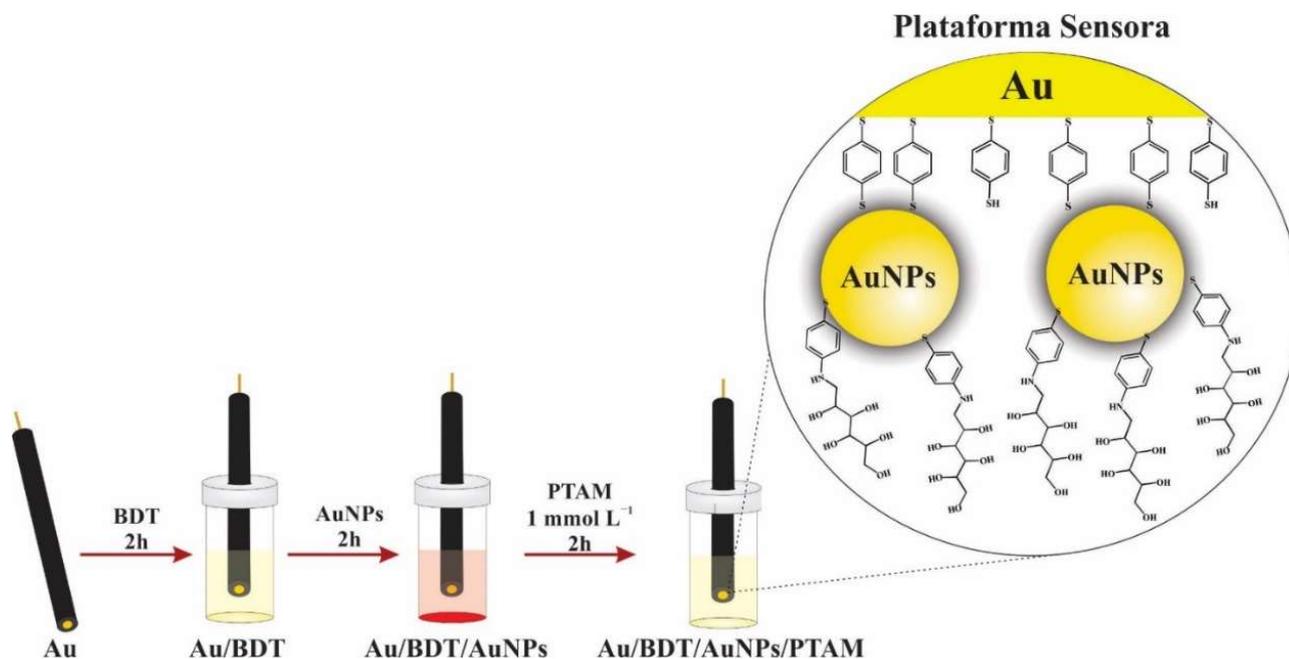
Fonte: Elaborado pelo autor.

A área eletroativa do eletrodo de ouro policristalino foi determinada a partir da carga do processo anódico (região hachurada) correspondente à formação do óxido de ouro [57]. Esse procedimento de determinação da área eletroativa é utilizado para metais que apresentam processos de oxidação/redução de óxidos bem definidos [58]. Para o ouro policristalino, a densidade de carga relacionada ao óxido de ouro é de aproximadamente $390 \mu\text{C cm}^{-2}$ [59].

3.6 Modificação do eletrodo de ouro

Após os procedimentos descritos nas seções 3.4 e 3.5, o substrato metálico foi modificado em 3 etapas para a formação da plataforma sensora suscetível à detecção de *E. coli*. Assim, para a etapa 1, o eletrodo de ouro limpo foi imerso em solução 1 mmol L^{-1} de BDT em DMF (N, N-dimetilformamida) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ em banho termostático (QUIMIS, Brasil). O tempo de modificação foi determinado experimentalmente pelas técnicas de voltametria cíclica e impedância eletroquímica. Em seguida, na etapa 2, o eletrodo modificado (Au/BDT) foi lavado com DMF e água deionizada e imerso em solução coloidal de AuNPs por 2 horas. Após esse período, o substrato (Au/BDT/AuNPs) foi lavado com água deionizada e a imobilização das AuNPs na superfície foi avaliada pelas técnicas VC e EIE. Posteriormente, o eletrodo Au/BDT/AuNPs foi imerso em solução 1 mmol L^{-1} de PTAM em 1:1 $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$ por 2 horas sendo caracterizado, em seguida, pelas técnicas eletroquímicas citadas anteriormente. O esquema de modificação encontra-se ilustrado na Figura 9. Esse procedimento foi realizado para as medidas eletroquímicas usando os equipamentos descritos na seção 3.3. Procedimento similar foi realizado para o experimento de SERS, detalhado adiante (seção 3.7.3). O método de síntese da molécula PTAM encontra-se descrito na seção 3.9.

Figura 9 – Esquema de modificação do substrato de ouro.



Fonte: Elaborado pelo autor. (Figura fora de escala)

3.7 Caracterização da SAM de 1,4-benzenoditiol (BDT)

3.7.1 Determinação do valor de pKa da molécula BDT em superfície

Os experimentos para determinação do valor de pKa da molécula de BDT adsorvida sobre ouro foram realizados utilizando o potenciostato descrito na seção 3.3. O eletrodo de ouro policristalino, previamente limpo, foi imerso em uma solução $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de BDT em DMF a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ em banho termostático pelo tempo de 2 horas (determinado experimentalmente) formando o eletrodo Au/BDT. Após esse período, o eletrodo Au/BDT foi submetido a aplicações de potenciais para obtenção de curvas voltamétricas a $0,025 \text{ V s}^{-1}$ em solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KF contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH. Os ajustes dos valores de pH foram realizados com adições de soluções de HCl e KOH.

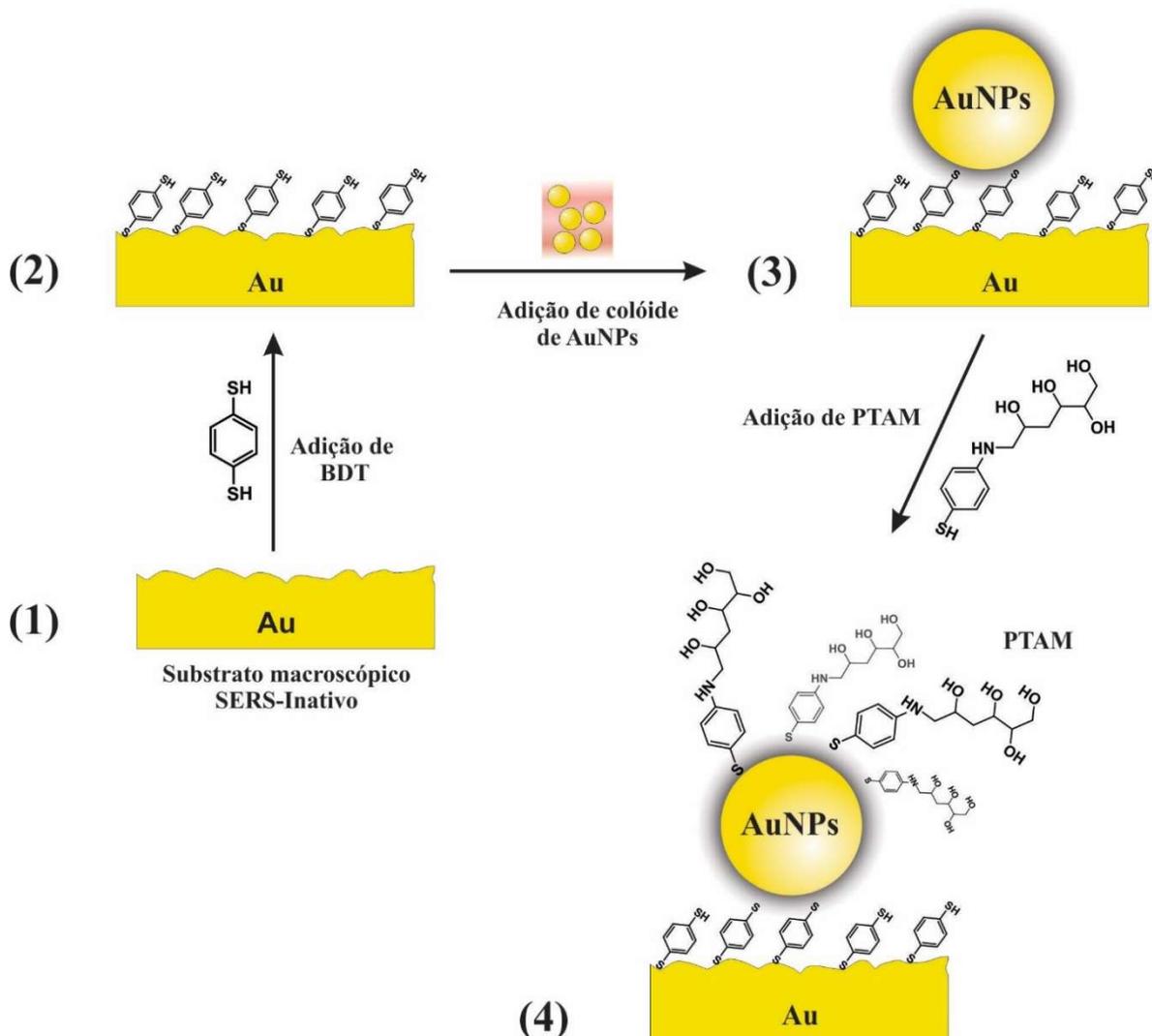
3.7.2 Espectroscopia vibracional Raman e SERS

Os estudos Raman e SERS das SAMs de BDT e PTAM em ouro, tanto em substrato macroscópico (eletrodo de ouro) como em suspensão coloidal de nanopartículas de ouro (AuNPs), foram realizados no microscópio confocal Raman Alpha300® acoplado via fibra óptica a um espectrômetro de alto-rendimento UHTS 600-VIS® (Witec), equipado com uma grade de difração de 300 linhas/mm. As amostras foram focalizadas com uma lente objetiva de 50x (Zeiss) e excitadas por um laser (tubo de gás He-Ne, Coherent) com radiação de $632,8 \text{ nm}$.

à uma potência constante de 1,0 mW (TruePower®, Witec). Os espectros foram adquiridos pela média de 3 acumulações e tempo de exposição do detector (CCD resfriada por peltier, $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$) de 0,5 s. Todos os espectros SERS foram obtidos ao ar e sem aplicação de potencial sendo denominados, portanto, SERS *ex situ*.

As SAMs dos compostos BDT e PTAM foram preparadas de forma análoga ao processo já descrito (seção 3.6), como ilustrado representativamente na Figura 10, em que os espectros SERS foram coletados à cada etapa de formação das SAMs. Os espectros vibracionais Raman e SERS foram obtidos no Laboratório de Espectroscopia Molecular (LEM) do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, com a colaboração do Dr. Dieric S. Abreu

Figura 10 – Esquema ilustrativo das etapas (1-4) de formação da plataforma sensora para detecção de bactérias *E. coli* baseado no filme molecular de PTAM em AuNP ancorado na SAM de BDT sobre substrato macroscópico de ouro.

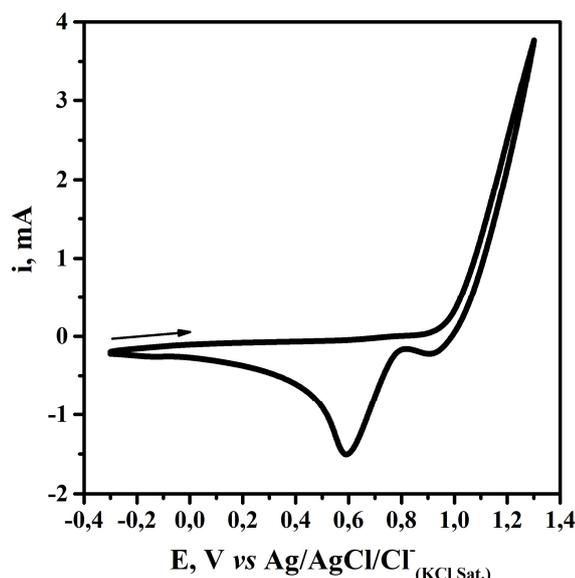


Fonte: Elaborado pelo autor. (Figura fora de escala)

3.7.3 Ativação do substrato SERS

Neste trabalho, para utilizar a intensificação do espalhamento Raman, o substrato de ouro, previamente limpo (seção 3.4), foi submetido a uma ativação eletroquímica. O procedimento consistiu na realização de ciclos de oxidação e redução (ORCs, do inglês *Oxidation-Reduction Cycles*) em uma solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl na faixa de potencial de $-0,3$ a $1,3 \text{ V}$ a $0,1 \text{ V s}^{-1}$. A Figura 11 apresenta uma curva voltamétrica obtida nessas condições.

Figura 11 – Voltamograma cíclico do eletrodo de ouro a $0,1 \text{ V s}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a ativação, a superfície foi submetida a um procedimento de dessorção redutiva em solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KOH com varreduras de potencial a $0,5 \text{ V s}^{-1}$ na faixa de $-0,4$ a $-1,8 \text{ V}$ para garantir a ausência de espécies orgânicas que podem contaminar a superfície do ouro. Após esse protocolo, foi realizado o processo de formação das SAMs já descritas anteriormente. Além do método de ativação supracitado, outra metodologia foi aplicada neste trabalho para obtenção de um substrato SERS ativo, que consistiu no ancoramento de nanopartículas de ouro em um substrato de ouro finamente polido (SERS-desativado, Figura 9. 1-2), de acordo com o procedimento de limpeza do eletrodo de ouro, já detalhado na seção 3.4.

3.8 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

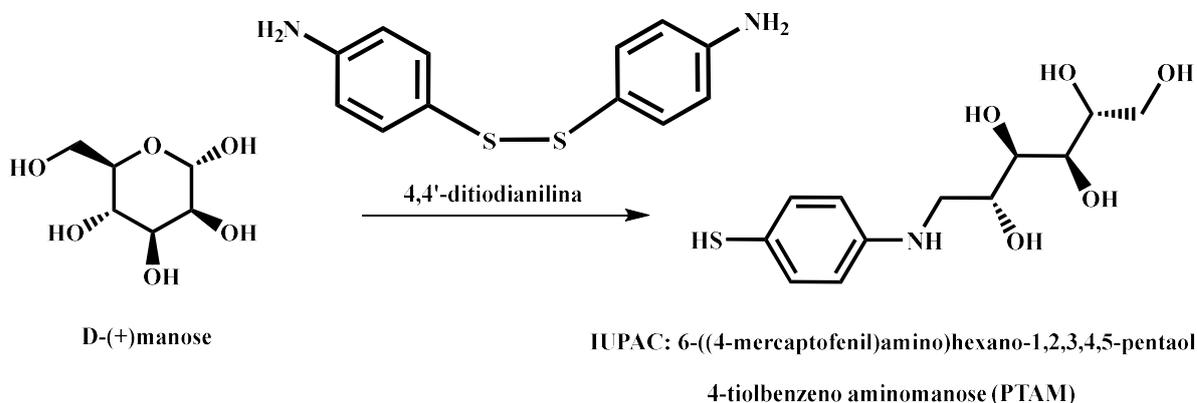
As medidas de EIE foram realizadas na faixa de $0,1 \text{ Hz}$ a 30 kHz pela superposição de um potencial senoidal AC de 10 mV ao potencial aplicado ao eletrodo de trabalho. Os experimentos foram executados em meio eletrolítico de KF $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo

o par redox de íons complexos ferrocianeto(II) e ferricianeto(III) ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 2,5 mmol L⁻¹). O potencial aplicado ao eletrodo de trabalho foi definido considerando o potencial de equilíbrio do par redox Fe^{III/II} (potencial formal) nas condições experimentais, sendo este, portanto, o potencial de circuito aberto (OCP, do inglês *Open Circuit Potential*) mensurado.

3.9 Síntese da molécula 4-tiolbenzeno aminomanose – PTAM

A síntese da molécula 4-tiolbenzeno aminomanose (PTAM) foi realizada seguindo procedimento descrito na literatura [18], esquematizada na Figura 12. Resumidamente, foram dissolvidos 0,9 mg (5 mmol) de D-(+)manose em 50 mL de água deionizada e 0,62 mg (2,5 mmol) de 4,4'-ditiodianilina em 50 mL de ácido acético. A solução ácida de composto sulfurado foi adicionada à solução do açúcar e o balão de fundo redondo contendo a mistura foi selado. Utilizando um agitador magnético e uma chapa de agitação, a solução foi agitada por 1 hora a 20 °C. Após esse tempo, adicionou-se ao meio reacional uma solução aquosa contendo 0,29 mg (5 mmol) de dimetilamina borano (DMAB) e deixou-se o tubo destampado sob agitação constante por 1 hora a 20 °C. O tubo foi selado novamente e a solução aquecida para 50 °C e agitada sob fluxo de gás nitrogênio por mais 1 hora. Terminada a síntese, a mistura foi resfriada em banho de gelo e filtrada a vácuo, sendo lavada com etanol gelado e com éter etílico por três vezes. O sólido amarelo obtido foi caracterizado utilizando as técnicas de espectrometria de massa e Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ¹H). Essas caracterizações foram realizadas no Laboratório JRL do Departamento de Química na Universidade de Illinois, Estados Unidos, com a colaboração do Dr. Adolfo I. B. Romo.

Figura 12 – Esquema simplificado de síntese da molécula 4-tiolbenzeno aminomanose (PTAM).



O espectro de massa foi obtido utilizando o espectrômetro Waters Q-TOF Ultima EIS com ionização por HRESI (do inglês, *High Resolution Electro Spray Ionization*) no modo íon positivo. A voltagem foi padronizada em +3,4 kV, velocidade de fluxo de N₂ em 5 L min⁻¹

a 300 °C e pressão do gás nebulizador a 30 psi. Os espectros de RMN foram adquiridos utilizando um espectrômetro Bruker Avance-500, operando em 500,13 MHz para o núcleo ^1H equipado com uma cabeça de sonda dupla multinuclear de banda larga de 5 mm (^{109}Ag - ^{31}P), incorporando uma bobina Z-gradiente. Os espectros foram calibrados em relação ao composto ácido acético deuterado (AcOH-d_4) e corrigidos em relação ao tetrametilsilano (TMS).

3.10 Cultivo da bactéria *Escherichia coli*

O cultivo do microrganismo *Escherichia coli* foi realizado antes da imersão do eletrodo Au/BDT/AuNPs/PTAM. É importante ressaltar que os procedimentos descritos a seguir foram realizados em um ambiente estéril e nas proximidades de uma chama proveniente de um bico de Bunsen. Além disso, todas as soluções e materiais utilizados foram previamente autoclavados a 121 °C ou eram estéreis por garantia do fabricante.

Utilizou-se a cepa BL21(DE3) da bactéria *Escherichia coli* armazenada a - 80 °C em 5% glicerol, previamente descongelada e mantida em gelo. O procedimento de cultivo seguiu três etapas:

Etapa 1 – Primeiro inóculo: uma alça de platina foi imersa na amostra de *E. coli* descongelada e, em seguida, inserida dentro de um tubo contendo o meio de cultura líquido LB (Luria Bertani – 10 g/L triptona, 5g/L extrato de levedura, 10 g/L NaCl). Após o inóculo, o crescimento bacteriano ocorreu por 12 h a 37 °C sob agitação de 200 rpm em uma incubadora do tipo *shaker* orbital (TE-420 TECNAL[®]). Passado esse período, percebeu-se a mudança visual do meio de cultura, tornando-se turvo, o que indicou o crescimento microbiano.

Etapa 2 – Segundo inóculo: a partir da amostra anterior, transferiu-se uma alíquota de 50 μL para um erlenmeyer contendo, aproximadamente, 50 mL do meio líquido LB para o segundo inóculo. Seguiu-se, então, um novo crescimento bacteriano nas mesmas condições descritas anteriormente, porém, pelo período de 4h, como ilustrado na Figura 13. Após esse tempo, a suspensão bacteriana foi separada para dois procedimentos, sendo eles: (i) a contagem de células viáveis e (ii) a suspensão e armazenamento da *E. coli* em solução tampão fosfato salino (PBS - $\text{H}_2\text{KO}_4\text{P}$ + $\text{HK}_2\text{O}_4\text{P}$) PBS 0,1 mol L^{-1} NaCl 1 g L^{-1} , pH \approx 7, mantida em gelo.

Etapa 3 – Contagem de células viáveis: também entendido como o método de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), é uma forma de estimar a quantidade de bactérias passíveis de multiplicação celular em 1 mL de volume (UFC/mL). Para esse procedimento, retirou-se 1 mL da suspensão bacteriana (segundo inóculo) e o adicionou em um

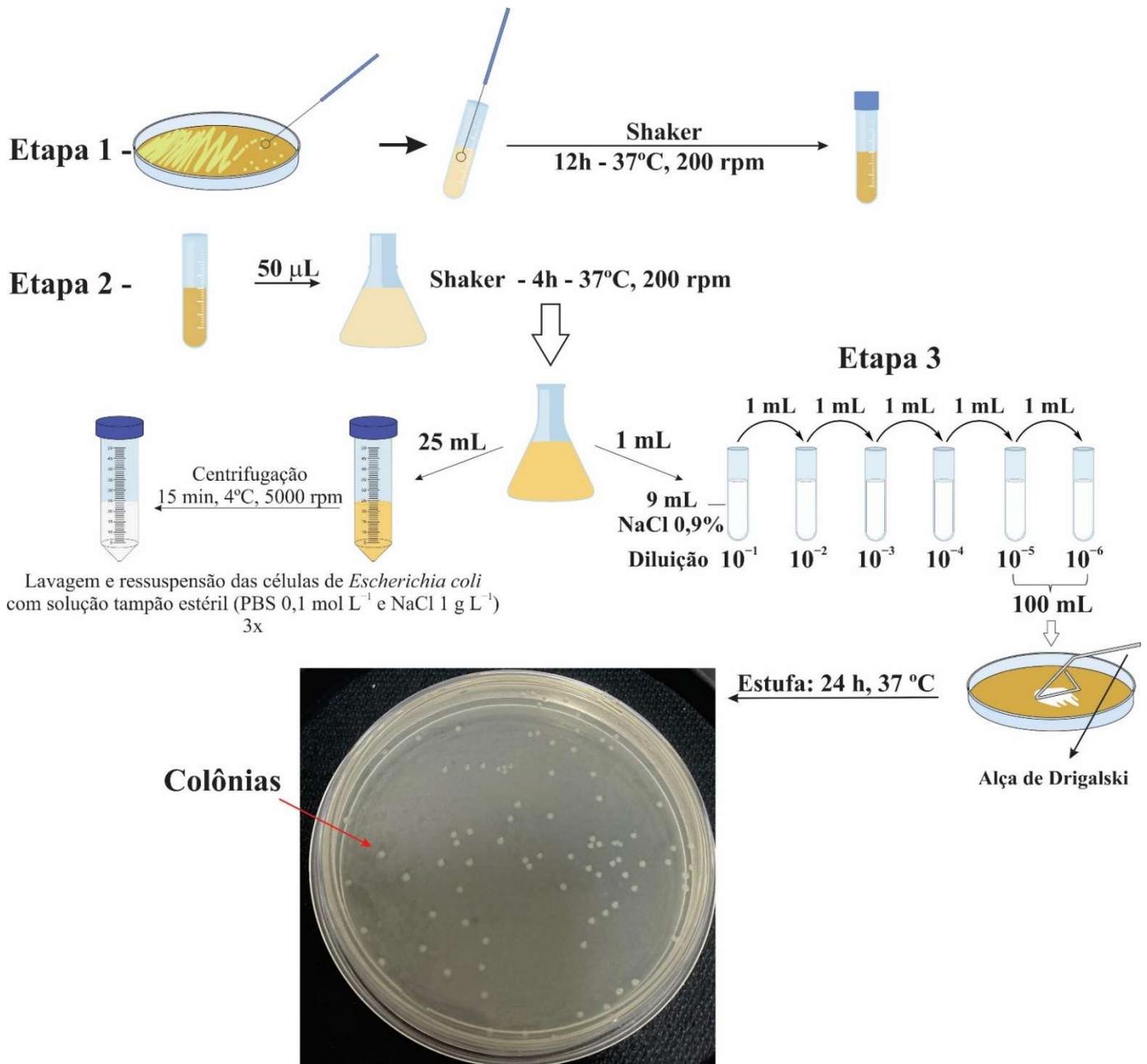
tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina (NaCl 0,9%) fazendo uma diluição 1:10. Foram feitas diluições sucessivas de 10^{-1} até 10^{-6} , como mostrado na Figura 13. Em seguida, foram retiradas alíquotas de 100 μ L dos tubos com diluições de 10^{-5} e 10^{-6} e transferidas para placas de Petri contendo meio LB sólido (meio nutritivo LB + ágar). As alíquotas foram espalhadas nas placas com o auxílio de uma alça de Drigalski. O procedimento de plaqueamento foi feito em duplicata para as duas diluições utilizadas. Após esse procedimento, as 4 placas foram incubadas a 37 °C por 24 h em estufa para cultura e bacteriologia (ETHIK TECHNOLOGY) a fim de ser observado o crescimento das colônias. Após esse tempo, fez-se a contagem das colônias nas placas.

Para se ter um número preciso e confiável de colônias é necessário contar em cada placa de 30 a 300 colônias [10,60]. Portanto, nas placas de diluição 10^{-5} , foram contados 80 e 87 colônias, sendo o valor médio de 83 colônias nessa diluição. A concentração de bactérias (UFC/mL) é calculada pela Equação 1 [10]:

$$UFC/mL = \frac{\text{número de colônias}}{\text{Fator de diluição} \times \text{volume da alíquota espalhada na placa}} \quad (1)$$

em que o número de colônias foi de 83, o fator de diluição de 10^{-5} e o volume da alíquota espalhada de 100 μ L. Nessas condições, a concentração de unidade formadora de colônia (UFC) por mililitro foi de $8,3 \times 10^7$ ($8,3 \times 10^7$ UFC/mL). Essa foi a suspensão bacteriana de estoque empregada neste estudo.

Figura 13 – Esquema do procedimento de cultivo da bactéria *Escherichia coli*.



Fonte: Elaborado pelo autor. (Figura fora de escala)

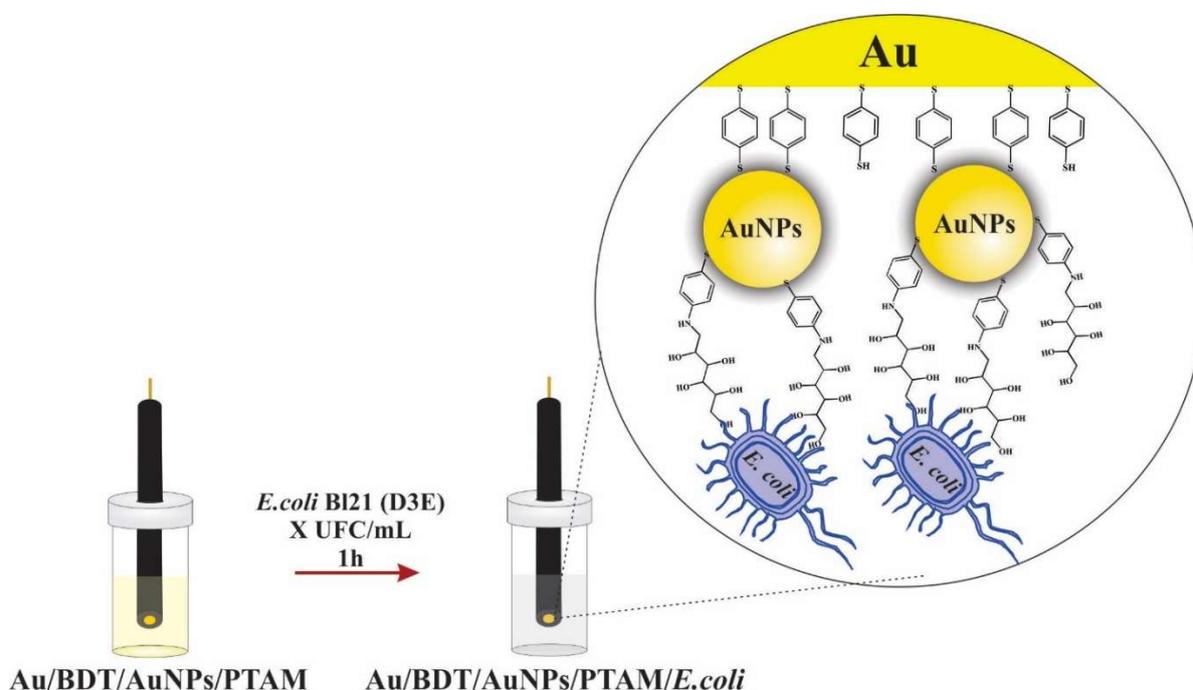
O segundo procedimento realizado após a Etapa 3 foi o armazenamento da *E. coli* em solução tampão pH ≈ 7 . Para isso, foi centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos a 4 °C, 25 mL de uma suspensão bacteriana contida no erlenmeyer resultante da Etapa 3 em uma centrífuga refrigerada (Allegra™ 25R Centrifuge). Após esse procedimento, o sobrenadante foi descartado e 25 mL de uma solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ contendo NaCl 1 g L⁻¹, pH ≈ 7 , foi adicionada à mistura que foi, novamente, centrifugada. Esse processo, ilustrado na Figura 13, foi realizado três vezes para assegurar a retirada do meio nutritivo. Em seguida, a suspensão

de bactérias em solução tampão foi estocada em um isopor com gelo na geladeira a 4 °C e utilizada para as medidas de modificação da plataforma sensora (Au/BDT/AuNPs/PTAM).

3.11 Imobilização da bactéria *E. coli* sobre a superfície da plataforma sensora

Após a realização dos procedimentos descritos nas seções 3.6 e 3.10, o eletrodo Au/BDT/AuNPs/PTAM foi imerso durante 1 hora em solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ contendo NaCl 1 g L⁻¹, pH ≈ 7, e as células de *E. coli* suspensas a temperatura ambiente. Esse processo foi feito a fim de capturar as bactérias na superfície do eletrodo, como ilustrado na Figura 14. Os experimentos eletroquímicos foram realizados usando os equipamentos e técnicas descritos na seção 3.3 e 3.8.

Figura 14 – Esquema de imobilização da bactéria *E. coli* sobre o eletrodo Au/BDT/AuNPs/PTAM.



Fonte: Elaborado pelo autor. (Figura fora de escala)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

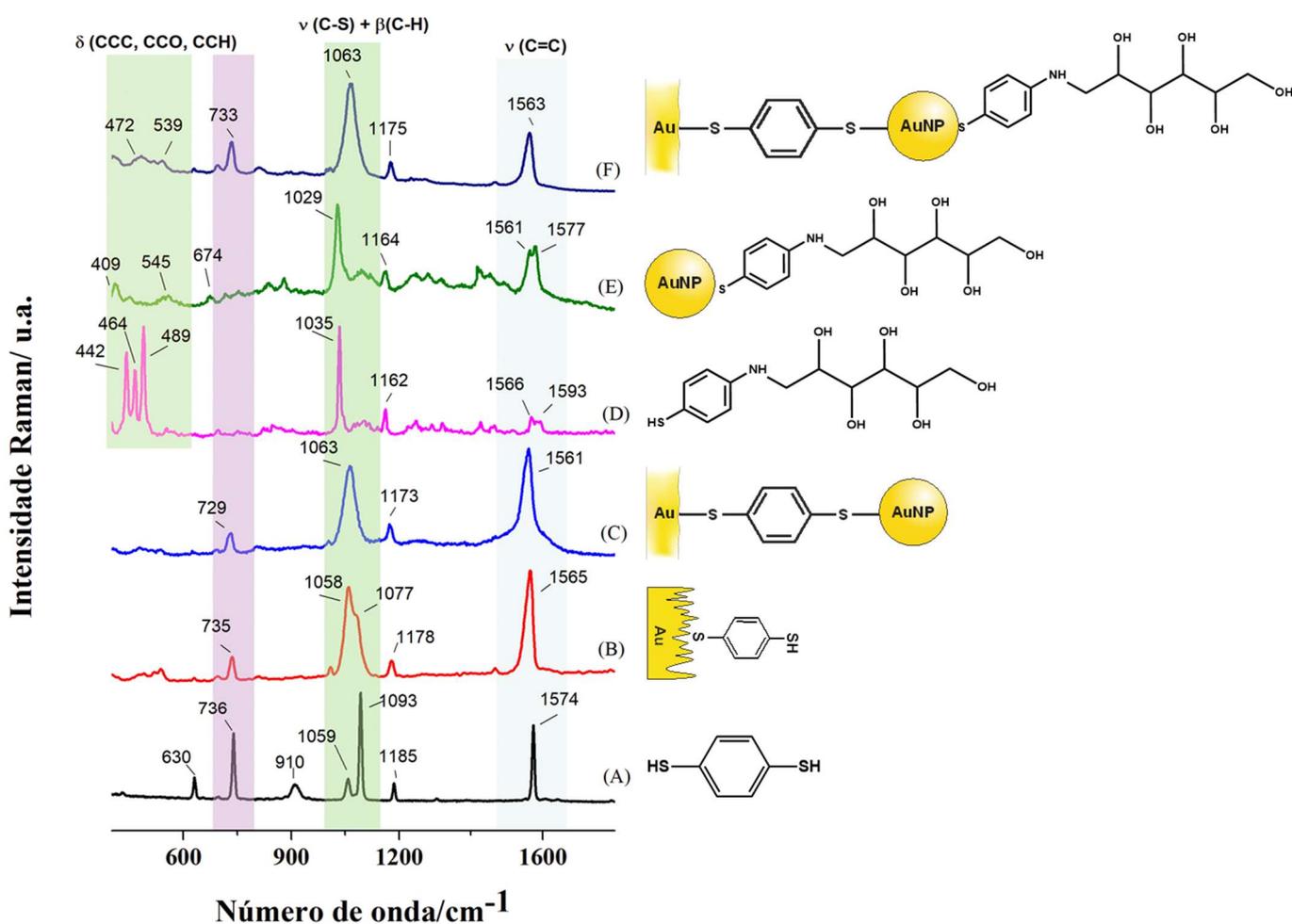
4.1 Espectroscopia Raman e SERS

O efeito SERS, que consiste na intensificação do espalhamento Raman, vem sendo explicado, majoritariamente, por dois mecanismos: o eletromagnético (considera a intensificação do campo eletromagnético próximo à superfície do metal) e o químico (que considera as modificações na polarizabilidade molecular gerada pela interação molécula-substrato). Esse último está relacionado à formação de ligações químicas com o substrato, como

por exemplo, a ligação covalente Au–S, apresentada nesse trabalho. Assim, os espectros SERS podem divergir dos espectros Raman normal pelo aumento de intensidade, deslocamento e até surgimento de novas bandas [61].

A formação das SAMs dos compostos BDT sobre o eletrodo e a incorporação das AuNPs, bem como a subsequente formação da SAM de PTAM nas nanopartículas ancoradas, foram confirmadas pelos resultados de espalhamento Raman intensificado por superfície. A Figura 15 apresenta os espectros obtidos para a sequência de montagem apresentada na Figura 10 (seção 3.7.2).

Figura 15 – Espectros de espalhamento Raman: (A) BDT e (C) PTAM; e Raman intensificado por superfície: (B) Au/BDT, (C) Au/BDT/AuNPs, (D) PTAM em AuNP e (E) Au/BDT/AuNPs/PTAM. $\lambda_0 = 632,8$ nm.

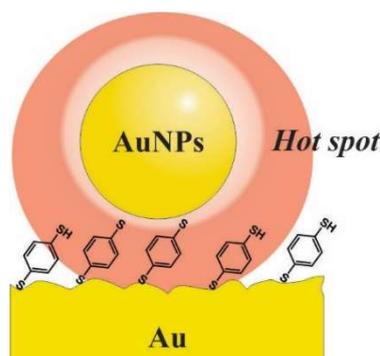


Os valores das bandas mais relevantes para a caracterização dos eletrodos encontram-se resumidos na Tabela 6 (seção 7 - Anexos). As atribuições dessas bandas foram feitas de forma comparativa, considerando sistemas similares descritos na literatura [40,62–67]. A molécula de BDT é passível de experimentar equilíbrio tautomérico podendo se encontrar na

forma tiona (-C=S) e tiol (-C-S-H) [36]. A presença da banda em 909 cm^{-1} no espectro Raman normal, Figura 15 (A), atribuída à deformação angular C-SH ($\beta(\text{C-SH})$) [65,68,69], indica que a forma tiol é preponderante. O desaparecimento dessa banda no espectro SERS do eletrodo Au/BDT, Figura 15 (B) (SERS-ativo), indica que a adsorção das moléculas de BDT sobre ouro ocorre através de um dos átomos de enxofre e, portanto, em uma configuração perpendicular à superfície [68]. Essa configuração está relacionada, também, a formação de uma maior densidade interfacial (decorrente da ligação Au-S), pois o aumento do recobrimento superficial devido ao aumento do tempo de modificação da molécula BDT contribui para a maior perpendicularidade dessa substância em relação à superfície [68]. De acordo com a literatura [70], os modos vibracionais no plano de moléculas adsorvidas em configurações perpendiculares (ou com inclinações próximas à perpendicularidade) apresentam, em geral, intensificação e deslocamento para menores valores de frequência. De fato, a atribuição de configuração perpendicular para as moléculas de BDT adsorvidas sobre ouro é corroborada pelo deslocamento da banda referente ao estiramento C=C do anel benzênico [40] de 1574 cm^{-1} no espectro Raman normal para aproximadamente 1565 cm^{-1} nos espectros SERS dos eletrodos Au/BDT e Au/BDT/AuNPs.

A SAM de BDT atuou como um ponto de ancoramento, bem como um espaçador entre a superfície de ouro do eletrodo (SERS-inativo) e as AuNPs, uma vez que o espaçamento é de aproximadamente 0,6 nm (tamanho estimado da molécula de BDT otimizada em software de modelagem molecular Avogadro 1.2). As nanopartículas, por sua vez, atuam como um concentrador de campo elétrico, possibilitando a formação de *hot spots*, dando origem ao fenômeno de intensificação do espalhamento Raman via efeito eletromagnético [71,72]. Uma ilustração da formação de *hot spots* é representada na Figura 16.

Figura 16 – Representação ilustrativa da região hot spot.



Fonte: Elaborado pelo autor. (Figura fora de escala)

O espectro apresentado na Figura 14 (C), foi obtido para o substrato SERS-inativo recoberto com a SAM de BDT incorporada com nanopartículas de ouro (Au/BDT/AuNPs). A obtenção de um sinal de espalhamento Raman intenso para esse sistema é um forte indicativo da formação de uma ponte entre o substrato macro (SERS-inativo) e as AuNPs que se estabelece por meio da ligação dos fragmentos tióis aos substratos. Tal hipótese baseia-se no fato de que a intensificação do espalhamento Raman só é observada em regiões de alta concentração de campo elétrico (interação dos plásmons de superfície dos metais), formando o que se denomina de *hot spots* [71,73]. Além do próprio sinal de espalhamento intenso obtido, é possível observar que as bandas características do composto permanecem após a formação da SAM sanduichada entre os substratos de ouro, comparativamente ao espectro Raman do pó do composto BDT (Figura 15 (A)). O modo em 910 cm^{-1} no espectro Raman do pó do composto BDT, atribuído ao estiramento ν (S-H) [68,74] desaparece após a formação da ponte entre os substratos. Essa observação reforça a proposta de formação da ligação Au-S entre o BDT e os substratos de ouro, uma vez que tal ligação requer a desprotonação do grupo tiol [68,75].

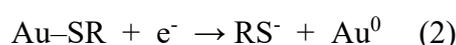
O espectro Raman do composto PTAM (pó, Figura 15 (D)) apresenta o mesmo conjunto de bandas presentes no fragmento de BDT, associadas ao anel aromático. Destacam-se as bandas em 1593 e 1568 cm^{-1} (estiramento, ν (C-C) e (C-N)), 1162 cm^{-1} (dobramento, δ (C-C-H)), 1035 cm^{-1} (estiramento, ν (S-C)) e em baixos números de onda (442 - 489 cm^{-1} , δ (CCC), (COH)) atribuídas aos modos esqueléticos do fragmento glicosídico [62-64]. Comparativamente, o composto PTAM sólido e o PTAM adsorvido sobre as AuNPs (Figura 15 (E)), apresentam um perfil similar, sendo um indicativo que a espécie derivada da D-manose está funcionalizando as nanopartículas de ouro. Apesar disso, a região glicosídica não foi observada com intensidade na Figura 15 (E) devido, possivelmente, à distância que essa porção da molécula se encontra da superfície metálica o que reduz o efeito de intensificação SERS.

De acordo com o espectro apresentado na Figura 15 (F), a subsequente adição de PTAM ao sistema formado por nanopartículas de ouro ancoradas à SAM de BDT (Au/BDT/AuNPs/PTAM), não causa mudanças significativas no perfil espectral. Ainda assim, sinais presentes na região de baixos números de onda podem ser associados aos modos esqueléticos do fragmento glicosídico do PTAM (472 - 539 cm^{-1} , δ (CCC), (COH)). Tais mudanças espectrais mostram-se pouco significativas para a devida comprovação da adsorção do PTAM às AuNPs. É importante ressaltar, entretanto, que a ligação do PTAM é esperada

ocorrer na camada externa das AuNPs, excluindo-as, na prática, da região de *hot spot*. Tal configuração resultaria, de fato, em baixa intensificação SERS.

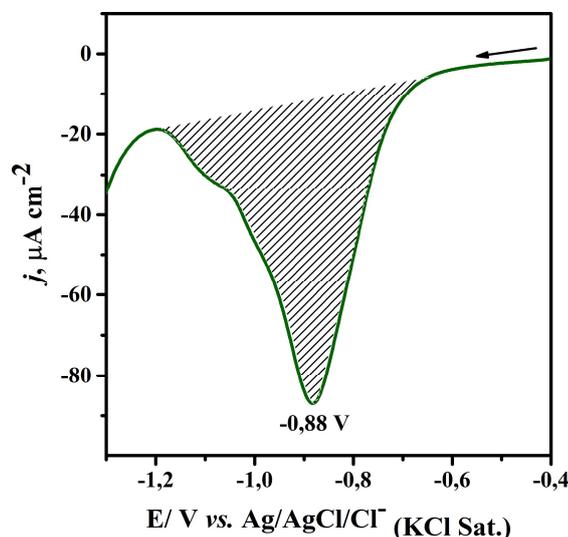
4.2 Dessorção redutiva em meio alcalino

A estabilidade de SAMs formadas por moléculas sulfuradas sobre ouro tem sido estimada, indiretamente, através da medida da força da ligação Au–S determinada por varredura linear de potencial em meio alcalino em sentido redutivo para forçar a dessorção [76,77]. Genericamente, o processo pode ser descrito através da reação de eletrodo representada na Equação (2) [32]:



Baseando-se nos espectros SERS apresentados na seção 4.1, tem-se que a molécula BDT é adsorvida sobre ouro através de um dos átomos de enxofre. Sendo assim, a onda observada no voltamograma ilustrado na Figura 17 pode ser atribuída à reação de eletrodo (Equação 2).

Figura 17 – Voltamograma linear a 50 mVs^{-1} do eletrodo de ouro após 4h de imersão solução $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de BDT. Solução eletrolítica: $\text{KOH } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$, $T = 20^\circ\text{C}$.



É importante ressaltar que o branco da dessorção do ouro limpo em meio alcalino não apresenta processos de redução indicando uma superfície livre de moléculas sulfuradas adsorvidas. O processo de dessorção de SAMs formadas por moléculas sulfuradas sobre ouro depende de alguns fatores, podendo-se citar: (i) tamanho da cadeia constituinte da porção intermediária; (ii) interações intermoleculares; (iii) natureza da ligação entre o grupo cabeça (átomo de S) e os átomos da superfície; e (iv) cristalinidade superficial do substrato metálico

[77]. A dessorção de moléculas sulfuradas ocorre, geralmente, em valores negativos ($-0,5 < E_{dr} < -1,0$ V) devido à forte ligação Au-S e às interações intermoleculares laterais.

Conforme observado na Figura 17, o valor do potencial de dessorção (E_{dr}) das moléculas de BDT sobre ouro foi observado em $-0,88$ V vs Ag/AgCl/Cl⁻. Comparativamente à dessorção das moléculas de 4-mercaptopiridina ($E_{dr} = -0,64$ V vs Ag/AgCl/Cl⁻) [35,78], cuja interação com a superfície de ouro é atribuída à ligações puramente sigma (σ), o valor mais negativo sugere interações pi (π) e/ou um grau de empacotamento relativamente maior devido às interações laterais. As duas contribuições consideradas resultam em SAMs mais fortemente adsorvidas e dificultam, portanto, o processo de dessorção.

A carga (Q) calculada sob a onda de dessorção (área hachurada), permite determinar o recobrimento superficial (Γ) sobre o eletrodo através da Equação (3) [76]:

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA} \quad (3)$$

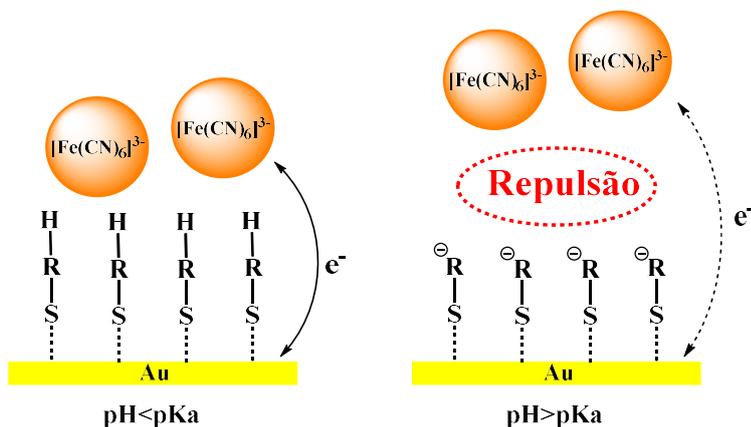
em que n representa o número de elétrons envolvidos no processo de dessorção; F é a constante de Faraday (96485 C mol⁻¹) e A é a área eletroativa do eletrodo. O valor do recobrimento superficial foi calculado em $33,1 \times 10^{-10}$ mol cm⁻² nas condições da Figura 17. Assumindo que o processo de adsorção ocorre em condições de equilíbrio, esse valor fornece a concentração da espécie na fase sólida, ou seja, a concentração da espécie adsorvida sobre o eletrodo.

4.3 pKa da monocamada automontada

O grupo funcional terminal (β) da SAM fornece importantes características e propriedades à superfície. Assim, é necessário compreender e avaliar algumas propriedades físicas e químicas relacionadas ao grupo funcional terminal como, por exemplo, o equilíbrio ácido-base após adsorção (determinação do pKa da SAMs). Entender como a SAM de BDT se comporta frente a diferentes valores de pH de soluções é importante para compreendermos os processos subsequentes de formação da plataforma sensora. A fim de determinar os valores de pKa de SAMs, a literatura oferece vários métodos usando técnicas de espectroscopia, de titulação por ângulo de contato, QCM e eletroquímica [79,80]. Zhao e colaboradores, propuseram a utilização de voltametria cíclica na presença de moléculas eletroativas — [Fe(CN)₆]³⁻ — para a determinação do valor de pKa de moléculas monoproticas adsorvidas sobre ouro [80]. De acordo com os autores, a protonação/desprotonação das moléculas adsorvidas implica na aproximação/afastamento das moléculas de prova (*vide* ilustração na

Figura 18) e, conseqüentemente, em diferentes valores de corrente. A variação nos valores de corrente é, então, associada ao estado de protonação das espécies adsorvidas permitindo a determinação do valor de pKa. Paulo e colaboradores [35] estenderam o método para moléculas polipróticas adsorvidas sobre ouro.

Figura 18 – Esquema da interação de uma SAM genérica com moléculas de prova aniônicas ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) em soluções de diferentes valores de pH (R refere-se a uma cadeia carbônica genérica).



Fonte: adaptada da referência [80].

O pKa de superfície é descrito pela reação de ionização do grupo terminal da SAM sendo representado genericamente a seguir: $\text{HA} \rightleftharpoons \text{A}^- + \text{H}^+$. De acordo com a definição de pKa de uma solução, a Equação de Henderson-Hasselbach [81] (4) é dada por:

$$pKa = pH + \log \left(\frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]} \right) \quad (4)$$

em que $[\text{HA}]$ e $[\text{A}^-]$ são as concentrações das espécies protonadas e desprotonadas, respectivamente.

Considerando que a corrente total aparente (i) do íon $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ é composta pela soma das respostas atribuídas às formas dissociada $[\text{A}^-]$ e não dissociada $[\text{HA}]$ da SAM, tem-se [80]:

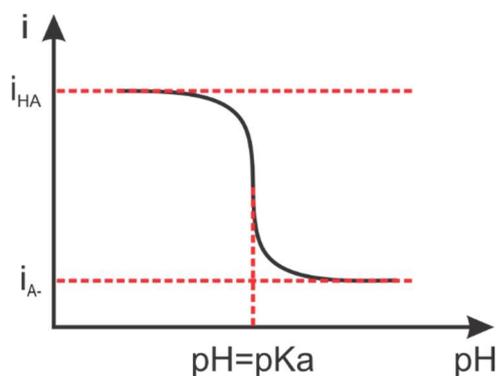
$$i = i_{\text{A}^-}[\text{A}^-] + i_{\text{HA}}[\text{HA}] \quad (5)$$

em que i_{A^-} e i_{HA} correspondem às correntes de pico das espécies de prova para a superfície desprotonada e protonada, respectivamente. Diante disso, $[\text{HA}]$ indica a concentração de moléculas adsorvidas ou recobrimento superficial (Γ). Admitindo-se que o recobrimento é 1, tem-se que $[\text{HA}] + [\text{A}^-] = 1$. Dessa forma, usando as Equações (4) e (5), é possível obter a seguinte expressão [80] (6):

$$pKa = pH - \log \left[\left(\frac{i_{HA} - i_{A^-}}{i_{A^-}} \right) - 1 \right] \quad (6)$$

em que i_{A^-} e i_{HA} são obtidos pelos valores médios dos patamares da curva i vs pH, representada na Figura 19. De acordo com a Equação (6), é possível calcular o pKa da SAM a partir dos valores das correntes de pico obtidos por voltametria cíclica na presença de uma espécie eletroativa em solução (ion complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, como exemplo).

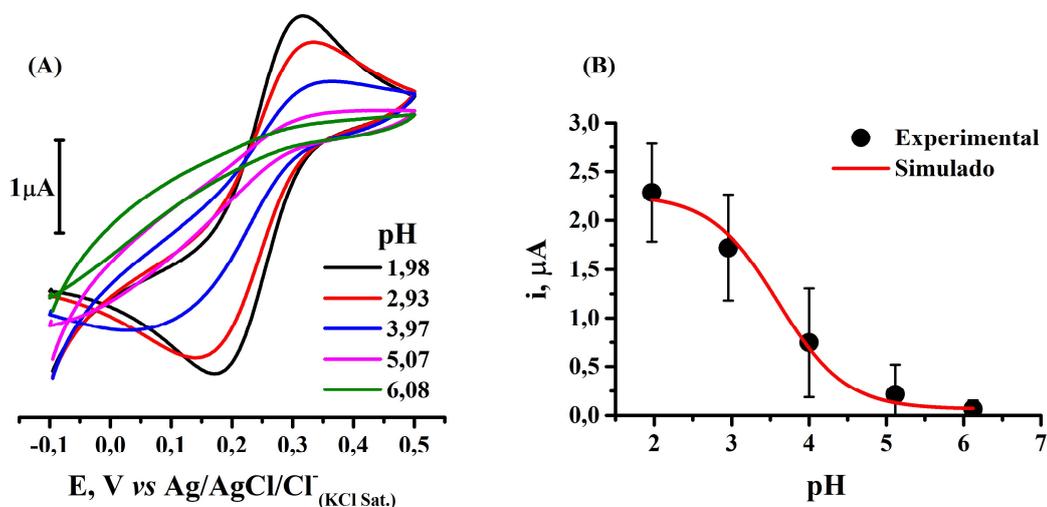
Figura 19 – Curva ilustrativa i vs pH.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 20 (A) apresenta os voltamogramas cíclicos da SAM de BDT em superfície de ouro (eletrodo Au/BDT) imerso em uma solução de KF contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em diferentes valores de pH.

Figura 20 – (A) Voltamogramas cíclicos do eletrodo Au/BDT a 15 mVs^{-1} em solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KF de diferentes valores de pH contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ à 25°C , (B) curva de pKa experimental (●) e simulada (—).



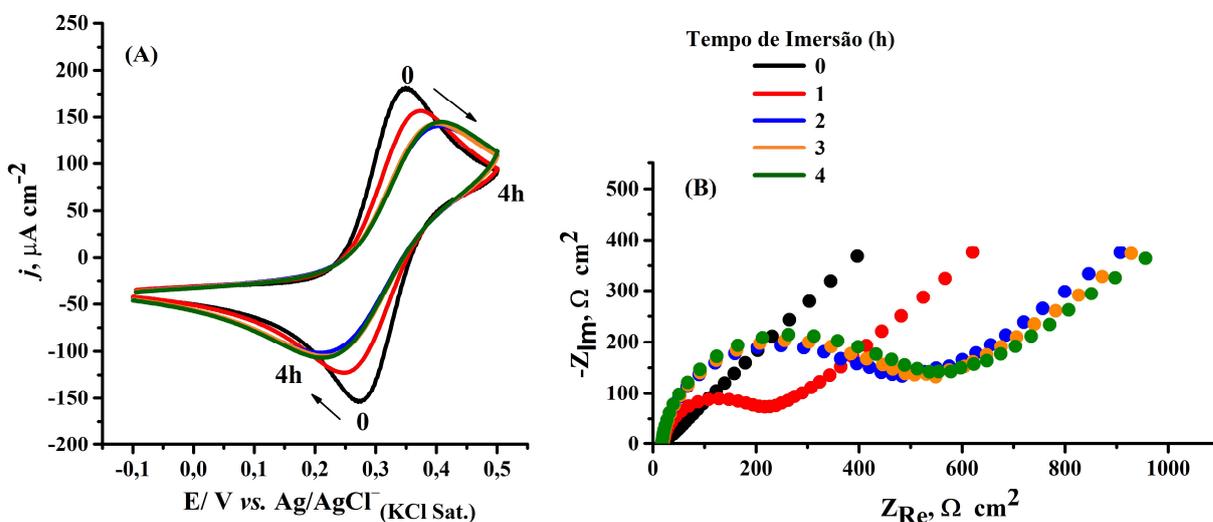
A partir dos voltamogramas obtidos em soluções de diferentes valores de pH, pode-se observar uma diminuição de corrente quando se passa de pH 1,98 para 6,08. Atribui-se esse

comportamento à crescente repulsão entre o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, uma espécie aniônica, e a SAM à medida que o pH da solução se torna menos ácido. Ao se elevar o pH da solução, aumenta-se a densidade de carga negativa no grupo terminal da SAM, elevando-se a repulsão. Essa condição afeta a reação heterogênea de transferência de elétrons (hTE), tornando-a mais lenta, como indicado pelo afastamento entre os potenciais de pico anódico e catódico e a diminuição dos valores de corrente de pico. Nas condições estudadas, o limite desse processo é observado em pH 6,08 quando o processo redox do íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ não é mais observado. A Figura 20 (B) apresenta a curva i vs pH a partir da qual é possível calcular o valor de pKa da espécie BDT adsorvida, utilizando a Equação (6). Esse gráfico foi construído com os valores de corrente de pico anódico (i_{pa}) (correção feita subtração corrente capacitiva) calculados a partir dos voltamogramas da Figura 20 (A), correspondendo, portanto, aos pontos experimentais (●). A Equação (6) descreve a dependência dos valores de i_{pa} em relação ao pH da solução e foi usada para simular uma curva teórica (—). Assim, o valor do pKa foi calculado como $3,60 \pm 0,39$.

4.4 Cinética de adsorção das moléculas de BDT sobre ouro

Além dos experimentos para a determinação dos parâmetros físicos e químicos, como a determinação do pKa da SAM, do recobrimento superficial e do potencial de dessorção, foi necessário avaliar o tempo máximo de imersão do eletrodo de ouro em solução da molécula BDT para formação do substrato Au/BDT, ou seja, a cinética do processo de adsorção. Para isso, foram utilizadas as técnicas de voltametria cíclica e impedância eletroquímica, usando o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ em solução. A Figura 21 ilustra os resultados obtidos em diferentes tempos de modificação (0 até 4h), sendo em (A) os voltamogramas cíclicos e em (B) os diagramas de *Nyquist*.

Figura 21 – (A) Voltamogramas cíclicos a 100 mV s^{-1} e (B) diagramas de *Nyquist* do eletrodo modificado (Au/BDT) em diferentes tempos de imersão (0 até 4h). Medidas realizadas em solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KF contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ à $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} \approx 6$.



Os voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 21 (A) mostram o aumento na diferença entre os valores de potenciais de pico (ΔE_p – Tabela 2) e a diminuição da corrente faradáica referente ao processo redox do íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$. Esse comportamento é atribuído a uma cinética de transferência de elétrons gradativamente mais lenta com o aumento nos tempos de imersão. Como mostrado nos diagramas de *Nyquist*, Figura 21 (B), há um aumento na resistência de transferência de carga (R_{CT}) associada às espécies redox [30,82]. Essa observação é atribuída à dificuldade dessas espécies em acessarem a superfície do substrato onde ocorre a reação hTE. Tal resultado está associado ao aumento da densidade de empacotamento da SAM em tempos prolongados de imersão. Outro fator que contribui para um processo hTE mais lento, é a repulsão eletrostática entre as moléculas de BDT desprotonadas e os complexos aniônicos em solução [35]. Nesse caso, o efeito não é tão intenso quanto aquele observado nas curvas da Figura 20 (A) (seção 4.3 – pKa da monocamada automontada) devido à concentração do íon complexo nos experimentos impedimétricos (5 vezes maior). A maior concentração favorece o efeito de difusão tornando mais efetivo o processo hTE [30,82]. Além disso, após 2h de modificação, os voltamogramas pouco variam, indicando a saturação da superfície

A partir dos diagramas de *Nyquist*, é possível calcular o grau de recobrimento superficial (θ) e a constante aparente de velocidade da reação heterogênea de transferência de elétrons (k_{app}) usando as Equações (7) e (8) [83]:

$$\theta = 1 - \left(\frac{R_{CT}}{R_{CT}^*} \right) \quad (7)$$

$$k_{app} = \frac{RT}{F^2 C (R_{CT}^*)} \quad (8)$$

em que R_{CT} e R_{CT}^* são as resistências de transferência de carga para o eletrodo limpo e modificado, respectivamente, R é a constante dos gases ideais ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T é a temperatura (K), F é a constante de Faraday (96485 C mol^{-1}) e C é a concentração do par redox (mol cm^{-3}). Os parâmetros eletroquímicos e impedimétricos obtidos a partir dos resultados apresentados na Figura 21 encontram-se resumidos na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros eletroquímicos e impedimétricos do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ em função do tempo de imersão do eletrodo de ouro em uma solução $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ BDT. Dados obtidos a partir dos resultados apresentados na Figura 21.

Tempo/ h	$\Delta E_p/ \text{ mV vs}$ Ag/AgCl/Cl ⁻	$R_{CT}/ 10^2 \Omega \text{ cm}^2$	θ	$k_{app}/ 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$
0	74	0,238	0	44,7
1	124	1,985	0,880	5,30
2	183	4,395	0,946	2,40
3	183	4,658	0,949	2,20
4	183	4,906	0,951	2,20

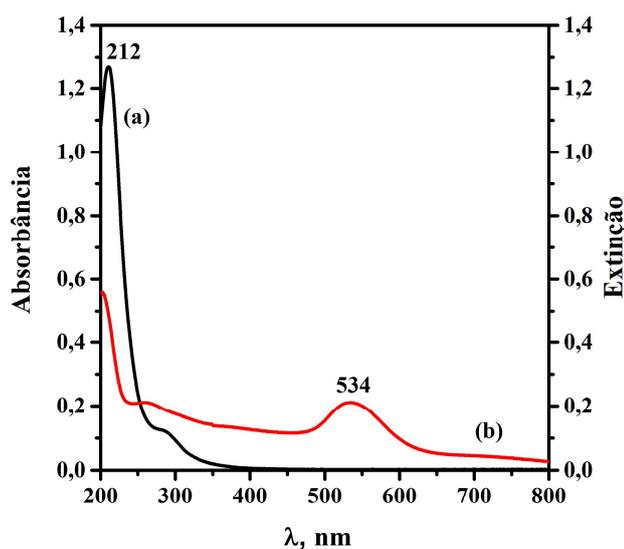
Os dados apresentados na Tabela 2 demonstram, claramente, um aumento do grau de recobrimento superficial e da resistência de transferência de carga com o aumento do tempo de imersão do eletrodo na solução de BDT. De acordo com a literatura [30,83,84], a interface de eletrodos modificados com alquiltióis com recobrimento superficial (θ) superior a 0,900, apresentam um bloqueio significativo à reação hTE sendo reportado valores de k_{app} da ordem de $10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$. Neste trabalho, os valores relativamente menores de k_{app} (5,3 a $2,2 \cdot 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$), são atribuídos ao efeito de bloqueio físico induzido pelo recobrimento das moléculas de BDT e à repulsão entre a densidade de carga negativa da SAM ($\text{pKa} = 3,6$) e os íons $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, tendo em vista que os experimentos foram obtidos em solução de pH 6,0. Ou seja, as espécies de BDT estão desprotonadas sobre a superfície do ouro. Ainda assim, a SAM do composto BDT não induz um bloqueio total à reação hTE. Isso, possivelmente, ocorre devido à presença de defeitos na monocamada (*pinholes*), que são resultantes do grau de organização das moléculas sobre a superfície e está relacionado ao parâmetro θ , e ao fenômeno de tunelamento, que é um

fenômeno quântico que está relacionado à distância entre a superfície e as espécies redox em solução [30,85]. Admitindo que as moléculas de BDT encontram-se em um arranjo totalmente perpendicular em relação à normal, a distância entre a superfície e os íons $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ em solução pode ser estimada em 6 Å, não considerando as camadas de solvatação. Dessa forma, tanto a presença de defeitos como o processo de tunelamento justificam a não observação de um bloqueio total à reação hTE em estudo [30,85].

4.5 Caracterização das AuNPs

O espectro de absorção eletrônica nas regiões do UV-Vis obtido para a solução coloidal de AuNPs em água encontra-se ilustrado na Figura 22 juntamente com o espectro da solução de HAuCl_4 para fins de comparação.

Figura 22 – Espectros de absorção eletrônica nas regiões do UV-Vis de uma solução $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de HAuCl_4 (a) e coloidal de AuNPs (b).



Comparativamente ao espectro da solução aquosa do sal de ouro (Figura 22, (a)), a observação da banda em 534 nm, atribuída aos plásmons do ouro (λ_{SPR}) [86], indica a formação das nanopartículas. Haiss e colaboradores desenvolveram uma relação entre os valores de λ_{SPR} das partículas de ouro e seus diâmetros, observando uma boa correlação entre os resultados experimentais e teóricos para AuNPs com o diâmetro médio (D_m) sendo $D_m \geq 25 \text{ nm}$ [87]. Essa relação foi satisfeita com a equação exponencial simulada, Equação (9) [87]:

$$\lambda_{\text{SPR}} = \lambda_0 + L_1 e^{(L_2 D_m)} \quad (9)$$

em que, $L_1 = 6,53$; $L_2 = 0,0216$ e $\lambda_0 = 512$ nm, são parâmetros de ajuste teórico. Rearranjando a Equação (9), obtém-se uma expressão para calcular o diâmetro médio das nanopartículas de ouro, representada na Equação (10):

$$D_m = \frac{\ln\left(\frac{\lambda_{SPR} - \lambda_0}{L_1}\right)}{L_2} \quad (10)$$

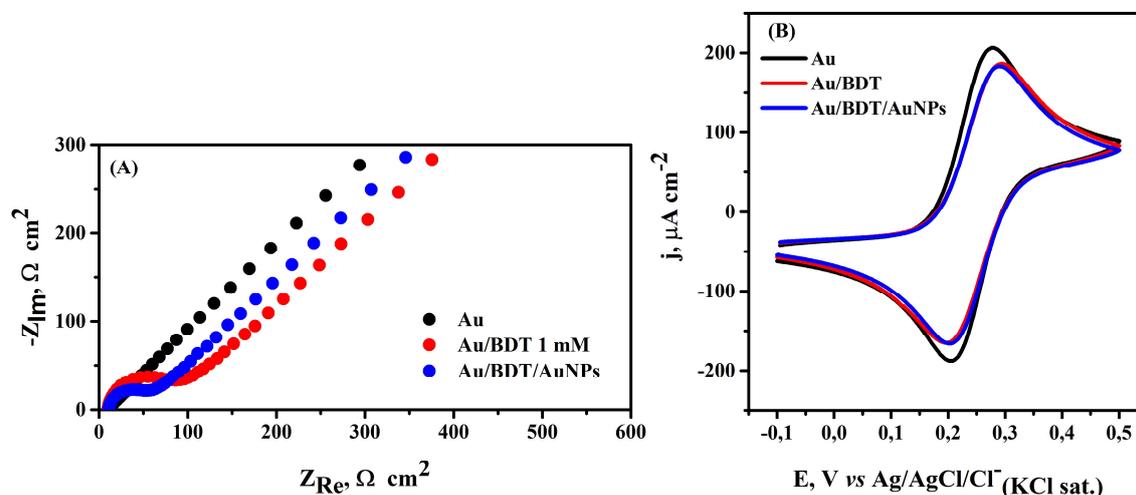
O diâmetro médio das nanopartículas sintetizadas foi determinado usando a Equação (10) e resultou em $56 \pm 3\%$ nm.

4.6 Incorporação das AuNPs sobre a SAM de 1,4-benzenoditiol

Após a caracterização eletroquímica e espectroscópica, o eletrodo Au/BDT foi imerso em uma solução aquosa coloidal de nanopartículas de ouro por 2 horas. É importante ressaltar que a solução de AuNPs apresenta pH ácido devido às espécies HAuCl_4 presentes que não reagiram. Dessa forma, espera-se que o grupo tiol terminal ($-\text{SH}$) das moléculas de BDT estejam protonados. O processo de incorporação das AuNPs foi monitorado por voltametria cíclica e impedância eletroquímica usando, novamente, o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$.

As AuNPs foram incorporadas em duas situações distintas. No primeiro caso (condição 1), o eletrodo de ouro foi modificado com uma solução $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de 1,4-benzenoditiol dissolvido em DMF (Au/BDT) e em seguida as AuNPs foram incorporadas (Au/BDT/AuNPs). Os resultados impedimétricos e voltamétricos são apresentados na Figura 23.

Figura 23 – (A) Diagramas de *Nyquist* e (B) Voltamogramas cíclicos a 100 mVs^{-1} do eletrodo de ouro (—) e dos eletrodos Au/BDT (—) e Au/BDT/AuNPs (—). Medidas realizadas em solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KF contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ à $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} \approx 6$.



A partir dos diagramas de *Nyquist*, é observado um aumento do semicírculo referente à resistência de transferência de carga (R_{CT}) entre eletrodo/solução de par redox após a formação da SAM de BDT sobre o ouro, sendo este comportamento já comentado anteriormente. Porém, quando as AuNPs são incorporadas, o R_{CT} diminui (Figura 23 (A) ●), indicando que a adição das nanopartículas de ouro forma uma camada condutora sobre a superfície Au/BDT facilitando a reação redox na interface. Além disso, os voltamogramas cíclicos mostrados na Figura 23 (B) corroboram com o comportamento eletroquímico observado na EIE. Os parâmetros eletroquímicos e impedimétricos, como variação de potencial de pico, R_{CT} e constante aparente de velocidade do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ são mostrados na Tabela 3. Os valores apresentados na Tabela 3 mostram que, após a incorporação das AuNPs, houve uma diminuição dos valores de ΔE_p e R_{CT} e aumento do valor de k_{app} em comparação ao eletrodo Au/BDT, indicando maior facilidade de ocorrência da reação de transferência de carga entre o eletrodo e as espécies redox ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$) presentes em solução. Esse comportamento experimental era esperado, visto que as nanopartículas metálicas podem agir como espécies condutoras elétricas [41,88,89].

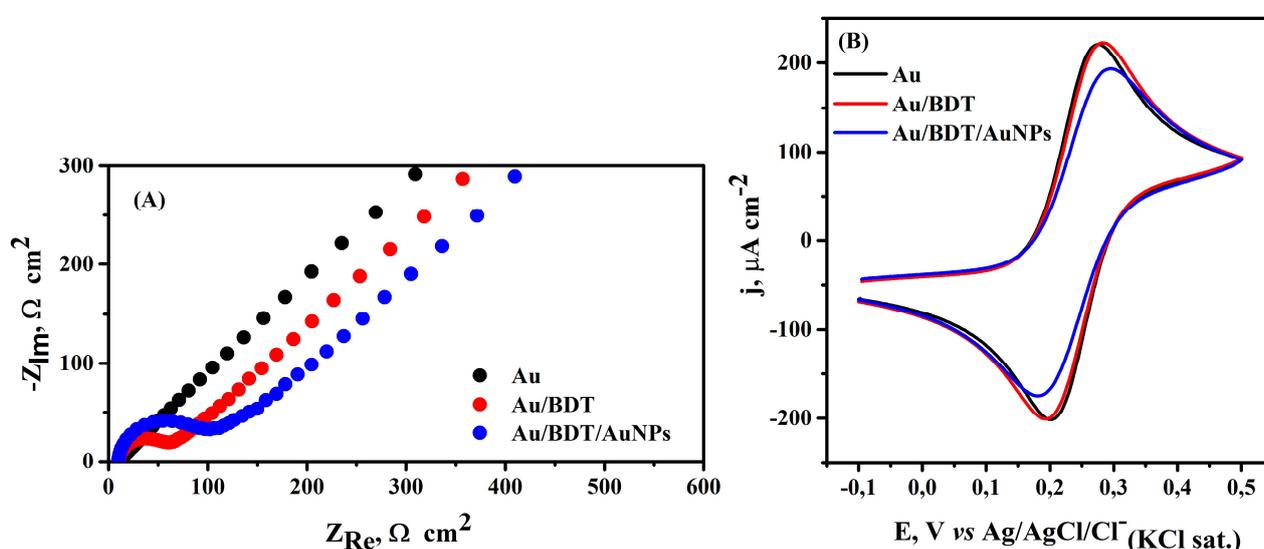
Tabela 3 – Parâmetros eletroquímicos e impedimétricos do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ em função da modificação do eletrodo de ouro. Condição 1 - dados obtidos a partir dos resultados apresentados na Figura 23; Condição 2 – dados obtidos a partir dos resultados apresentados na Figura 24.

Eletrodo	ΔE_p/ mV vs Ag/AgCl/Cl⁻	R_{CT}/ $\Omega \text{ cm}^2$	k_{app}/ $10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$
Condição 1			
Au	71	$6,4 \pm 1,5$	$17,3 \pm 4,8$
Au/BDT	101	$92,5 \pm 10,2$	$1,1 \pm 0,1$
Au/BDT/AuNPs	86	$61 \pm 10,8$	$1,8 \pm 0,3$
Condição 2			
Au	72	$6,2 \pm 0,1$	$17,3 \pm 0,3$
Au/BDT	86	$53,1 \pm 5,4$	$2,0 \pm 0,2$
Au/BDT/AuNPs	113	$98,0 \pm 12,0$	$1,1 \pm 0,1$

À medida que os experimentos foram repetidos, porém, foi observado que a solução de BDT $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em DMF apresentava mudança de coloração, saindo de amarelo claro límpido para branco turvo. Compostos sulfurados em solventes apróticos podem experimentar reações de equilíbrio tiol-dissulfeto [90]. Como o composto BDT possui dois grupos $-\text{SH}$ nas extremidades, possivelmente há a formação de agregados moleculares em solução. Diante

disso, foi necessário reduzir a concentração da solução usada para modificação, diminuindo para $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em DMF, além de, também, reduzir a temperatura em que ocorre o processo de adsorção para $15 \text{ }^\circ\text{C}$. Essa abordagem foi feita para minimizar e retardar a formação de agregados moleculares de BDT em solução e, conseqüentemente, de adsorver sobre o eletrodo de ouro. Portanto, foram realizados experimentos adicionais empregando-se a nova condição de modificação, permanecendo o tempo de 2 horas. Os resultados impedimétricos e voltamétricos obtidos nessa condição diferenciada estão ilustrados na Figura 24.

Figura 24 – (A) Diagramas de *Nyquist* e (B) Voltamogramas cíclicos a 100 mVs^{-1} do eletrodo de ouro (—) e dos eletrodos Au/BDT (—) e Au/BDT/AuNPs (—). Medidas realizadas em solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KF contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ à $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} \approx 6$.



O diagrama de *Nyquist* do eletrodo Au/BDT (Figura 24 (A) ●) apresentou um aumento de R_{CT} relativamente menor quando comparado aos experimentos anteriores (Figura 23 e Tabela 3 – Condição 1). Esse comportamento é esperado, visto que a concentração de BDT foi reduzida 10 vezes e o tempo de modificação permaneceu o mesmo. Assim, espera-se que uma menor quantidade de moléculas experimente adsorção dentro do mesmo intervalo de tempo. No voltamograma cíclico (Figura 24 (B)) é possível notar que quase não houve deslocamento dos potenciais de pico de oxidação e redução da espécie redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, corroborando com a observação de que menos moléculas de BDT se adsorveram, ou também a maior quantidade de defeitos na formação da SAM, resultando em um menor bloqueio efetivo para a ocorrência da reação hTE. Porém, quando as AuNPs foram incorporadas, os perfis impedimétricos e voltamétricos mudaram em comparação com o já visto em experimentos prévios. A imobilização das nanopartículas de ouro sobre a SAM de BDT resultou em um

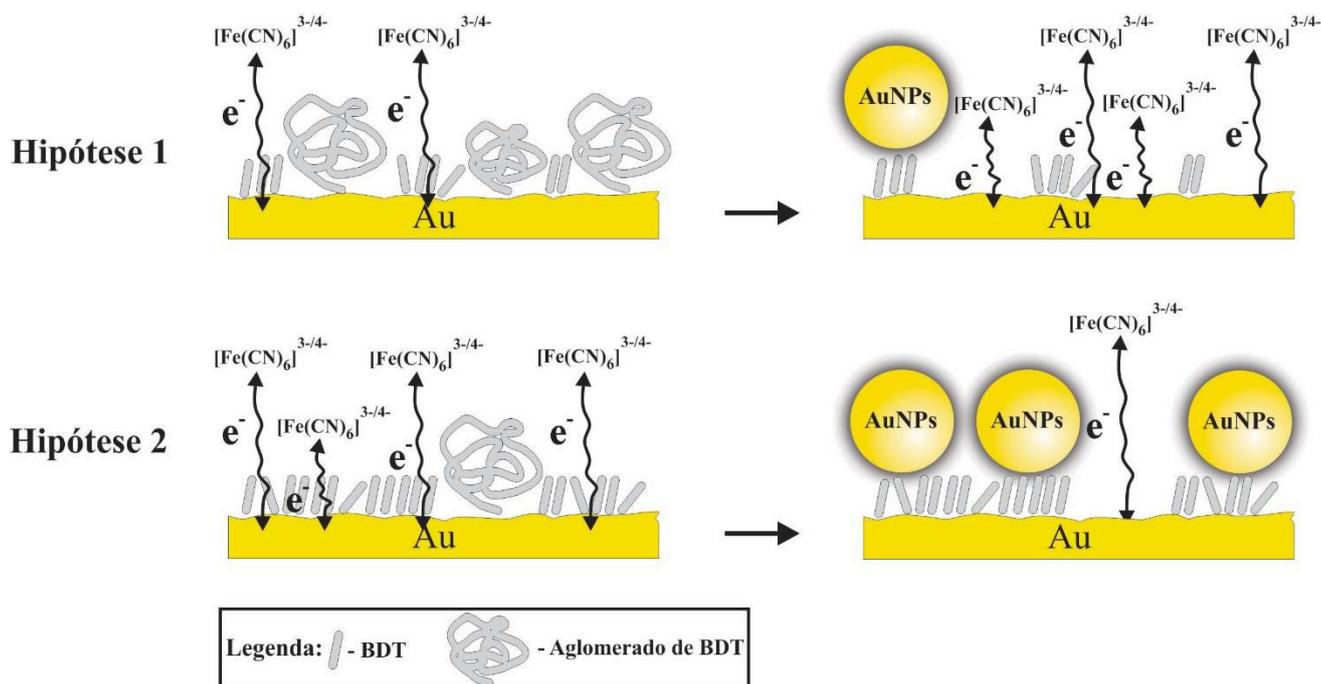
aumento do R_{CT} e da ΔE_p (valores mostrados na Tabela 3 – Condição 2) e diminuição da corrente faradáica referentes ao processo redox da espécie $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$.

Os valores de R_{CT} , ΔE_p e k_{app} indicam que as AuNPs imobilizadas atuam bloqueando a transferência de carga entre eletrodo/solução de par redox. Esse comportamento não foi observado na condição 1, mas se repetiu em todos os experimentos na condição 2. Duas hipóteses são sugeridas a seguir para tentar justificar esse comportamento:

Hipótese (I). Na condição 1 (BDT 1,0 mmol L⁻¹ em DMF), sugere-se a ocorrência de adsorção específica (via átomo de S) e não específica (agregados) de moléculas de BDT. Essa configuração resultaria em uma passivação parcial da superfície com conseqüente aumento do valor de R_{CT} (Figura 23 e Tabela 3 – Condição 1). Na etapa seguinte (imobilização das nanopartículas), a interação preferencial das AuNPs com o átomo de enxofre das moléculas de BDT adsorvidas sobre a superfície induziria a retirada dos aglomerados da interface aumentando a quantidade de poros na monocamada e facilitando, conseqüentemente, o acesso das moléculas de prova à superfície do eletrodo. A existência dos poros, portanto, justificaria a observação experimental de diminuição no valor de R_{CT} (Figura 23 e Tabela 3 – Condição 1).

Hipótese (II). Para a condição 2 (BDT 0,1 mmol L⁻¹ em DMF), sugere-se, majoritariamente, a ocorrência de adsorção específica (via átomo de S). Nesse caso, assume-se a formação de uma monocamada de BDT mais empacotada que resultaria em uma maior aproximação das nanopartículas de ouro e, conseqüentemente, em um aumento da densidade de carga negativa na interface (grupo citrato desprotonado). Considerando que as espécies redox em solução são aniônicas ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$), essa condição implica em aumento de repulsão justificando, assim, o aumento no valor R_{CT} (Figura 24 e Tabela 3 – Condição 2). Uma ilustração das hipóteses é representada na Figura 25.

Figura 25 – Ilustração genérica das hipóteses 1 e 2.



Fonte: Elaborado pelo autor. (Figura fora de escala)

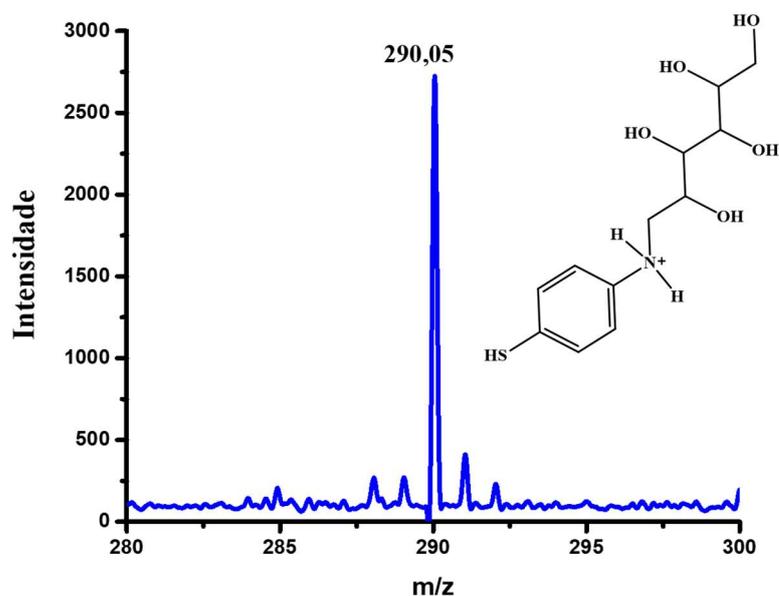
É importante ressaltar que os resultados impedimétricos e voltamétricos apresentados não são conclusivos. Portanto, são necessários estudos adicionais tanto para compreender a estrutura dos possíveis agregados moleculares formados em solução, como também para se validar uma das hipóteses sugeridas, utilizando, possivelmente, a técnica de SPR.

Ademais, tendo em vista a maior estabilidade da solução modificadora de BDT na condição 2, esta foi adotada para a continuação da construção da plataforma sensora para detecção da bactéria *E. coli*.

4.7 Caracterização 4-tiolbenzeno aminomanose – PTAM

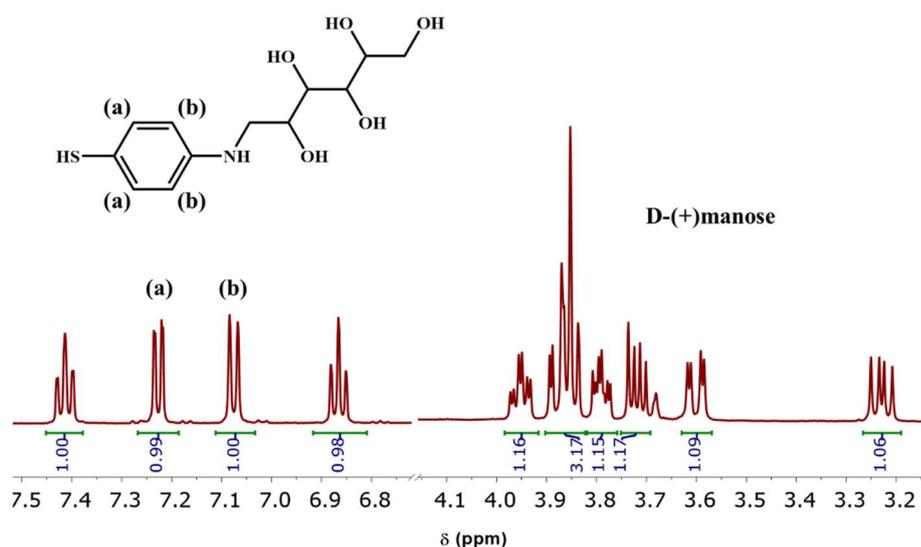
Após a síntese e purificação do composto PTAM obteve-se um sólido amarelo o qual foi analisado por espectroscopia de massa e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H). O espectro de massa da molécula PTAM, ilustrado na Figura 26, é consistente com os resultados publicados na literatura [18,91] indicando o sucesso no isolamento desta molécula. A relação massa/carga (m/z) 290,05 obtida no espectro está de acordo com a relação m/z 290,11 $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculada referente a espécie íon protonada $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{NO}_5\text{S}^+$. A massa molecular dessa substância é 289,10 g/mol.

Figura 26 – Espectro de massa da molécula PTAM ionizada ($C_{12}H_{20}NO_5S^+$).



O espectro de RMN 1H , apresentado na Figura 27, apresentou os sinais esperados em concordância com a literatura [18,91]. Os sinais situados na faixa de deslocamento químico (δ) de 3,35 até 4,00 ppm são referentes aos hidrogênios da ligação C—H presentes na porção da molécula derivada do açúcar D-(+)manose. As integrações desses sinais correspondem a um valor de 8 hidrogênios presentes na molécula, o que está de acordo com a estrutura apresentada. De acordo com o espectro de RMN 1H da D-(+)manose em D_2O reportado na literatura [18], o hidrogênio do carbono anomérico apresenta sinais em 4,93 e 5,21 ppm. Porém, ao formar o composto PTAM, esses sinais desaparecem, como esperado.

Figura 27 – Espectro de RMN H^1 a 500 MHz em 1:1 D_2O/CD_3COOD para o composto 4-tiolbenzeno aminomanose.

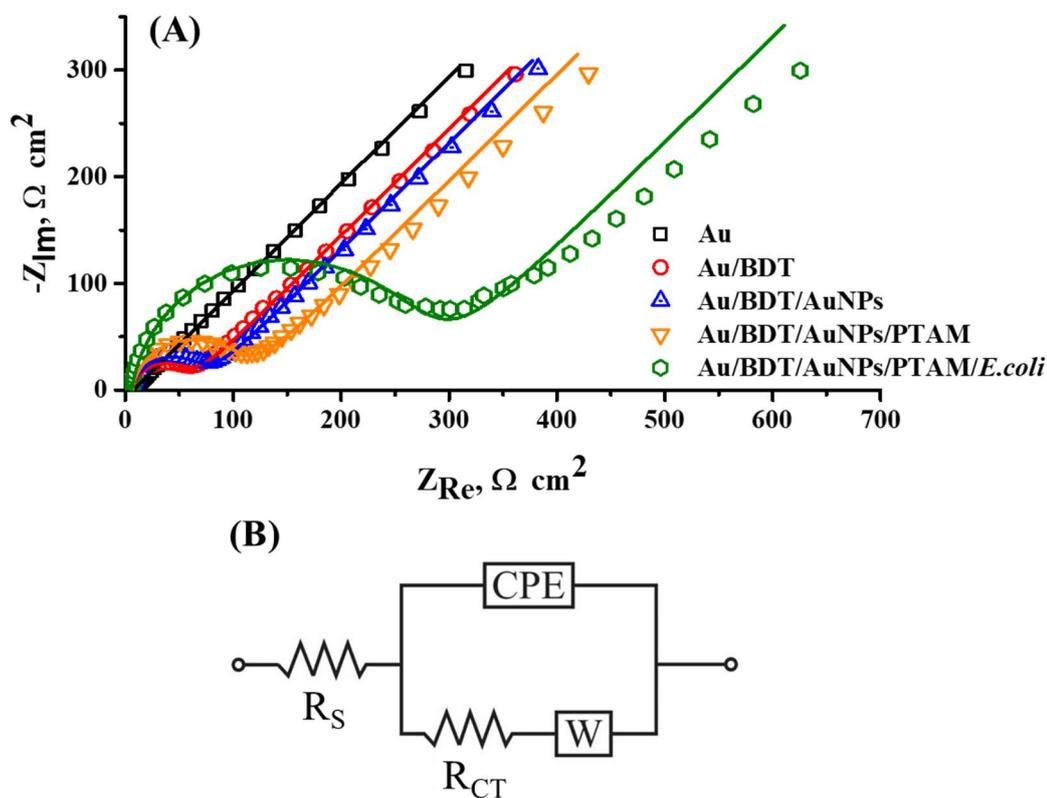


Os sinais em 7,09 e 7,24 ppm são referentes aos hidrogênios da porção fenólica do composto PTAM. Esses sinais são observados em 6,73 e 7,85 ppm na molécula de partida, 4,4'-ditiodianilina [18]. Tanto os deslocamentos químicos como as multiplicidades dos sinais estão de acordo com a estrutura e consistentes com os dados da literatura [18,91]. Por outro lado, o surgimento dos sinais em 6,85 e 7,43 ppm (tripletos), não guardam relação com os dados já publicados para o composto PTAM. A rotação livre da ligação que conecta o nitrogênio à porção do açúcar, porém, pode proporcionar uma conformação em que um hidrogênio das hidroxilas se acopla a um dos hidrogênios fenílicos, gerando um tripleto e justificando a observação desses sinais. As integrações dos sinais em 6,85 a 7,43 ppm sugerem a presença de 4H na porção fenólica da molécula PTAM, o que está de acordo com a sua estrutura. Dessa forma, os espectros ilustrados nas Figuras 25 e 26 são consistentes com os reportados na literatura [18,91], sugerindo que o composto PTAM foi sintetizado com êxito.

4.8 Funcionalização do eletrodo Au/BDT/AuNPs com a molécula PTAM e detecção da *Escherichia coli*

Após a síntese e a caracterização espectroscópica da molécula PTAM, ela foi empregada para a funcionalização do eletrodo Au/BDT/AuNPs. A sua imobilização ocorreu através da formação da ligação Au—S entre os átomos de ouro das nanopartículas e o átomo de enxofre (grupo cabeça) da molécula PTAM. A funcionalização desse eletrodo foi avaliada por técnicas eletroquímicas (VC e EIE) utilizando o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ como moléculas de prova. Os resultados obtidos estão representados na Figura 28.

Figura 28 – (A) Diagramas de *Nyquist* do eletrodo de ouro, Au/BDT, Au/BDT/AuNPs, Au/BDT/AuNPs/PTAM e Au/BDT/AuNPs/PTAM/*E.coli*. (B) Circuito equivalente para ajuste das curvas impedimétricas. Medidas realizadas em solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KF contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ à 25°C , $\text{pH} \approx 6$. Os símbolos correspondem aos resultados experimentais e as curvas sólidas aos resultados de ajuste teórico com o circuito equivalente.



Os diagramas de *Nyquist* ilustrados na Figura 28 mostram que a funcionalização das AuNPs com a espécie PTAM ocasionou o aumento do valor R_{CT} entre eletrodo/solução contendo espécies redox ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$). Esse comportamento era esperado visto que as moléculas de PTAM atuam como mais uma barreira física bloqueando a transferência de carga. Após a construção completa da plataforma sensora (Au/BDT/AuNPs/PTAM), o eletrodo foi imerso em uma suspensão de bactérias *E. coli* ($2,6 \times 10^7$ UFC/mL). O diagrama de *Nyquist* obtido após a imobilização das bactérias (diagrama verde na Figura 28 (A)) indica um aumento do valor de R_{CT} devido à imobilização das bactérias sobre o eletrodo, formando Au/BDT/AuNPs/PTAM/*E.coli*. Essa imobilização das células ocorreu através das interações intermoleculares existentes entre a espécie PTAM e as proteínas lectinas presentes na superfície da bactéria. A Figura 28 (B) ilustra o circuito equivalente de Randles usado para ajustar os resultados experimentais onde, além do elemento R_{CT} , são incluídos a resistência da solução (R_S) e os elementos de constante de fase (CPE) e difusional de Warburg (W). Esses componentes de circuito foram associados à cada camada de modificação do eletrodo de ouro

de maneira a conferir valor físico a cada elemento. Os ajustes não-lineares utilizando esse circuito são apresentados como linhas sólidas nos diagramas de *Nyquist* apresentados na Figura 28 (A) e os valores dos elementos de circuito são mostrados na Tabela 4. É importante ressaltar que o circuito de Randles é retratado, geralmente, utilizando um capacitor (C) referente à formação da dupla camada elétrica (C_{dl}) ao invés do CPE. Entretanto, os sistemas eletroquímicos fogem da idealidade e o componente CPE é utilizado por melhor representar a região interfacial (eletrodo/solução) de um sistema não homogêneo. O elemento de constante de fase é representado por $Z_{CPE} = Q(j\omega)^{-\alpha}$, em que Z_{CPE} é a impedância do CPE, Q é o parâmetro CPE, j é a unidade imaginária, ω é a frequência angular e α é um valor que representa o quão próximo de um capacitor ideal o sistema se encontra, em que $\alpha = 1$ indica um capacitor ideal [92].

Tabela 4 – Elementos de circuito ajustados às respostas impedimétricas da Figura 28 (A).

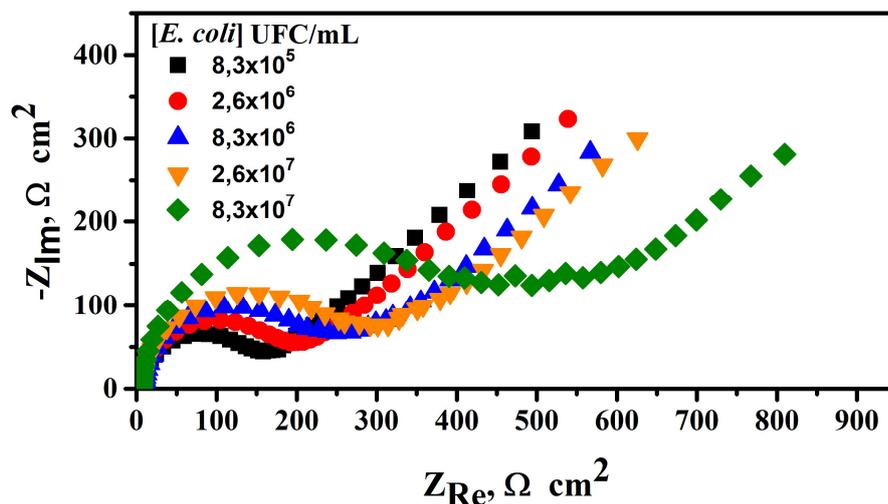
Eletrodo	OCP/ V vs Ag/AgCl/Cl⁻	Rs (E%)/ Ω cm²	R_{CT} (E%)/ Ω cm²	CPE 10⁵ (E%)	α (E%)	W (E%) Ω s^{-0,5}
Au	0,241	7,00 (0,2)	2,25 (1,8)	21,85 (3,4)	0,93 (0,5)	93,70 (0,3)
Au/BDT	0,243	6,68 (0,6)	50,00 (0,5)	8,13 (0,8)	0,94 (0,1)	92,82 (0,7)
Au/BDT/AuNPs	0,245	6,07 (1,0)	63,50 (0,8)	6,84 (1,0)	0,94 (0,1)	95,00 (1,2)
Au/BDT/AuNPs/PTAM	0,245	6,34 (1,8)	99,80 (1,2)	6,45 (1,8)	0,93 (0,3)	96,74 (2,4)
Au/BDT/AuNPs/PTAM/ <i>E.coli</i>	0,246	6,02 (3,7)	265,91 (2,8)	5,63 (2,6)	0,92 (0,4)	104,71 (6,6)

A partir dos dados resumidos na Tabela 4, podemos destacar os parâmetros R_{CT} , que aumenta à medida que mais espécies químicas são imobilizadas sobre o eletrodo de ouro, e da componente de Warburg, que está relacionada ao processo de difusão das espécies redox $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ dentro da dupla camada elétrica (DCE). De acordo com os valores de W , é possível aferir que a modificação consecutiva do eletrodo de ouro com espécies passivadoras dificulta a difusão das espécies eletroativas pela DCE.

Assim, para verificar a sensibilidade da plataforma sensora desenvolvida (Au/BDT/AuNPs/PTAM), o eletrodo foi imerso em diferentes suspensões de *E. coli* na faixa de concentração de $8,3 \times 10^5$ a $8,3 \times 10^7$ UFC/mL por 1 hora. Após o período de captura das

células de bactéria, o eletrodo Au/BDT/AuNPs/PTAM/*E.coli* foi caracterizado utilizando a técnica EIE. Os resultados impedimétricos encontram-se ilustrados na Figura 29.

Figura 29 – Diagramas de Nyquist do eletrodo Au/BDT/AuNPs/PTAM/*E.coli* em diferentes concentrações de *E. coli* em solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ e NaCl 1 g L⁻¹. Medidas impedimétricas realizadas em solução 0,5 mol L⁻¹ de KF contendo [Fe(CN)₆]^{4-/3-} 2,5 mmol L⁻¹ à 25°C, pH ≈ 6.



Os diagramas de *Nyquist* ilustrados na Figura 29 evidenciam que o aumento da concentração de bactérias no meio ocasiona o aumento do valor de R_{CT} referente à reação heterogênea de transferência de carga eletrodo/solução de par redox, como mostrado na Tabela 6. Esse comportamento impedimétrico é esperado pois, quanto maior a quantidade de *E. coli* no meio, mais células irão interagir com a espécie PTAM na superfície do eletrodo, dificultando a transferência de carga entre o ouro e os ânions [Fe(CN)₆]^{4-/3-}. Além dos valores de R_{CT} , a Tabela 5 também mostra os valores calculados de k_{app} .

Tabela 5 – Parâmetros impedimétricos do par redox [Fe(CN)₆]^{4-/3-} em função da modificação do eletrodo Au/BDT/AuNPs/PTAM em diferentes concentrações de *E. coli*. Dados obtidos a partir dos resultados apresentados na Figura 29.

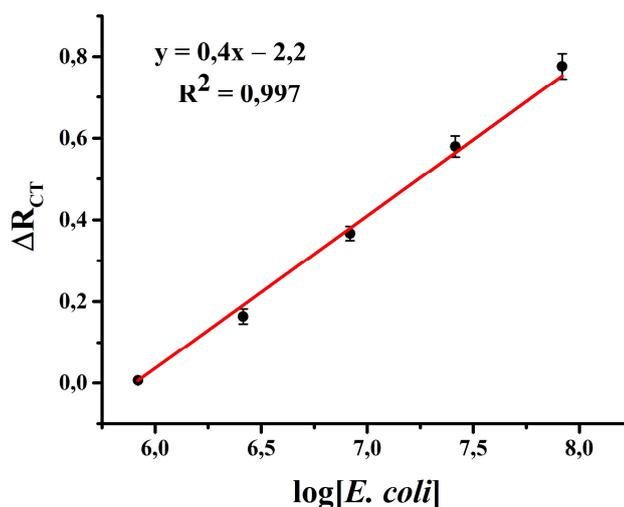
Au/BDT/AuNPs/PTAM/ <i>E.coli</i>		
Concentração de <i>E. coli</i> no meio/ UFC/mL	$R_{CT}/ \Omega \text{ cm}^2$	$k_{app}/ 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$
8,3 x 10 ⁵	145,04	7,3
2,6 x 10 ⁶	178,53	6,0
8,3 x 10 ⁶	227,92	4,8
2,6 x 10 ⁷	265,91	4,0
8,3 x 10 ⁷	431,42	2,5

A partir dos diagramas de *Nyquist* obtidos em diferentes concentrações da bactéria *E. coli* (Figura 28) foi possível construir uma curva de calibração para esse sistema, ilustrado na Figura 30, em que se correlaciona a variação dos valores de R_{CT} (ΔR_{CT}) do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ com o logaritmo da concentração de *E. coli* ($\log[E. coli]$). Os valores da ΔR_{CT} são calculados de acordo com a Equação 11:

$$\Delta R_{CT} = \frac{R_{CT(E.coli)} - R_{CT(sensor)}}{R_{CT(E.coli)}} \quad (11)$$

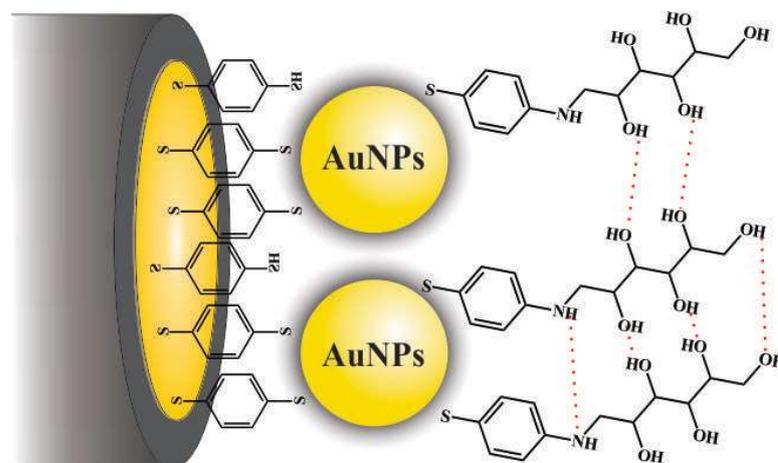
em que $R_{CT(E.coli)}$ e $R_{CT(sensor)}$ são os valores R_{CT} associados aos eletrodos Au/BDT/AuNPs/PTAM/*E.coli* e Au/BDT/AuNPs/PTAM, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata e o erro encontra-se indicado nas barras em cada ponto da curva ilustrada na Figura 30.

Figura 30 – Curva de calibração do eletrodo Au/BDT/AuNPs/PTAM em resposta à variação de concentração da *E. coli* no meio. Gráfico de ΔR_{CT} vs $\log[E. coli]$ ($n = 3$). O símbolo (●) corresponde ao resultado experimental e a linha sólida (—) ao ajuste linear dos pontos.



Através do ajuste linear dos resultados experimentais, representado pela linha sólida em vermelho, a equação da reta determinada é $y = 0,4x - 2,2$, sendo $R^2 = 0,997$, indicando boa correlação entre os dados experimentais e a linha de regressão ajustada. Dessa forma, com base nas orientações de validação de métodos analíticos fornecido pelo INMETRO [93] e com a curva de calibração, o limite de detecção (LOD) do método desenvolvido nesse projeto é $8,0 \times 10^5$ UFC/mL. Comparando com os trabalhos já publicados na literatura (Tabela 1 – seção 1.5), a plataforma sensora desenvolvida (Au/BDT/AuNPs/PTAM) apresentou alto LOD. Uma possível explicação para isso é a forte interação intermolecular existente entre as espécies PTAM, como ilustrado na Figura 31.

Figura 31 – Proposta de configuração do eletrodo Au/BDT/AuNPs/PTAM ressaltando as ligações de hidrogênio entre as espécies PTAM imobilizadas sobre as nanopartículas de ouro.



Fonte: Elaborado pelo autor. (Figura fora de escala)

Para ocorrer a interação entre o PTAM e a proteína lectina, é necessário que a porção D-manose esteja disponível o que, possivelmente, está ocorrendo em baixa escala ou não está ocorrendo. Uma maneira de otimizar essa plataforma sensora seria a utilização de uma camada mista de moléculas adsorvidas sobre as nanopartículas de ouro [21,48]. A camada mista tem o objetivo de intercalar as espécies PTAM, diminuindo as ligações de hidrogênio laterais existentes (interação intermolecular mais forte que ocorre nessa situação) e disponibilizando a porção do açúcar para interagir com a lectina presente na bactéria *E. coli*. Além disso, uma outra hipótese para o alto valor de LOD do sistema diz respeito ao método de modificação da plataforma sensora com a bactéria. O eletrodo Au/BDT/AuNPs/PTAM é imerso em uma suspensão contendo a *E. coli*, em que as células são seres na ordem do micrômetro ($2\ \mu\text{m} \times 0,5\ \mu\text{m}$) com massa de, aproximadamente, $1 \times 10^{-12}\ \text{g}$ [94]. Isso significa que as células têm a tendência de se depositarem no fundo do *ependorf* dificultando o contato com as espécies PTAM na superfície do eletrodo.

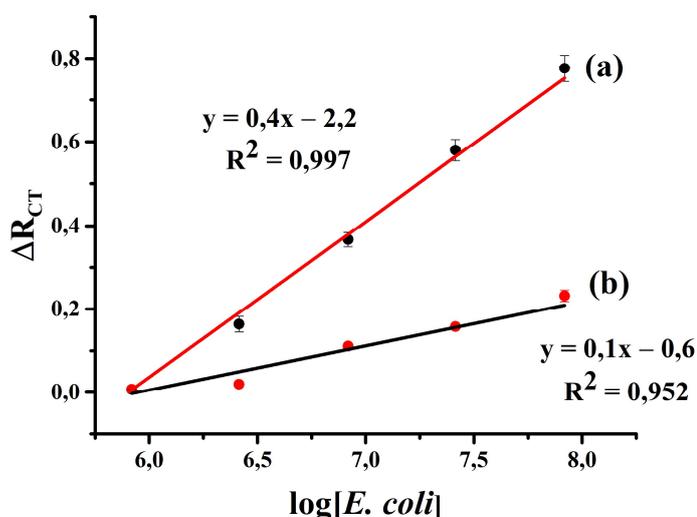
Apesar das explicações apresentadas, é importante ressaltar que alguns trabalhos da literatura (Tabela 1 – seção 1.5) utilizam imunossensores para detecção de *E. coli*, baseados na interação específica antígeno-anticorpo [29,50,51]. Esse tipo de sistema é extremamente específico, o que proporciona um menor limite de detecção. Porém, uma desvantagem desses sistemas é o elevado custo da plataforma sensora, em especial do anticorpo utilizado como biorreceptor, imobilizado sobre o biossensor. Dependendo do fabricante, o preço dos anticorpos utilizados para detecção de *E. coli* podem variar de R\$ 2000,00 a R\$ 4000,00, sendo o volume da alíquota vendida de $100\ \mu\text{L} - 1\ \text{mL}$ [95–97]. Devido a isso, é crescente o desenvolvimento

de plataformas sensoras alternativas para a detecção da bactéria *E. coli* que utilizem sistemas de reconhecimento mais baratos, como o apresentado nesse projeto. Os preços dos principais reagentes utilizados estão apresentados na Tabela 7 situada nos anexos (seção 7.1).

4.9 Sensibilidade analítica

A fim de avaliar a sensibilidade analítica da plataforma sensora proposta neste trabalho (Au/BDT/AuNPs/PTAM), construiu-se a plataforma Au/PTAM, sendo o biorreceptor (PTAM) diretamente imobilizado sobre a superfície do substrato de ouro pela formação da ligação Au—S. Assim, foi plotada uma curva de calibração para essa nova plataforma, indicada na Figura 32. As curvas em (a) e (b) da Figura 32 são, respectivamente, do eletrodo Au/BDT/AuNPs/PTAM e do eletrodo Au/PTAM em resposta à interação com a bactéria *E. coli*.

Figura 32 – Comparação das curvas de calibração dos eletrodos (a) Au/BDT/AuNPs/PTAM e (b) Au/PTAM em resposta à variação de concentração da *E. coli* no meio. Gráfico de ΔR_{CT} vs $\log[E. coli]$ ($n = 3$). Os símbolos (●) e (●) correspondem aos resultados experimentais e as linhas sólidas (—) e (—) ao ajuste linear dos pontos.



Esse estudo foi realizado a fim de avaliar como a incorporação de nanopartículas de ouro na superfície aumentam a sensibilidade analítica do sensor. De acordo com as curvas (a) e (b) da Figura 32, podemos observar que quando se tem AuNPs a curva de calibração possui uma maior inclinação (coeficiente angular), o que indica maior sensibilidade da calibração. Isso acontece devido ao aumento da razão superfície/volume com a incorporação das AuNPs, em que mais moléculas de PTAM são imobilizadas sobre a plataforma sensora, possibilitando a maior captura das células de *E. coli*. Em contrapartida, quando as moléculas de PTAM são adsorvidas sobre a superfície do eletrodo de ouro limpo, formando uma monocamada

automontada (Au/PTAM), devido a menor quantidade de sítios ativos de adsorção estarem disponíveis, menos espécies são adsorvidas, o que impacta diretamente no grau de interação e imobilização das células bacterianas. O LOD para a plataforma Au/PTAM é de $8,8 \times 10^6$ UFC/mL, o que é 11 vezes menor do que o LOD do eletrodo Au/BDT/AuNPs/PTAM.

5 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que as moléculas de 1,4-benzenoditiol (BDT) adsorvidas sobre eletrodo de ouro formam uma monocamada automontada (SAM, Au/BDT). Por meio da correlação entre os espectros SERS e Raman normal, particularmente em relação aos modos de deformação e estiramento da ligação S–H (910 cm^{-1}), foi possível afirmar que o processo de adsorção ocorreu através de um dos átomos de enxofre, formando a ligação Au–S. A reação de eletrodo atribuída à redução dessa ligação, foi observada em $-0,88\text{ V vs Ag/AgCl/Cl}^-$ (potencial de dessorção redutiva, E_{dr}) por voltametria de varredura linear em meio alcalino. O valor de E_{dr} indica que as moléculas se encontram covalentemente ligadas aos átomos de ouro da superfície (processo de quimissorção). Além disso, a partir da onda de redução, pôde-se determinar a quantidade de espécies adsorvidas, sendo $33,1 \times 10^{-10}\text{ mol cm}^{-2}$. O valor de pKa da SAM de BDT foi calculado em $3,60 \pm 0,39$ a partir da correlação entre os valores de corrente faradáica do íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em solução, obtidos por voltametria cíclica (VC), e as concentrações das espécies protonada e desprotonada da SAM. A partir de experimentos de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) para o eletrodo Au/BDT em solução contendo os íons complexos $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, foram obtidos os seguintes parâmetros impedimétricos: resistência de transferência de carga (R_{CT}), grau de recobrimento (θ) e constantes de velocidade aparente (k_{app}). As medidas de EIE obtidas para eletrodos de ouro modificados após diferentes tempos de imersão em solução de BDT, indicaram um aumento nos valores de R_{CT} com o aumento do tempo de imersão até se atingir um patamar de saturação da superfície após 2h. Para esse tempo de imersão, os valores de θ e k_{app} resultaram em 0,951 e $2,20 \times 10^{-4}\text{ cm s}^{-1}$, respectivamente. O espectro de absorção eletrônica nas regiões do UV-Vis da solução coloidal das nanopartículas de ouro (AuNPs) sintetizadas apresentou uma banda com máximo em 534 nm atribuída ao plásmon do ouro. Para este valor de comprimento de onda, a correlação com parâmetros teóricos indicou um diâmetro médio (D_m) de 56 nm. A incorporação das AuNPs sobre o eletrodo Au/BDT foi feita por imersão (2h) formando a superfície Au/BDT/AuNPs. Essa nova superfície foi caracterizada por SERS, VC e EIE. Comparando-se os espectros SERS dos eletrodos Au/BDT e Au/BDT/AuNPs, houve um aumento do sinal de espalhamento Raman quando as AuNPs estão presentes, provavelmente, devido a formação de *hot spots*. Esse resultado é um indicativo de que as nanopartículas de ouro estão incorporadas sobre o BDT através da formação da ligação dos fragmentos tíois aos substratos de ouro, atuando como uma ponte entre o eletrodo e as AuNPs. As curvas voltamétricas e os diagramas de *Nyquist* obtidos para a superfície Au/BDT/AuNPs

em solução contendo os íons complexos $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ indicaram que quando utilizada a solução de BDT $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ para modificação, a ΔE_p e o valor de R_{CT} para o eletrodo Au/BDT/AuNPs aumentaram, indicando que as AuNPs (estabilizadas com íons aniônicos de citrato) atuaram dificultando a transferência de carga entre o eletrodo de ouro e a solução de par redox ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$). O espectro de massa do composto PTAM sintetizado indicou a relação massa/carga (m/z) 290,05, estando de acordo com a relação m/z 290,11 $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculada referente a espécie íon protonada $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{NO}_5\text{S}^+$. A massa molecular dessa substância é 289,10 g/mol. Ademais, o espectro de RMN apresentou sinais que corroboraram para a elucidação da estrutura da molécula. A adsorção do composto PTAM sobre as AuNPs foi avaliado por SERS, VC e EIE. Comparativamente, os espectros SERS do composto PTAM sólido e do PTAM adsorvido sobre as AuNPs, apresentaram um perfil similar, sendo um indicativo que a espécie derivada da D-manose está funcionalizando as nanopartículas de ouro. As curvas voltamétricas e os diagramas de *Nyquist* obtidos para a superfície Au/BDT/AuNPs/PTAM em solução contendo o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ indicaram aumento da ΔE_p e do valor de R_{CT} , evidenciando que o composto PTAM atua como uma espécie passivadora na superfície do eletrodo. A interação/captura das células de *E. coli* foi caracterizada por EIE. Os diagramas de *Nyquist* obtidos ilustraram que a imobilização da bactéria na superfície da plataforma sensora indicou o aumento do valor de R_{CT} do íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. A partir dos resultados impedimétricos obtidos após imersão em suspensões de diferentes concentrações de *E. coli* (*[E. coli]*), foi plotado uma curva de calibração, em que utilizou a variação de R_{CT} (ΔR_{CT}) do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ como parâmetro para determinar, quantitativamente, as bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) pelo eletrodo Au/BDT/AuNPs/PTAM. Através do gráfico de ΔR_{CT} vs $\log[\text{E. coli}]$ foi determinado o limite de detecção (LOD) em $8,0 \times 10^5$ UFC/mL. Além disso, foi plotado uma curva de calibração semelhante para o eletrodo Au/PTAM, indicando que para esse sistema o LOD para a *E. coli* foi de $8,8 \times 10^6$ UFC/mL, o que é 11 vezes menor do que o eletrodo Au/BDT/AuNPs/PTAM. Isso evidencia o aumento da sensibilidade do sensor quando utiliza nanopartículas de ouro sobre a plataforma.

REFERÊNCIAS

1. Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance. No Time to Wait: Securing the Future from Drug-Resistant Infections. *Artforum International*, 2019.
2. AMIRI, M.; BEZAATPOUR, A.; JAFARI, H.; BOUKHERROUB, R.; SZUNERITS, S. Electrochemical methodologies for the detection of pathogens. *ACS Sensors*, v. 3, p. 1059–1086, 2018.
3. FURST, A. L.; FRANCIS, M. B. Impedance-Based Detection of Bacteria. *Chemical Reviews*, v. 119, p. 700–726, 2018.
4. CESEWSKI, E.; JOHNSON, B. N. Electrochemical biosensors for pathogen detection. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 159, p. 112214, 2020.
5. EJEIAN, F. *et al.* Biosensors for wastewater monitoring : A review. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 118, p. 66–79, 2018.
6. FELIX, F. S.; ANGNES, L. Electrochemical immunosensors – A powerful tool for analytical applications. *Biosensors and Bioelectronic*, v. 102, p. 470–478, 2018.
7. RUBAB, M.; SHAHBAZ, H. M.; OLAIMAT, A. N.; OH, D. H. Biosensors for rapid and sensitive detection of Staphylococcus aureus in food. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 105, p. 49–57, 2018.
8. SILVA, N. F. D.; NEVES, M. M. P. S.; MAGALHÃES, J. M. C. S.; FREIRE, C.; DELERUE-MATOS, C. Emerging electrochemical biosensing approaches for detection of *Listeria monocytogenes* in food samples : An overview. *Trends in Food Science & Technology*, v. 99, p. 621–633, 2020.
9. RIU, J.; GIUSSANI, B. Electrochemical biosensors for the detection of pathogenic bacteria in food. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 126, p. 115863, 2020.
10. MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D. *Microbiologia de Brock*, 12. ed., Porto Alegre: Artmed. (2010).
11. THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. *Pure and Applied Chemistry*, v. 71, p. 2333–2348, 1999.
12. ENSAFI, A. A. *Chapter 1 - An introduction to sensors and biosensors. Electrochemical Biosensors* (Elsevier Inc., 2019). doi:10.1016/B978-0-12-816491-4.00001-2.
13. SANDHYARANI, N. *Surface modification methods for electrochemical biosensors. Electrochemical Biosensors* (Elsevier Inc., 2019). doi:10.1016/B978-0-12-816491-4.00003-6.
14. ÖNDEŞ, B.; AKPINAR, F.; UYGUN, M.; MUTI, M.; AKTAŞ UYGUN, D. High stability potentiometric urea biosensor based on enzyme attached nanoparticles. *Microchemical Journal*, v. 160, 2021.

15. HAN, E. *et al.* Electrochemical immunosensor based on self-assembled gold nanorods for label-free and sensitive determination of *Staphylococcus aureus*. *Analytical Biochemistry*, v. 611, p. 113982, 2020.
16. DAS, R.; GOEL, A. K.; SHARMA, M. K.; UPADHYAY, S. Electrochemical DNA sensor for anthrax toxin activator gene atxA-detection of PCR amplicons. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 74, p. 939–946, 2015.
17. CARR, O. *et al.* Genosensor made with a self-assembled monolayer matrix to detect MGMT gene methylation in head and neck cancer cell lines. *Talanta*, v. 210, p. 120609, 2020.
18. YAZGAN, I.; NOAH, N. M.; TOURE, O.; ZHANG, S.; SADIK, O. A. Biosensor for selective detection of *E. coli* in spinach using the strong affinity of derivatized mannose with fimbrial lectin. *Biosensors and Bioelectronics* v. 61, p. 266–273, 2014.
19. ABRANTES-COUTINHO, V. E. *et al.* Systematic review on lectin-based electrochemical biosensors for clinically relevant carbohydrates and glycoconjugates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* v. 208, 2021.
20. SILVA, A. G.; LIMA-NETO, R. G.; ANDRADE, C. A. S.; SANDRA, R. S.; OLIVEIRA, M. D. L. Lectin-based impedimetric biosensor for differentiation of pathogenic candida species. *Talanta* v. 220, p. 121375, 2020.
21. YANG, H.; ZHOU, H.; HAO, H.; GONG, Q.; NIE, K. Detection of *Escherichia coli* with a label-free impedimetric biosensor based on lectin functionalized mixed self-assembled monolayer. *Sensors & Actuators: B. Chemical* v. 229, p. 297–304, 2016.
22. SIMÃO, E. P. *et al.* Nanostructured impedimetric lectin-based biosensor for arboviruses detection. *Talanta* v. 208, p. 120338, 2020.
23. SOUTO, D. E. P.; VOLPE, J.; GONÇALVES, C. D. C.; RAMOS, C. H. I.; KUBOTA, L. T. A brief review on the strategy of developing SPR-based biosensors for application to the diagnosis of neglected tropical diseases. *Talanta* v. 205, p. 120122, 2019.
24. ZHOU, J. *et al.* Surface plasmon resonance (SPR) biosensors for food allergen detection in food matrices. *Biosensors and Bioelectronics* v.142, p. 111449, 2019.
25. POHANKA, M. The piezoelectric biosensors: Principles and applications, a review. *International Journal of Electrochemical Science* v. 12, p. 496–506, 2017.
26. POHANKA, M. Immunoassay of interferon gamma by quartz crystal microbalance biosensor. *Talanta* v. 218, p. 121167, 2020.
27. MOBED, A. *et al.* Advances in detection of fastidious bacteria: From microscopic observation to molecular biosensors. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* v. 113, p. 157–171, 2019.

28. ABREU, D. S. *et al.* SAM of Gliotoxin on Gold: A Natural Product Platform for Sugar Recognition based on the Immobilization of *Canavalia brasiliensis* lectin (ConBr). *Electrochimica Acta* v. 241, p. 116–123, 2017.
29. LIN, D.; PILLAI, R. G.; LEE, W. E.; JEMERE, A. B. An impedimetric biosensor for *E. coli* O157:H7 based on the use of self-assembled gold nanoparticles and protein G. *Microchimica Acta* v. 186, p. 1–9, 2019.
30. GANESH, V.; PAL, S. K.; KUMAR, S.; LAKSHMINARAYANAN, V. Self-assembled monolayers (SAMs) of alkoxyphenyl thiols on gold - A study of electron transfer reaction using cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. *Journal of Colloid and Interface Science* v. 296, p. 195–203, 2006.
31. ULMAN, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chemical Review* v. 96, p. 1533–1554, 1996.
32. LOVE, J. C.; ESTROFF, L. A.; KRIEBEL, J. K.; NUZZO, R. G.; WHITESIDES, G. M. *Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. Chemical Reviews* v. p. 105, 2005.
33. SMITH, R. K.; LEWIS, P. A.; WEISS, P. S. Patterning self-assembled monolayers. *Progress in Surface Science* v. 75, p. 1–68, 2004.
34. ROMO, A. I. B. *et al.* Ascorbyl and hydroxyl radical generation mediated by a copper complex adsorbed on gold. *Dalton Transactions* v. 48, p. 14128–14137, 2019.
35. DE F. PAULO, T.; ABRUÑA, H. D.; DIÓGENES, I. C. N. Thermodynamic, kinetic, surface pKa, and structural aspects of self-assembled monolayers of thio compounds on gold. *Langmuir* v. 28, p. 17825–17831, 2012.
36. PAULO, T. DE F.; ANDO, R. A.; DIÓGENES, I. C. N.; TEMPERINI, M. L. A. Understanding the Equilibria of Thio Compounds Adsorbed on Gold by Surface-Enhanced Raman Scattering and Density Functional Theory Calculations. *Journal of Physical Chemistry C*, v. 117, p. 6275–6283, 2013.
37. KO, S.; PRASAD, A. R.; PK, J.; JOSEPH, A. Development of self-assembled monolayer of stearic acid grafted chitosan on mild steel and inhibition of corrosion in hydrochloric acid. *Chemical Data Collections*, v. 28, p. 100402, 2020.
38. LEE, I. *et al.* The electrochemical behavior of a FAD dependent glucose dehydrogenase with direct electron transfer subunit by immobilization on self-assembled monolayers. *Bioelectrochemistry*, v. 121, p. 1–6, 2018.
39. ALEXANDRE, D. L. *et al.* A Rapid and Specific Biosensor for Salmonella Typhimurium Detection in Milk. *Food and Bioprocess Technology*, v. 11, p. 748–756, 2018.
40. SUZUKI, S. *et al.* Effect of the Molecule-Metal Interface on the Surface-Enhanced Raman Scattering of 1,4-Benzenedithiol. *Journal of Physical Chemistry C*, v. 120, p. 1038–1042, 2016.

41. LIU, G.; LUAIS, E.; GOODING, J. J. The fabrication of stable gold nanoparticle-modified interfaces for electrochemistry. *Langmuir*, v. 27, p. 4176–4183, 2011.
42. ARVIZO, R. R. *et al.* Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: Past, present and future. *Chemical Society Reviews*, v. 41, p. 2943–2970, 2012.
43. RAMALINGAM, V. Multifunctionality of gold nanoparticles: Plausible and convincing properties. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 271, p. 101989, 2019.
44. PENGO, P. *et al.* Gold nanoparticles with patterned surface monolayers for nanomedicine: current perspectives. *European Biophysics Journal*, v. 46, p. 749–771, 2017.
45. SAHA, K.; AGASTI, S. S.; KIM, C.; LI, X.; ROTELLO, V. M. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. *Chemical Reviews*, v. 112, p. 2739–2779, 2012.
46. SZTANDERA, K.; GORZKIEWICZ, M.; KLAJNERT-MACULEWICZ, B. Gold Nanoparticles in Cancer Treatment. *Molecular Pharmaceutics*, v. 16, p. 1–23, 2019.
47. YEH, Y. C.; CRERAN, B.; ROTELLO, V. M. Gold nanoparticles: Preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale*, v. 4, p. 1871–1880, 2012.
48. GUO, X. *et al.* Carbohydrate-based label-free detection of escherichia coli ORN 178 using electrochemical impedance spectroscopy. *Analytical Chemistry*, v. 84, p. 241–246, 2012.
49. MA, F. *et al.* Glycosylation of Quinone-Fused Polythiophene for Reagentless and Label-Free Detection of E. coli. *Analytical Chemistry*, v. 87, p. 1560, 2015.
50. JIJIE, R. *et al.* Sensors and Actuators B : Chemical Reduced graphene oxide / polyethylenimine based immunosensor for the selective and sensitive electrochemical detection of uropathogenic Escherichia coli. *Sensors & Actuators: B. Chemical*, v. 260, p. 255–263, 2018.
51. VU, Q. K. *et al.* A label-free electrochemical biosensor based on screen-printed electrodes modified with gold nanoparticles for quick detection of bacterial pathogens. *Materials Today Communications*, v. 26, p. 101726, 2021.
52. ZENG, X.; ANDRADE, C. A. S.; OLIVEIRA, M. D. L.; SUN, X. L. Carbohydrate-protein interactions and their biosensing applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 402, p. 3161–3176, 2012.
53. OFEK, I.; BEACHEY, E. H. Mannose binding and epithelial cell adherence of Escherichia coli. *Infection and Immunity*, v. 22, p. 247–254, 1978.
54. HARTMANN, M.; LINDHORST, T. K. The bacterial lectin FimH, a target for drug discovery - Carbohydrate inhibitors of type 1 fimbriae-mediated bacterial adhesion.

European Journal of Organic Chemistry, p. 3583–3609, 2011.
doi:10.1002/ejoc.201100407.

55. TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, v. 11, p. 55–75, 1951.
56. FRENS, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature Physical Science*, v. 241, p. 20–22, 1973.
57. BRUCKENSTEIN, S.; SHAY, M. An in situ weighing study of the mechanism for the formation of the adsorbed oxygen monolayer at a gold electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 188, p. 131–136, 1985.
58. TRASATTI, S.; PETRII, O. Real Surface Area Measurements in Electrochemistry. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 327, p. 353–376, 1992.
59. BURKE, L. D.; NUGENT, P. F. The electrochemistry of gold: I. The redox behaviour of the metal in aqueous media. *Gold Bulletin*, v. 30, p. 43–53, 1997.
60. TOOLE, G. A. O. Classic Spotlight : Plate Counting You Can Count On. *Journal of Bacteriology*, v. 198, p. 3127, 2016.
61. SALA, O. *Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho*. (Editora Unesp, 2008).
62. DUMOUILLA, V.; DUSSAP, C. G. Online analysis of D-glucose and D-mannose aqueous mixtures using Raman spectroscopy: an in silico and experimental approach. *Bioengineered*, v. 12, p. 4420–4431, 2021.
63. RUGGIERO, L.; SODO, A.; BRUNI, F.; RICCI, M. A. Hydration of monosaccharides studied by Raman scattering. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 49, p. 1066–1075, 2018.
64. WELLS, H. A.; ATALLA, R. H. An investigation of the vibrational spectra of glucose, galactose and mannose. *Journal of Molecular Structure*, v. 224, p. 385–424, 1990.
65. CHO, S. H.; HAN, H. S.; JANG, D. J.; KIM, K.; KIM, M. S. Raman spectroscopic study of 1,4-benzenedithiol adsorbed on silver. *Journal of Physical Chemistry*, v. 99, p. 10594–10599, 1995.
66. SHAO, Y.; LI, C.; FENG, Y.; LIN, W. Surface-enhanced Raman scattering and density functional theory study of 1,4-benzenedithiol and its silver complexes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 116, p. 214–219, 2013.
67. LIM, J. K.; KWON, O.; JOO, S. W. Interfacial Structure of 1,3-benzenedithiol and 1,3-benzenedimethanethiol on silver surfaces: surface-enhanced raman scattering study and theoretical calculations. *Journal of Physical Chemistry C*, v. 112, p. 6816–6821, 2008.

68. JOO, S. W.; HAN, S. W.; KIM, K. Adsorption of 1,4-benzenedithiol on gold and silver surfaces: Surface-enhanced Raman scattering study. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 240, p. 391–399, 2001.
69. SAIKIN, S. K.; OLIVARES-AMAYA, R.; RAPPOPORT, D.; STOPA, M.; ASPURU-GUZIK, A. On the chemical bonding effects in the Raman response: Benzenethiol adsorbed on silver clusters. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 11, p. 9401–9411, 2009.
70. MOSKOVITS, M.; SUH, J. S. Surface selection rules for surface-enhanced Raman spectroscopy: Calculations and application to the surface-enhanced Raman spectrum of phthalazine on silver. *Journal of Physical Chemistry*, v. 88, p. 5526–5530, 1984.
71. JAIN, P. K.; EL-SAYED, M. A. Plasmonic coupling in noble metal nanostructures. *Chemical Physics Letters*, v. 487, p. 153–164, 2010.
72. SCHLÜCKER, S. Surface-enhanced raman spectroscopy: Concepts and chemical applications. *Angewandte Chemie - International Edition*, v. 53, p. 4756–4795, 2014.
73. TIAN, Z. Q.; REN, B.; WU, D. Y. Surface-enhanced Raman scattering: From noble to transition metals and from rough surfaces to ordered nanostructures. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 106, p. 9463–9483, 2002.
74. GARDNER, A. M.; WRIGHT, T. G. Consistent assignment of the vibrations of monosubstituted benzenes. *Journal of Chemical Physics*, v. 135, p. 1–18, 2011.
75. SUN, M.; XIA, L.; CHEN, M. Self-assembled dynamics of silver nanoparticles and self-assembled dynamics of 1,4-benzenedithiol adsorbed on silver nanoparticles: Surface-enhanced Raman scattering study. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 74, p. 509–514, 2009.
76. WALCZAK, M. M. *et al.* Reductive Desorption of Alkanethiolate Monolayers at Gold: A Measure of Surface Coverage. *Langmuir*, v. 7, p. 2687–2693, 1991.
77. SUN, K.; JIANG, B.; JIANG, X. Electrochemical desorption of self-assembled monolayers and its applications in surface chemistry and cell biology. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 656, p. 223–230, 2011.
78. OZOEMENA, K. I.; NYOKONG, T. Electrocatalytic oxidation and detection of hydrazine at gold electrode modified with iron phthalocyanine complex linked to mercaptopyrindine self-assembled monolayer. *Talanta*, v. 67, p. 162–168, 2005.
79. HALE, P. S.; MADDOX, L. M.; SHAPTER, J. G.; GOODING, J. J. Surface pK_a of Self-Assembled Monolayers. *Journal of Chemical Education*, v. 82, p. 779–781, 2005.
80. ZHAO, J.; LUO, L.; YANG, X.; WANG, E; DONG, S. Determination of Surface pK_a of SAM Using an Electrochemical Titration Method. *Electroanalysis*, v. 11, p. 1108–1113, 1999.

81. HARRIS, D. *Quantitative Chemical Analysis*. New York: W. H. Freeman and Company, 2010.
82. MENDES, R. K.; FREIRE, R. S.; FONSECA, C. P.; NEVES, S.; KUBOTA, L. T. Characterization of Self-Assembled Thiols Monolayers on Gold Surface by Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 15, p. 849–855, 2004.
83. SABATANI, E.; RUBINSTEIN, I. Organized self-assembling monolayers on electrodes. 2. Monolayer-based ultramicroelectrodes for the study of very rapid electrode kinetics. *Journal of Physical Chemistry*, v. 91, p. 6663–6669, 1987.
84. SABATANI, E.; RUBINSTEIN, I.; MAOZ, R.; SAGIV, J. Organized self-assembling monolayers on electrodes. Part I. Octadecyl derivatives on gold. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 219, p. 365–371, 1987.
85. LIU, B.; BARD, A. J.; MIRKIN, M. V.; CREAGER, S. E. Electron Transfer at Self-Assembled Monolayers Measured by Scanning Electrochemical Microscopy. *Journal of the American Chemical Society*, v. 126, p. 1485–1492, 2004.
86. LINK, S.; EL-SAYED, M. A. Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 103, p. 4212–4217, 1999.
87. HAISS, W.; THANH, N. T. K.; AVEYARD, J.; FERNIG, D. G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Analytical Chemistry*, v. 79, p. 4215–4221, 2007.
88. CEA, P. *et al.* Nanofabrication and Electrochemical Characterization of Self-Assembled Monolayers Sandwiched between Metal Nanoparticles and Electrode Surfaces. *Journal of Chemical Education*, v. 93, p. 1441–1445, 2016.
89. SHEIN, J. B.; LAI, L. M. H.; EGGERS, P. K.; PADDON-ROW, M. N.; GOODING, J. J. Formation of Efficient Electron Transfer Pathways by Adsorbing Gold Nanoparticles to Self-Assembled Monolayer Modified Electrodes. *Langmuir*, v. 25, p. 11121–11128, 2009.
90. SINGH, R.; WHITESIDES, G. M. Thiol-disulfide interchange. *The Chemistry of Sulphur-Containing Functional Groups*, p. 633–658, 2010
doi:10.1002/9780470034408.ch13.
91. JEONG, H. S. *et al.* Facile and rapid direct gold surface immobilization with controlled orientation for carbohydrates. *Bioconjugate Chemistry*, v. 18, p. 2197–2201, 2007.
92. ORAZEM, M. E.; TRIBOLLET, B. *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, 2008.
93. INMETRO, I. N. D. M. N. E. Q. I. –. *ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS*. (2020).

94. PRESS, N. A. *Size Limits of Very Small Microorganisms. Size Limits of Very Small Microorganisms*, 1999. doi:10.17226/9638.
95. Goat E. coli Polyclonal Antibody. Disponível em:
<https://www.mybiosource.com/polyclonal-antibody/e-coli/324064>. Acesso em: 29 jan. 2022.
96. Mouse E. Coli Monoclonal Antibody. Disponível em:
<https://www.mybiosource.com/monoclonal-antibody/e-coli/4159288#PP1>. Acesso em: 29 jan. 2022.
97. E.coli O157:H7 Polyclonal Antibody. Disponível em:
<https://www.thermofisher.com/antibody/product/E-coli-O157-H7-Antibody-Polyclonal/BS-1563R>. Acesso em: 29 jan. 2022.

ANEXO A – TABELA DE ATRIBUIÇÕES

Tabela 6 – Valores de deslocamentos Raman (cm^{-1}) dos compostos BDT e PTAM no estado sólido, dos eletrodos Au/BDT, Au/BDT/AuNPs e Au/BDT/AuNPs/PTAM e da suspensão coloidal funcionalizada com a molécula PTAM (AuNPs/PTAM). $\lambda_0 = 632,8 \text{ nm}$.

Raman normal/ cm^{-1}		SERS/ cm^{-1}				Atribuições	Referências
BDT	PTAM	Au/BDT	Au/BDT/AuNPs	AuNPs/PTAM	Au/BDT/AuNPs/PTAM		
	442			409		δ (CCC), (CCO) (CCH))	62–64
	464				472		62–64
	489						62–64
				545	539		62–64
630				674		ν (C–S);	40,67
736		735	729		733	ν (C–S)	40
910						β (C–SH)	40,65,67,68
1059	1035	1058	1063	1029	1063	X-Sensível	40
1093		1077				$[\nu$ (C=C) + ν (C–S)]	
1185	1162	1178	1173	1164	1175	δ (C–H) + ν (C–C)	40,66
1574	1568	1565	1561	1561	1563	ν (C=C) + ν (C–N)	40,62–64
	1593			1577			

ν – estiramento; β – deformação angular; γ – deformação simétrica no plano; δ – deformação assimétrica no plano.

ANEXO B – PREÇO DOS PRINCIPAIS REAGENTES

Tabela 7 – Preço dos principais reagentes utilizados nesse projeto.

Reagente (Sigma-Aldrich)	Preço (R\$)	Código	Quantidade
1,4-benzenoditiol	804,00	763969	1 g
Ácido áurico	1249,00	254169	500 mg
Citrato de sódio	350,00	S4641	1 kg
D-(+)-manose	233,00	M8574	25 g
4,4'-ditiodianilina	659,00	369462	5 g
Dimetilamina borano	505,00	180238	25 g