

UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Instituto de Química de Araraquara

*Desenvolvimento de Biossensores Capacitivos Constituídos de Monocamadas  
Peptídicas Nanometricamente Estruturadas*

*Júlia Pinto Piccoli*

**Dissertação de Mestrado**  
**2015**

Júlia Pinto Piccoli

*Desenvolvimento de Biossensores Capacitivos Constituídos de Monocamadas Peptídicas Nanometricamente Estruturadas*

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno

Araraquara

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

P591d	<p>Piccoli, Júlia Pinto</p> <p>Desenvolvimento de biossensores capacitivos constituídos de monocamadas peptídicas nanometricamente estruturadas / Júlia Pinto Piccoli. – Araraquara : [s.n], 2015 69 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Eduardo Maffud Cilli Coorientador: Paulo Roberto Bueno</p> <p>1. Peptídeos. 2. Biossensores. 3. Ferroceno. 4. Análise eletroquímica. 5. Espectroscopia de impedância. I. Título</p>
-------	--

JÚLIA PINTO PICCOLI

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Araraquara, 27 de fevereiro de 2015.

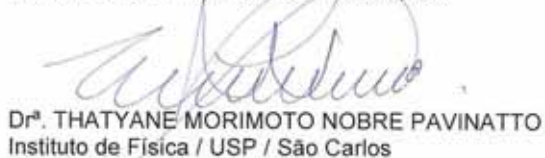
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. EDUARDO MAFFUD CILLI (Orientador)  
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Prof. Dr. SAULO SANTESSO GARRIDO  
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Dr<sup>a</sup>. THATYANE MORIMOTO NOBRE PAVINATTO  
Instituto de Física / USP / São Carlos

## **Dedicatória**

Dedico esse trabalho a minha família e amigos ...

## **Agradecimentos**

Agradeço em primeiro lugar a minha família, pelo apoio, incentivo e amor.

Ao meu orientador, Eduardo Maffud Cilli, que me concedeu o benefício de poder fazer parte desse grupo de laboratório, me ensinou, teve paciência comigo e além de ser um excelente profissional, tornou-se um amigo.

Ao meu co-orientador, Paulo Roberto Bueno, que me incentivou desde o começo a realizar esse trabalho, me ajudou a superar minhas dificuldades e muito me incentiva com seu conhecimento.

Aos meus colegas e amigos de laboratório, em especial ao Norival e Esteban, que me deram a base para que eu crescesse confiante nessa jornada.

Aos integrantes do Departamento de Bioquímica, em especial prof Dr. Reinaldo Marchetto, e Prof. Dr Saulo Santesso Garrido, pelo apoio.

Ao meu segundo grupo de pesquisa: Nanobionics, que me acolheram desde o começo nesse novo caminho, em especial ao Adriano Santos, que muito me ajudou.

A todos os técnicos e funcionários que colaboram para que a pesquisa ocorra em nossos laboratórios.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos” (Isaac Newton, 1687).

## Resumo

O diagnóstico precoce desempenha um papel importante no sucesso do tratamento da maioria das doenças. O desenvolvimento de dispositivos “label free” aliados às técnicas eletroanalíticas permite o desenvolvimento de métodos rápidos e de baixo custo para avaliar o estágio de doenças e/ou a eficácia do tratamento. Biossensores redox capacitivos foram recentemente introduzidos como uma plataforma de ensaios eletroanalíticos com grande potencial para o desenvolvimento deste tipo de dispositivo. No presente trabalho foram sintetizados peptídeos marcados com uma sonda redox, no caso o ferroceno (fc), capazes de formarem monocamadas auto-organizadas em interfaces metálicas, para utilização em ensaios de diagnósticos. Os peptídeos de sequências: Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(fc)-Ala-Ala-COOH e Fc-Lys-Ala-Ala-Cys-NH<sub>2</sub>, foram sintetizados em fase sólida de modo que: 1) a cadeia lateral do resíduo de cisteína foi ligada covalentemente ao eletrodo de ouro (grupo enxofre); 2) a extremidade C-terminal ou a cadeia lateral do resíduo de Lys foram responsáveis, individualmente, pelo acoplamento do anticorpo anti-CRP; 3) a cadeia lateral do resíduo de Lys ou a extremidade N-terminal foram utilizadas, individualmente, para fixar o grupo ferroceno na cadeia peptídica. Apesar das sínteses terem mostrado dificuldade, os peptídeos puderam ser obtidos com sucesso. Após a fixação do peptídeo contendo ferroceno ao ouro, o anticorpo, que identifica a proteína C-reativa, foi acoplado ao sistema. A proteína C-reativa é importante, pois age como um biomarcador de processos inflamatórios e doenças cardiovasculares. Técnicas eletroquímicas como voltametria cíclica, espectroscopia de impedância e capacitância eletroquímica foram utilizadas para a caracterização do sistema e para a determinação da ligação da proteína ao anticorpo. O sistema desenvolvido utilizando a capacitância foi eficaz na detecção da proteína C-reativa, apresentando limites de detecção de 0,8 nmol L<sup>-1</sup> e 0,31 nmol L<sup>-1</sup> para os peptídeos Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(fc)-Ala-Ala-COOH e Fc-Lys-Ala-Ala-Cys-NH<sub>2</sub>, respectivamente, e sinal redox capacitivo estável. Deste modo, o número de aminoácidos no peptídeo que forma a monocamada, mostrou ter correlação com a sensibilidade do detector. Este resultado mostrou que este sistema pode ser utilizado no desenvolvimento de dispositivos “label free” com alta sensibilidade e especificidade.

Palavras-chave: Peptídeos. Sonda redox. Monocamadas auto-organizadas. Biossensores. Espectroscopia de Capacitância Eletroquímica



## Abstract

Early diagnosis plays an important role in the successful treatment of diseases. The development of "label free" devices, coupled with the electroanalytical techniques allows the development of low cost and fast methods for evaluating the stage of disease and/or treatment efficacy. Redox capacitive biosensors have recently been introduced as a platform of electroanalytical assays with great potential for the development of this type of device. In this study peptides labeled with a redox probe, in the case ferrocene (fc), were synthesized capable to form self-assembled monolayers on metal interfaces for use in diagnostic assays. The sequences of peptides: Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(fc)-Ala-Ala-Fc-COOH and Lys-Ala-Cys-NH<sub>2</sub> were synthesized on solid phase: 1) the side chain of the cysteine residue is covalently bound to the gold electrode (sulfur group); 2) the C-terminal or side chain of Lys accounted individually by coupling the anti-CRP; 3) the side chain of Lys or the N-terminal were used individually to fix the ferrocene group in the peptide chain. Despite the syntheses have shown difficulty, the peptides were successfully obtained. After peptide attachment to gold containing ferrocene, the antibody which identifies C-reactive protein, was attached to the system. C-reactive protein is important because it is a biomarker of inflammation and cardiovascular disease. Electrochemical techniques such as cyclic voltammetry, electrochemical impedance and capacitance spectroscopy were used to characterize the system and determinate the protein binding to the antibody. The system was developed using the capacitance to detect C-reactive protein, detection limits of 0.8 nmol L<sup>-1</sup> and 0.31 nmol L<sup>-1</sup> were found for the peptides Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(fc)-Ala-Ala-Fc-COOH and Fc-Lys-Ala-Ala-Cys-NH<sub>2</sub>, respectively, and stable redox capacitive signal. Thus, the number of amino acids that forms the monolayer has shown a correlation with the sensitivity of the detector. This result showed that this system can be used in developing of "label free" devices with high sensitivity and specificity.

Keywords: Peptides. Probe redox. Self-assembled Monolayers. Biosensors. Electrochemical Capacitance Spectroscopy

## Lista de Figuras

- Figura 1:** Dados estatísticos das dez principais causas de morte no mundo do ano de 2012. \_17
- Figura 2:** Abordagem de um biossensor eletroquímico: biomolécula receptiva imobilizada na monocamada auto-organizada, a qual possui uma sonda redox, em um eletrodo de ouro modificado, para detecção do alvo de interesse. \_\_\_\_\_ 22
- Figura 3:** Representação elétrica de uma monocamada auto-organizada (SAM) contendo sonda redox, com um anticorpo imobilizado para detecção. A impedância interfacial de uma superfície receptiva utilizada para biossensoriamento é representada por  $Z_i$  e a resistência da solução por  $R_s$ . Ao lado, o circuito elétrico equivalente capaz de modelar o biossensor redox capacitivo. 23
- Figura 4:** Representação da variação da capacitância redox ( $C_r$ ) quando ocorre ligação de um alvo. Esta variação pode ser facilmente determinada a partir do menor valor de capacitância imaginária após a obtenção do semicírculo. \_\_\_\_\_ 23
- Figura 5:** Ilustração do potencial de meia onda da monocamada ( $E_r$ ) acoplado com o nível de energia do eletrodo, ocorrendo assim a troca de elétrons responsável pelo sinal mensurável da capacitância. \_\_\_\_\_ 24
- Figura 6:** Ilustração da reação que ocorre durante o acoplamento do aminoácido. \_\_\_\_\_ 27
- Figura 7:** Reação que ocorre durante o teste de ninidrina. \_\_\_\_\_ 28
- Figura 8:** Esquema da Síntese de Peptídeos em Fase Sólida. \_\_\_\_\_ 29
- Figura 9:** Estrutura da Fmoc-Lys(Mtt), em destaque o grupamento metiltritil (Mtt) e o grupamento Fmoc protegendo a cadeia lateral e a principal, respectivamente. \_\_\_\_\_ 29
- Figura 10:** Estrutura química do anidrido 3-ferrocenilpropionico \_\_\_\_\_ 34
- Figura 11:** Espectro de massas referente ao peptídeo Ac-Cys-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-COOH, massa molar de  $575,3 \text{ g mol}^{-1}$  \_\_\_\_\_ 35
- Figura 12:** Perfil Cromatográfico referente ao peptídeo bruto Ac-Cys-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-COOH, com tempo de retenção de 5,3 min (Coluna Analítica Fase Reversa C18, 4,6 mm x 150 mm, Ultrasphere Phenomenex com fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 220 nm, 5  $\mu\text{m}$ , 300 Å, programa gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 min). \_\_\_\_\_ 35
- Figura 13:** LC-MS referente ao peptídeo Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(Fc)-Ala-Ala-COOH. Massa Molar de  $816,3 \text{ g mol}^{-1}$  (coluna C8, 2 x 30 mm, 5-95% solvente B em 10 min). \_\_\_\_\_ 37

**Figura 14:** Perfil cromatográfico do peptídeo bruto em vermelho Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(Fc)-Ala-Ala-COOH, e puro em preto, com grau de pureza de 91%. Tempo de retenção do peptídeo de interesse de 14,3 min (Coluna Analítica Fase Reversa C18, 4,6 mm x 150 mm, Ultrasphere Phenomenex com fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 220 nm, 5 µm, 300 Å, programa gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 min). \_\_\_\_\_ 37

**Figura 15:** Perfil cromatográfico do peptídeo bruto em vermelho Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(Fc)-Ala-Ala-COOH. Perfil cromatográfico do peptídeo puro em preto com 91% de pureza. O pico referente ao peptídeo é o de 14,3 min (Coluna Analítica Fase Reversa C18, 4,6 mm x 150 mm, Ultrasphere Phenomenex com fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 220 nm, 5 µm, 300 Å, programa gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 min). \_\_\_\_\_ 39

**Figura 16:** LC-MS do peptídeo bruto Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(Fc)-Ala-Ala-COOH. Acoplamento de 1 h e clivagem com solução [1] (coluna C8, 2 x 30 mm, 5-95% B em 10 min). \_\_\_\_\_ 40

**Figura 17:** LC-MS do peptídeo bruto Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(Fc)-Ala-Ala-COOH. Condição de acoplamento de 1 h e clivado com solução [2] (coluna C8, 2 x 30 mm, 5-95% B em 10 min) \_\_\_\_\_ 40

**Figura 18:** LC-MS do peptídeo bruto Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(Fc)-Ala-Ala-COOH, clivado com solução [1] (coluna C8, 2 x 30 mm, 5-95% B em 10 min). O valor apresentado acima do pico corresponde a massa molar do material em g mol<sup>-1</sup>. \_\_\_\_\_ 41

**Figura 19:** LC-MS do peptídeo bruto Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(Fc)-Ala-Ala-COOH, clivado com solução [3] (coluna C8, 2 x 30 mm, 5-95% B em 10 min). O valor apresentado acima do pico corresponde a massa molar do material em g mol<sup>-1</sup>. \_\_\_\_\_ 42

**Figura 20:** LC-MS do peptídeo bruto Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(Fc)-Ala-Ala-COOH, clivado com solução [4] (coluna C8, 2 x 30 mm, 5-95% B em 10 min). O valor apresentado acima do pico corresponde a massa molar do material em g mol<sup>-1</sup>. \_\_\_\_\_ 42

**Figura 21:** LC-MS do peptídeo bruto Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(Fc)-Ala-Ala-COOH. Condição de retirada do Mtt realizada com 1% de TFA em DCM (coluna C8, 2 x 30 mm, 5-95% B em 10 min). O valor apresentado acima do pico corresponde a massa molar do material em g mol<sup>-1</sup> \_\_\_\_\_ 44

**Figura 22:** Perfil cromatográfico do peptídeo Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(Fc)-Ala-Ala-COOH - 99% de pureza. Condição de retirada do Mtt realizada com 1% de TFA em DCM (Coluna Analítica Fase Reversa C18, 4,6 mm x 150 mm, Ultrasphere Phenomenex com fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 220 nm, 5 µm, 300 Å, programa gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 min). \_\_\_\_\_ 46

**Figura 23:** Esquema do desenvolvimento do biossensor formado por: eletrodo de ouro funcionalizado, monocamada auto-organizada peptídica contendo a sonda redox e anticorpo imobilizado para detecção do alvo de interesse (proteína C reativa). \_\_\_\_\_ 47

**Figura 24:** Voltametria cíclica (VC) do peptídeo ativo redox. As linhas potencial de meia onda e “redox out” indicam as regiões onde a espectroscopia de capacitância eletroquímica (ECE) foi realizada, como descrito em Materiais e Métodos. Nota-se a presença de picos catódicos e anódicos na curva do peptídeo (vermelho), que estão ausentes na análise de ouro. As medições foram realizadas a uma velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$  com potencial de 0,0 a 0,7 V (V x Ag | AgCl), utilizando  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  de solução  $\text{TBAClO}_4$  como eletrólito suporte. \_\_\_\_\_ 48

**Figura 25:** Representação esquemática da distância teórica entre duas cadeias peptídicas,  $\sim 13 \text{ \AA}$ . Este valor foi estimado considerando o comprimento da cadeia lateral de Lys na forma linear e contendo a sonda redox. (b) Espaçamento de duas cadeias alcanotiol em uma SAM,  $\sim 5 \text{ \AA}$ , de acordo com Ulman et al. 1989 \_\_\_\_\_ 49

**Figura 26:** Curva de Nyquist para dados de impedância do peptídeo ligado a anti-CRP em superfície de ouro, para várias concentrações do alvo CRP \_\_\_\_\_ 50

**Figura 27:** Curva de Nyquist para dados de capacitância do peptídeo eletroativo com anti-CRP funcionalizado em superfície de ouro, para várias concentrações de CRP. \_\_\_\_\_ 51

**Figura 28:** Curva analítica obtida a partir da curva de Nyquist para dados de capacitância. A resposta linear é obtida traçando o inverso de  $\Delta Cr$  ( $1/\Delta Cr = 1/Cr, [\text{CRP}] - 1/Cr$ , branco, onde  $1/Cr$ , branco é o inverso da capacitância do biossensor depois de exposto à solução de PBS sem alvo), contra o logaritmo da concentração de CRP. O ajuste da regressão linear foi de 98%. Os dados foram obtidos no potencial de meia onda, ou seja  $0,24 \text{ V vs Ag|AgCl}$ . \_\_\_\_\_ 52

**Figura 29:** Resultados da interação da solução tampão, fetuína e CRP ( $10 \text{ nmol L}^{-1}$ ) com o biossensor obtido. \_\_\_\_\_ 53

**Figura 30:** a) Variação da capacitância real do biossensor em função da frequência, no potencial de “redox in” (valores onde as medidas são realizadas) e “redox out”. b) Variação da capacitância imaginária do biossensor em função da frequência. Os insertos em (a) e (b) mostram a ampliação dos valores que se sofrem alterações significantes, enquanto que, no “redox out” nada ocorre. \_\_\_\_\_ 53

**Figura 31:** Perfil cromatográfico do peptídeo bruto em vermelho Fc-Lys-Ala-Ala-Cys. Perfil cromatográfico do peptídeo puro com 99% de pureza em preto. O pico referente ao peptídeo é o de 14,6 min. Coluna Analítica Fase Reversa C18, 4,6 mm x 150 mm, Ultrasphere Phenomenex com fluxo de  $1,0 \text{ mL/min}$  e detecção em  $220 \text{ nm}$ ,  $5 \text{ \mu m}$ ,  $300 \text{ \AA}$ , programa gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 min. \_\_\_\_\_ 56

**Figura 32:** Voltametria cíclica (VC) do peptídeo redox. Nota-se a presença de picos catódicos e anódicos na curva da SAM do peptídeo. As medições foram realizadas a uma velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$  com potencial de 0,0 a 0,7 V (V x Ag | AgCl), utilizando  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  de solução TBAClO<sub>4</sub> como eletrólito suporte. \_\_\_\_\_ 57

**Figura 33:** Representação esquemática do peptídeo Fc-Lys-Ala-Ala-Cys-NH<sub>2</sub> \_\_\_\_\_ 58

**Figura 34:** Curva de Nyquist para os dados de capacitância do peptídeo eletroativo com anti-CRP funcionalizado em superfície de ouro, para várias concentrações de CRP. \_\_\_\_\_ 59

**Figura 35:** (a) Variação da capacitância real do biossensor em função da frequência, no potencial de “redox in” (valores onde as medidas são realizadas) e “redox out”. b) Variação da capacitância imaginária do biossensor em função da frequência. \_\_\_\_\_ 60

**Figura 36:** Curva analítica obtida a partir dos dados da curva de Nyquist. A resposta linear é obtida traçando o inverso de  $\Delta Cr$  ( $1/\Delta Cr = 1/Cr, [CRP] - 1/Cr$ , branco, onde  $1/Cr$ , branco é o inverso da capacitância do biossensor depois de exposto à solução de PBS sem alvo), contra o logaritmo da concentração de CRP. O ajuste da regressão linear foi de 99%. Os dados foram obtidos no potencial de meia onda, ou seja 0,33 V vs Ag|AgCl. \_\_\_\_\_ 60

**Figura 37:** Representação esquemática das distâncias referentes às monocamadas peptídicas: (a) Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(fc)-Ala-Ala-COOH e (b) Fc-Lys-Ala-Ala-Cys. \_\_\_\_\_ 64

## Lista de Tabelas

- Tabela 1:** Dados da Síntese da Peptidil-resina Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(Mtt)-Ala-Ala-COO-Wang. \_\_\_\_\_ 34
- Tabela 2:** Dados comparativos das sínteses realizadas para a obtenção do peptídeo Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(Fc)-Ala-Ala-COOH. \_\_\_\_\_ 45
- Tabela 3:** Comparação dos parâmetros analíticos para a detecção eletroquímica de CRP em PBS (pH 7,4) utilizando biossensores contendo SAMs confeccionadas com o peptídeo e com tióis mistos. \_\_\_\_\_ 54
- Tabela 4:** Dados da Síntese da Peptidil-resina Lys-Ala-Ala-Cys-RINK \_\_\_\_\_ 55
- Tabela 5:** Comparação dos parâmetros analíticos para a detecção eletroquímica de CRP em PBS (pH 7,4) utilizando biossensores contendo SAM com o peptídeo e com alcanotióis mista. \_\_\_\_\_ 61
- Tabela 6:** Parâmetros analíticos para a detecção eletroquímica de CRP em PBS (pH 7,4) utilizando biossensores com SAMs constituídas pelos peptídeos eletroativos Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(fc)-Ala-Ala-COOH(anti-CRP) e Fc-Lys(anti-CRP)-Ala-Ala-Cys-NH<sub>2</sub>. \_\_\_\_\_ 63

## Lista de Símbolos

$A$  – Absorbância

$\alpha$ - alfa

$\beta$ - beta

$\varepsilon$ - épsilon

$\Delta$  - delta

$Z'$  – impedância real

$Z''$  - impedância imaginária

$C_r$  – capacitância redox

$C^*$  - capacitância eletroquímica

$e$  - carga elementar

$k_B$  - constante de Boltzman

$T$ - temperatura absoluta

$\Gamma$  - recobrimento molecular redox da superfície.

$f$  – frequência

$\omega$  - frequência angular

$i$  - número complexo

## Lista de Abreviaturas e Siglas

### **Aminoácidos**

Ala (A) Alanina

Arg (R) Arginina

Asn (N) Asparagina

Asp (D) Ácido aspártico

Cys (C) Cisteína

Gln (Q) Glutamina

Glu (E) Ácido Glutâmico

Gly (G) Glicina

His (H) Histidina

Ile (I) Isoleucina

Leu (L) Leucina

Lys (K) Lisina

Met (M) Metionina

Phe (F) Fenilalanina

Pro (P) Prolina

Ser (S) Serina

Thr (T) Treonina

Trp (W) Triptofano

Tyr (Y) Tirosina

Val (V) Valina

### **Outras**

**AA** - Aminoácido

**Ac** - acetila

**ACN** - Acetonitrila

**Ag** - prata

**AgCl** - cloreto de prata

**ANTI - CRP** – anticorpo proteína C reativa

**BSA** - Albumina sérica bovina (do inglês “bovine serum albumin”)

**CRP** - proteína C reativa (do inglês “C reactive protein”)

**DCM** - Diclorometano



**DIC** - N,N'-diisopropilcarbodiimida  
**DIEA** – N,N,N-diisopropiletilamina  
**DMF** - N,N-dimetilformamida  
**Fmoc** - 9-Fluorenilmetiloxicarbonila  
**ECE** – espectroscopia de capacitância eletroquímica  
**EDC** - N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida  
**ELISA** - do inglês “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”  
**EIE** - espectroscopia de impedância eletroquímica  
**Fc** - ferroceno  
**HATU** - Hexafluorofosfato de 2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio)  
**HBTU** - Hexafluorofosfato de O-Benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametilurônio  
**HOBt** - N-Hidroxibenzotriazol  
**CLAE** - Cromatografia líquida de alta performance (do inglês “High Performance Liquid Chromatography”)  
**KCl** - Cloreto de Potássio  
**MBAR** - Resina metilbenzidrilamino  
**MTT** - Metiltritila  
**NHS** - N-hidroxissuccinimida  
**NMP**- N- metilpirrolidona  
**PBS** - Tampão fosfato salino (do inglês “phosphate buffered saline”)  
**SAM** - monocamada auto-organizada  
**SPFS** - Síntese de peptídeos em fase sólida  
**TBAClO<sub>4</sub>** - perclorato de tetrabutilamônio  
**t-Boc** - terc-butiloxicarbonila  
**tBu** - terc-butila  
**TFA** - Ácido trifluoroacético  
**VC** - voltametria cíclica

## SUMÁRIO

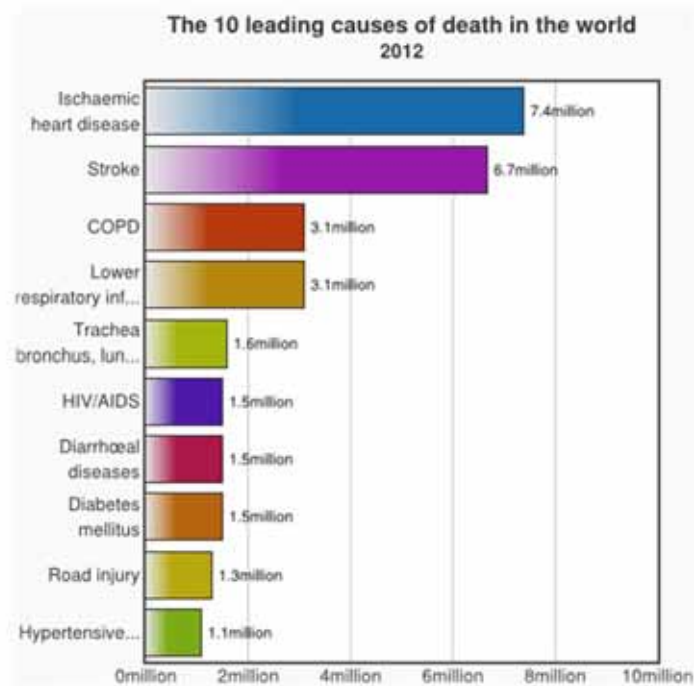
<b>1. Introdução</b> .....	17
1.1 Problemática .....	17
1.2 Biomarcadores .....	18
1.3 Proteína C Reativa .....	19
1.4 Marcadores Biológicos .....	19
1.5 Biossensores.....	20
1.5.1 Biossensores Eletroquímicos.....	20
1.5.2 Biossensores Capacitivos .....	21
1.6 O uso de peptídeos em biossensores .....	25
<b>2. Objetivos</b> .....	26
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	26
3.1 Sínteses dos Peptídeos .....	26
3.2 Testes de Clivagem .....	30
3.3 Purificação e Caracterização dos Peptídeos.....	30
3.4 Preparação da Superfície do Eletrodo.....	30
3.5 Engenharia da Superfície do Biossensor Capacitivo .....	31
3.6 Medidas Eletroquímicas e Construção da Curva Padrão .....	32
<b>4. Resultados e Discussão</b> .....	33
4.1 Síntese do Peptídeo 1 .....	33
4.2 Desenvolvimento da Monocamada Peptídica 1 e do Biossensor.....	46
4.3 Síntese do Peptídeo 2 .....	55
4.4 Desenvolvimento da Monocamada Peptídica 2 e do Biossensor.....	57
4.5 Comparações das Monocamadas Peptídicas Obtidas .....	62
<b>5. Conclusão</b> .....	64
<b>6. Referências</b> .....	65

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 PROBLEMÁTICA

Nos últimos anos, a porcentagem de mortes devido a fatores relacionados ao coração tem chamado atenção no campo da saúde. Como pode ser visto na figura 1, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (World Health Organization), a primeira causa de morte nos seres humanos está relacionada às doenças cardíacas isquêmicas, aquelas onde ocorre a diminuição da passagem de sangue através das artérias. As doenças hipertensivas do coração, causadas pela alteração da função e estrutura do coração, também estão entre as dez principais causas de morte no mundo.

**Figura 1:** Dados estatísticos das dez principais causas de morte no mundo do ano de 2012.



Extraído de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>

Levando-se em conta as estatísticas apresentadas, os pesquisadores tem se esforçado na busca de soluções, que visam diminuir a quantidade de mortes envolvendo as doenças cardíacas. Dentre os diversos estudos que vem sendo realizados, vale ressaltar aqui, um campo científico importante: a utilização dos biomarcadores (Uludag e Tothill, 2012).

## 1.2 BIOMARCADORES

Um biomarcador pode ser definido como uma molécula biológica, encontrada no sangue ou em outros fluídos biológicos, que pode indicar um processo normal ou anormal, ou seja, são substâncias específicas que quando quantificadas podem ser utilizadas para diagnosticar patologias em um organismo (Wulfkuhle, Liotta e Petricoin, 2003). As classes de biomarcadores podem variar desde DNA, RNA, expressão de marcadores de genes, mutações genéticas, e em destaque nesse trabalho, as proteínas (Wulfkuhle, Liotta e Petricoin, 2003).

Os biomarcadores são detectados em fluidos como sangue, soro, urina, e também, em alguns tipos específicos de células. A maioria destes, no entanto, ainda está sendo avaliada quanto à especificidade, visando o emprego na detecção de doenças (Tothill, 2009). A presença e o nível da concentração dos biomarcadores são, neste contexto, essenciais para o diagnóstico precoce de doenças, permitindo aos médicos tomarem decisões para o início do tratamento, diminuindo assim, a taxa de mortalidade (Tothill, 2009).

Os perfis moleculares dos pacientes também vêm sendo estudados utilizando novas ferramentas moleculares, entre elas, pode-se destacar a proteômica (Wulfkuhle, Liotta e Petricoin, 2003). Esse método, aliado a ferramentas da bioinformática, está gerando dados fundamentais no desenvolvimento de novas tecnologias de detecção e tratamento de doenças (Lee e Yook, 2014). A proteômica permite estudar as estruturas e as funções de proteínas, tornando-as candidatas a biomarcadores, viabilizando o diagnóstico e tratamento de doentes (Horner *et al.*, 2006).

Muitas doenças já estão sendo melhor detectadas devido ao desenvolvimento da ciência no campo dos biomarcadores, como é o caso da doença de Alzheimer. De acordo com a associação brasileira de Alzheimer (ABRAz) o diagnóstico da doença continua sendo clínico, mas a constatação de que marcadores biológicos podem auxiliar em sua detecção, tornando o diagnóstico mais preciso e adequado. O principal marcador biológico para esta doença é a proteína beta-amilóide, que é acumulada nas placas senis, um dos marcos patológicos da doença (Vestergaard *et al.*, 2005).

### 1.3 PROTEÍNA C REATIVA

A proteína C Reativa (sigla em inglês: CRP, C reactive Protein) é um biomarcador para a determinação de processos inflamatórios nas doenças cardíacas (Bryan *et al.*, 2013). Nas últimas décadas, muitos estudos demonstraram que a CRP está associada ao aumento do risco de problemas cardiovasculares. A molécula possui características que a tornam particularmente atrativa. Trata-se de uma proteína de fase aguda positiva - marcador de inflamação sistêmica - que é produzida em doenças cardiovasculares. Sua concentração aumenta em resposta a diversos tipos de lesões, em particular nas infecções bacterianas, situações clínicas que fazem parte de processos inflamatórios (Leite *et al.*, 2014). A sua produção ocorre no fígado e, ao contrário de outros marcadores de fase aguda, seus níveis permanecem relativamente estáveis, sem grande variação, permitindo a sua correta quantificação. As técnicas atuais de determinação da CRP apresentam um baixo limite de detecção de 0,3 mg/L. Desta forma, o desenvolvimento de métodos mais sensíveis é muito importante para a sua utilização como um eficiente marcador para processos inflamatórios, visando avaliar o risco de problemas cardiovasculares (Johnson *et al.*, 2012).

### 1.4 MARCADORES BIOLÓGICOS

Com o avanço científico, inúmeros métodos quantitativos vêm sendo desenvolvidos, sendo que, cada um apresenta vantagens e desvantagens. Os métodos de detecção das proteínas biomarcadoras estão baseados em duas principais técnicas: “label based” e “label free”. As técnicas denominadas “label based” são aquelas que necessitam de marcação, ou derivatização, entre elas pode-se destacar o teste ELISA (do inglês “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”), o qual se baseia em reações antígeno-anticorpo detectáveis por meio de reações enzimáticas. Trata-se de uma técnica de alta sensibilidade, alto limite de quantificação, baixa variabilidade, forte potencial de automação e boa reprodutibilidade. No entanto, ainda apresenta alguns aspectos negativos que são prejudiciais para um bom resultado, tais como: apresenta falsos positivos, demanda alta quantidade de amostra e alta quantidade de reagente, o tempo de análise é longo, o trabalho é intenso, o custo é elevado, utiliza-se de substratos carcinogênicos, não possui a possibilidade de miniaturização, além de não ser suficientemente sensível e de boa reprodutibilidade para a detecção de biomarcadores nos níveis de concentração existente nas fases iniciais das doenças (Tomizaki, Usui e Mihara, 2010; Uludag e Tothill, 2012).

Os cientistas têm se esforçado no desenvolvimento de métodos alternativos que possam competir com ELISA em termos de sensibilidade e seletividade. Como alternativa, tem crescido o desenvolvimento das técnicas “label free”, que são aquelas que utilizam as propriedades intrínsecas das moléculas para sua detecção e quantificação. O campo dos biossensores, que utiliza esta metodologia, vem evoluindo nos últimos anos de forma bastante acelerada (Sarkar *et al.*, 2002; Wang, J., 2006; Gunawardana e Diamandis, 2007; Tothill, 2009; Bohunicky e Mousa, 2010; Fayazfar *et al.*, 2014).

## 1.5 BIOSSENSORES

Biossensores são dispositivos que utilizam a tecnologia do reconhecimento biomolecular como uma plataforma de análise seletiva para alvos relevantes (Fayazfar *et al.*, 2014). O potencial de aplicação dos biossensores depende do alvo, que vai desde o monitoramento ambiental, processamento de comida, controle de qualidade, até diagnósticos médicos (Mello e Kubota, 2002; Lisdat e Schäfer, 2008; Chiriaco *et al.*, 2013; Cork, Jones e Sawyer, 2013; Kirsch *et al.*, 2013; Thakur e Ragavan, 2013; Santos *et al.*, 2014a).

Esses dispositivos são utilizados principalmente devido a sua alta especificidade, a velocidade de análise e baixo custo. Entre as diferentes classes de biossensores existentes, aqueles que se baseiam na resposta eletroquímica, como um transdutor de sinal para a detecção de biomoléculas, estão predominando neste campo, por causa da simplicidade, custo-benefício e alta sensibilidade (Xu *et al.*, 2005; Wang, Joseph, 2006; Johnson *et al.*, 2012; Santos, Davis e Bueno, 2014).

### 1.5.1 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

Em geral, os biossensores eletroquímicos são baseados na funcionalização da superfície de eletrodos, por meio de uma molécula de reconhecimento, especificamente produzida para detectar um marcador/alvo de interesse. Uma forma promissora para o desenvolvimento de biossensores é a montagem de sistemas eletroquímicos consistindo em monocamadas auto-organizadas (SAMs) compostas por moléculas as quais possuem uma sonda redox.

Quando a ligação do alvo com os receptores acontece, há uma alteração local das propriedades elétricas, tais como do potencial e da corrente elétrica, que pode ser detectada, utilizando técnicas eletroquímicas (K'owino e Sadik, 2005; Lisdat e Schäfer, 2008; Luo e Davis, 2013). Para atingir níveis elevados de sensibilidade e alcançar um meio de detecção

potencialmente barato, portátil e multiplexado, os métodos eletroanalíticos, como aqueles baseados em espectroscopia de impedância e capacitância, estão sendo largamente estudados (Berggren, Bjarnason e Johansson, 2001; K'owino e Sadik, 2005; Lisdat e Schäfer, 2008; Fernandes *et al.*, 2013; Fernandes *et al.*, 2014; Lehr *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2014a; Santos, Davis e Bueno, 2014).

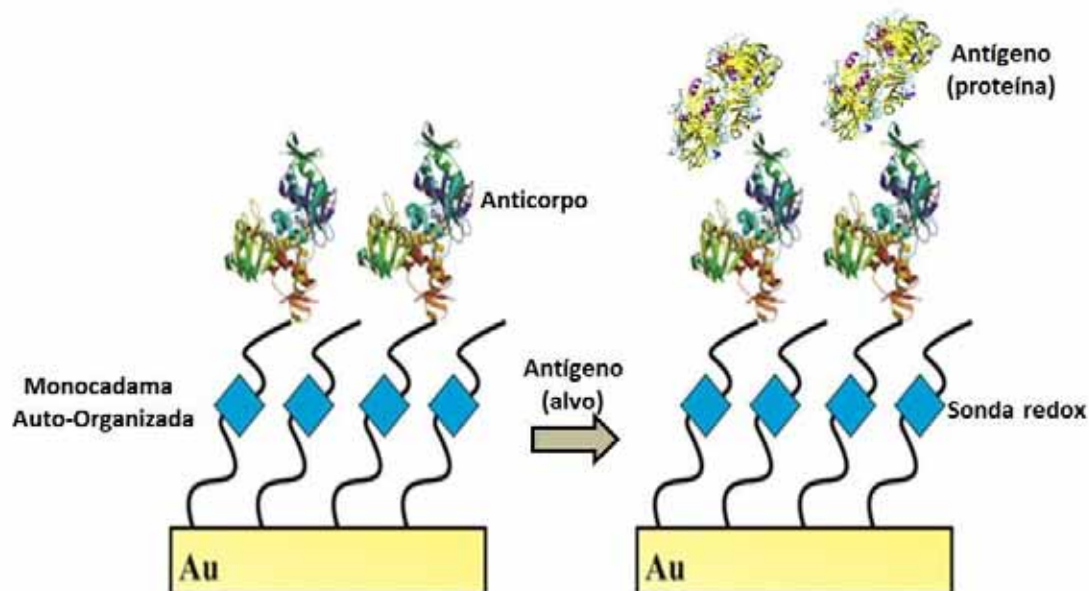
Em termos de biomarcadores de proteínas, um dos problemas mais importantes a serem resolvidos é a análise de amostras biológicas complexas, que é uma questão central no desenvolvimento de ferramentas para a proteômica e para a área de diagnósticos clínicos. Estes estudos podem potencialmente levar a aplicações terapêuticas eficazes (Ray, Mehta e Srivastava, 2010; Luo e Davis, 2013).

### 1.5.2 BIOSSENSORES CAPACITIVOS

As propriedades de impedância e capacitância são consideradas resposta da frequência, ou seja, são baseadas na aplicação de uma tensão senoidal no eletrodo de trabalho, medindo-se assim, a corrente resultante entre o eletrodo de trabalho e o de referência (K'owino e Sadik, 2005; Lisdat e Schäfer, 2008).

O uso da capacitância é baseado na análise de um sinal eletroquímico derivado da impedância. Os ensaios desenvolvidos nesta plataforma são gerados imobilizando-se biomoléculas receptivas (geralmente anticorpos) sobre os eletrodos recobertos com monocamadas auto-organizadas (SAMs), e, convertendo-se a ligação que ocorre com o alvo (por exemplo, a proteína de interesse) em um evento de sinal capacitivo mensurável. A metodologia é denominada espectroscopia de capacitância eletroquímica (ECE) e foi desenvolvida como uma plataforma de biossensor livre de marcador (técnica “label free”) (Fernandes *et al.*, 2013; Lehr *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2014a; Santos, Davis e Bueno, 2014). Em tal abordagem, o receptor biológico é imobilizado em SAMs, possuindo uma sonda redox, contidas em um eletrodo de ouro. A sonda redox é a responsável pelo sinal eletroquímico, como demonstrado na figura 2. Esta metodologia produz dispositivos com alto limite de detecção (LDD) (de nano para níveis picomolares), fato esse, relevante principalmente, no que tange o campo das aplicações médicas para diagnóstico precoce (Fernandes *et al.*, 2013; Fernandes *et al.*, 2014; Lehr *et al.*, 2014).

**Figura 2:** Abordagem de um biossensor eletroquímico: biomolécula receptiva imobilizada na monocamada auto-organizada, a qual possui uma sonda redox, em um eletrodo de ouro modificado, para detecção do alvo de interesse.



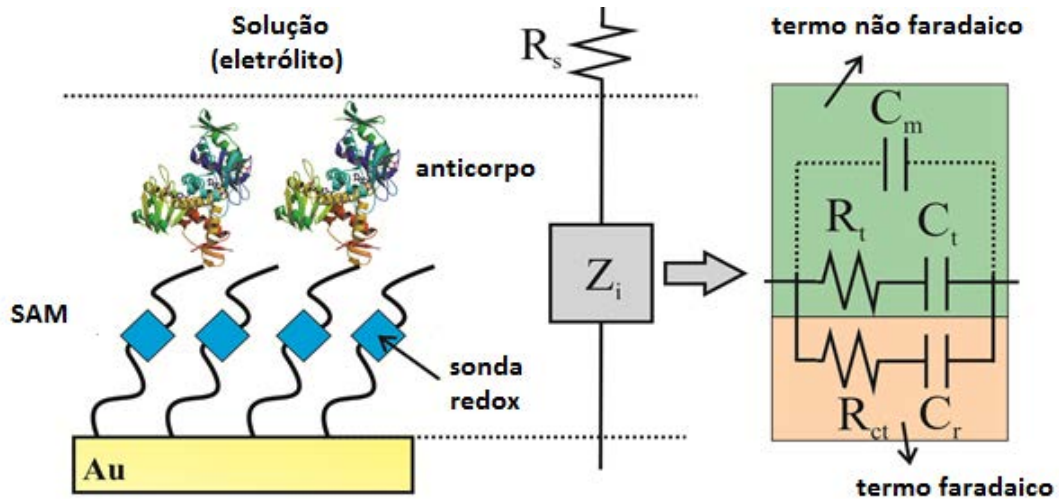
Extraído de: SANTOS *et al.*, 2014b

A Espectroscopia de Capacitância Eletroquímica é realizada utilizando a relação:  $C^*(\omega) = 1/i\omega Z^*(\omega)$ , onde  $\omega$  é a frequência angular e  $i$  é o número complexo,  $= \sqrt{-1}$  (Bueno, Mizzon e Davis, 2012).

A detecção do alvo é baseada em alterações na capacitância redox ( $C_r$ ), devido a um evento que afeta a perturbação do par redox existente no sistema (ocupação de elétrons na monocamada, contendo a sonda redox) (Fernandes *et al.*, 2013; Fernandes *et al.*, 2014; Lehr *et al.*, 2014), conforme pode ser visto resumido na figura 3. A  $C_r$  é uma capacitância que pode facilmente ser separada em termos resistivos e capacitivos - modelo de representação elétrica abaixo (Bueno and Davis 2014; Bueno *et al.*, 2012). A monocamada possui em sua estrutura, uma sonda redox capaz de armazenar carga e uma camada receptiva (anticorpo) para capturar o alvo em questão. A capacitância da monocamada ( $C_m$ ) está representada no circuito equivalente (figura 3). A resposta ideal da monocamada é representada pela resistência  $R_t$  e termos capacitivos  $C_t$ . Importante notar que,  $C_m \ll C_t$ , conseqüentemente  $R_t$  e  $C_t$  controlam a resposta iônica da monocamada dielétrica (sem a presença do par redox), e, em contraste,  $R_{ct}$  (resistência de transferência de carga) e  $C_r$  (capacitância redox) controlam a resposta faradaica (Bueno *et al.*, 2013; Goes *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2010; Romaner *et al.*, 2008; Sondag-Huethorst and Fokkink 1995).



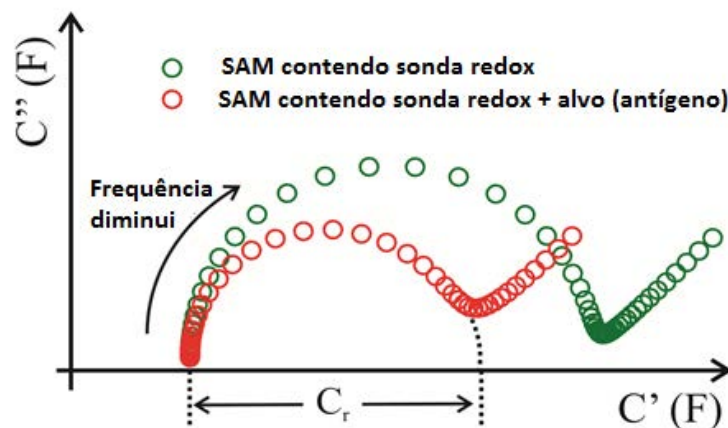
**Figura 3:** Representação elétrica de uma monocamada auto-organizada (SAM) contendo sonda redox, com um anticorpo immobilizado para detecção. A impedância interfacial de uma superfície receptiva utilizada para biosensoriamento é representada por  $Z_i$  e a resistência da solução por  $R_s$ . Ao lado, o circuito elétrico equivalente capaz de modelar o biossensor redox capacitivo.



Extraído de: SANTOS *et al.*, 2014b

A capacitância redox pode ser detectada como consequência da capacidade de armazenamento da energia eletroquímica na interface existente entre o eletrodo de ouro e a SAM. Uma alteração no meio ambiente da sonda redox (causada pelo evento de ligação do alvo) conduz a uma alteração na capacidade de carregamento, diretamente mensurável por alterações da capacitância, como pode ser visto na figura 4.

**Figura 4:** Representação da variação da capacitância redox ( $C_r$ ) quando ocorre ligação de um alvo. Esta variação pode ser facilmente determinada a partir do menor valor de capacitância imaginária após a obtenção do semicírculo.



Extraído de: SANTOS *et al.*, 2014b

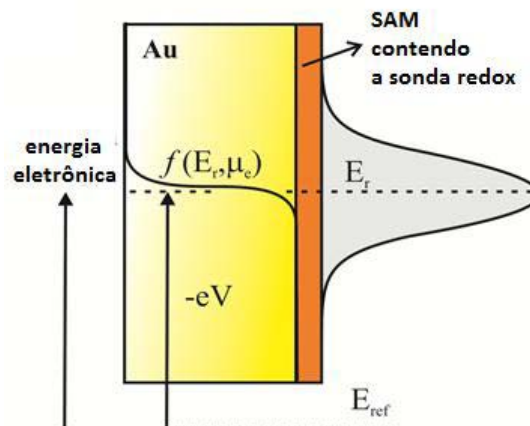
Em termos físico-químicos, a capacitância redox é muito sensível ao ambiente em que se encontra, devido a seus termos eletrostáticos e químicos (principalmente quântico), com estados energéticos separáveis, o que significa que pode ser sensível ao campo elétrico (a carga eletrostática do alvo) ou a alterações puramente químicas que ocorrem na superfície (alterações no estado de energia do receptor). Em outras palavras, tem sido demonstrado que  $C_r$  está relacionada com a densidade de estados redox, cuja ocupação eletrônica (intensidade eletrônica dos elétrons da sonda redox), considerando-se um único nível de estado de energia (como mostrado na figura 5), é dada por (Bueno, Mizzon e Davis, 2012; Bueno e Davis, 2014):

$$C_r = \frac{e^2 \Gamma}{k_B T} f(1 - f) \quad \text{Equação (1)}$$

onde  $f = n/\Gamma = F(E_r, \mu_e) = \{1 + \exp[(E_r - \mu_e)/k_B T]\}^{-1}$  é a função de ocupação dada pela função de Fermi Dirac,  $e$  é a carga elementar,  $k_B$  constante de Boltzman,  $T$  temperatura absoluta, e  $\Gamma$  é o recobrimento molecular redox da superfície.

Observe na equação 1 que,  $C_r$  é máxima quando  $f = 1/2$  e assim,  $f(1 - f) = 1/4$ , ou seja, para o potencial de meia-onda, quando a energia do eletrodo é equivalente (ou alinhada) ao estado energético da sonda redox (Bueno, Mizzon e Davis, 2012; Bueno e Davis, 2014) - figura 5. Além disso, pode notar-se que  $f$  é uma função do potencial químico,  $\mu_e$  e de  $E_r$  (nível de energia do estado redox, o qual se encontra a sonda redox). A ocupação eletrônica do centro redox pode ser definida como uma relação de energia:  $\Delta G = E_r - \mu_e$ .

**Figura 5:** Ilustração do potencial de meia onda da monocamada ( $E_r$ ) acoplado com o nível de energia do eletrodo, ocorrendo assim a troca de elétrons responsável pelo sinal mensurável da capacitância.



Extraído de: SANTOS *et al.*, 2014b

## 1.6 O USO DE PEPTÍDEOS EM BIOSSENSORES

A síntese de peptídeos vem colaborando de modo a produzir sistemas cada vez mais específicos para ensaios de biossensoriamento capacitivos. Os peptídeos são eficientes, pois podem formar monocamadas auto-organizadas em eletrodos metálicos, permitem que em sua superfície sejam ligados anticorpos e ainda podem ser marcados com sondas redox. Somado a isto, são inúmeras as vantagens da construção de uma superfície receptiva e de monocamadas auto-organizadas a base de peptídeos, podendo ser estas facilmente manipuladas (Amblard *et al.*, 2006) e modificadas para aplicações específicas.

Os peptídeos também podem ser facilmente alterados, por exemplo, por incorporação de um resíduo de cisteína (Cys) (Gatto e Venanzi 2013), o qual permite a imobilização do peptídeo sobre superfícies de ouro, facilitando aplicações em eletroanálises diversificadas (Li *et al.*, 2011). Além disto, eles podem ser aplicados diretamente em ambientes biológicos complexos, evitando os efeitos de retenção de outros materiais na superfície da matriz (Brault *et al.*, 2010).

Estudos recentes têm demonstrado que é possível obter aptâmeros de peptídeos, moléculas que se ligam a um alvo específico, com afinidade e especificidade iguais ou superiores aos anticorpos, quando ocorre ligação a proteínas alvo, tornando os peptídeos desejáveis para micro ensaios de proteínas biomarcadoras (Li *et al.*, 2011). Johnson e colaboradores realizaram um ensaio “label-free” impedimétrico para detectar CRP, onde compararam a utilização de aptâmeros e de anticorpos. O uso de aptâmeros mostrou-se muito mais sensível, além de possuir uma estabilidade interfacial melhor do que a apresentada pelos anticorpos (Johnson *et al.*, 2012).

Neste trabalho propõe-se a utilização de peptídeos na formação de SAMs para o desenvolvimento de biossensores. Desta forma, os peptídeos sintetizados nesse trabalho foram desenhados para serem ligados covalentemente a um eletrodo de ouro pela cadeia lateral do resíduo de Cys que está situado em uma de suas extremidades, e ao anticorpo anti-CRP por meio da outra extremidade. A proteína C-reativa (CRP) foi escolhida como modelo de alvo biológico, por se tratar de um importante biomarcador para doenças cardíacas, sendo que, sua adequação para uso em uma plataforma redox capacitiva já foi testada (Fernandes *et al.*, 2014). A utilização de peptídeos para ensaios de biossensoriamento redox será útil para o futuro da engenharia de superfícies complexas em ensaios diversificados de diagnóstico precoce. Este trabalho é a primeira apresentação de um sistema composto de peptídeos marcados com sonda redox, para biossensores capacitivos.

## 2. OBJETIVOS

Este projeto possuiu como objetivo principal, a síntese de conjugados ferroceno-peptídeos, para a obtenção de monocamadas auto-organizadas (SAMs) em eletrodos de ouro, visando o desenvolvimento de biossensores para detecção da proteína C-reativa.

Técnicas eletroquímicas como, voltametria cíclica (VC), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e espectroscopia de capacitância eletroquímica (ECE) foram utilizadas para a caracterização e desenvolvimento dos biossensores.

O êxito desse trabalho passou por alguns pontos específicos:

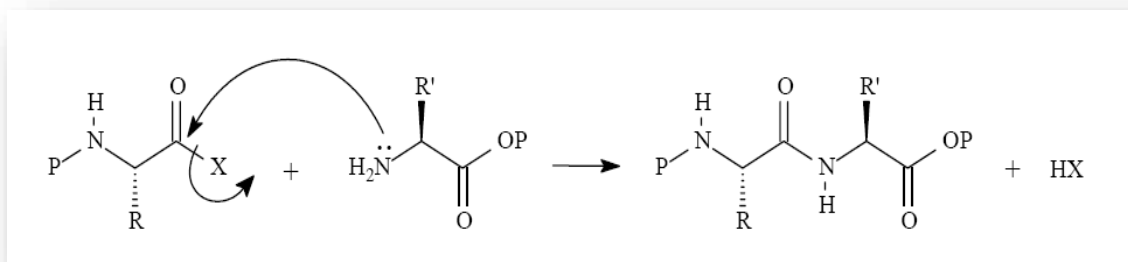
- Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos:
  1. Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(fc)-Ala-Ala-COOH
  2. Fc-Lys-Ala-Ala-Cys-NH<sub>2</sub>
- Padronização da técnica de síntese de peptídeo em fase sólida, contendo uma molécula redox ativa, em particular, a molécula ferroceno;
- Formação das monocamadas auto-organizadas (SAMs) a partir dos peptídeos sintetizados;
- Ligação do anticorpo da proteína C reativa às SAMs;
- Avaliação do uso das técnicas de VC, EIE e ECE no desenvolvimento de SAMs utilizando conjugados ferroceno-peptídeo para detectar CRP;
- Determinação da sensibilidade, especificidade, confiabilidade e viabilidade das análises em função das duas diferentes cadeias peptídicas utilizadas;
- Comparação dos resultados obtidos frente às atuais técnicas de imobilização de SAMs em eletrodo de ouro, ou seja, as monocamadas utilizando alcanotióis.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 SÍNTESES DOS PEPTÍDEOS

Inicialmente os peptídeos foram sintetizados utilizando a técnica denominada de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS). Esse método de síntese encontra-se publicado em diversas revisões (Merrifield, 1964; Fields e Noble, 1990) e baseia-se no crescimento, resíduo por resíduo da cadeia peptídica presa covalentemente pelo seu aminoácido carboxi terminal aos sítios reativos existentes em um suporte sólido (resina), como mostrado na figura abaixo.

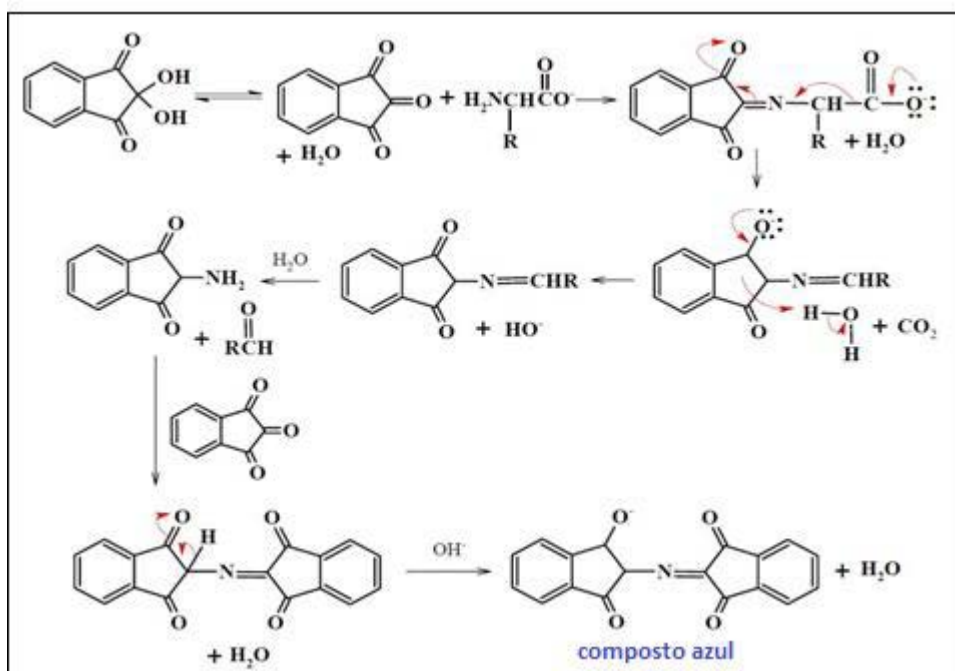
**Figura 6:** Ilustração da reação que ocorre no acoplamento do aminoácido.



Na síntese peptídica em fase sólida, o aminoácido carboxi-terminal é ligado covalentemente à resina por meio de uma ligação éster para a obtenção de peptídeos com carboxilatos livres (exemplo: resina Wang), ou de uma ligação amida para a obtenção de peptídeos com extremidade alfa carboxamida (exemplo: resina Rink Amida). No presente trabalho foram utilizadas ambas as resinas.

Os acoplamentos dos Fmoc-aminoácidos foram realizados pela ativação dos grupos carboxilas com a combinação: *O*-(Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurôniohexafluorofosfato (HBTU)/ *N*-metil-morfolina (NMM) e diisopropilcarbodiimida (Dic)/*N*-Hidroxibenzotriazol (HOBt). Todos os Fmoc-aminoácidos e reagentes foram usados com 2 vezes de excesso em relação à quantidade de grupos reativos na resina inicial. A retirada do grupo Fmoc base-lábil foi efetivada pela lavagem em 20% metil-piperidina/DMF durante 20 min. Entre cada passo foram efetuadas lavagens com dimetilformamida (DMF) e diclorometano (DCM), para eliminação do excesso de reagentes e subprodutos. Após cada etapa de acoplamento foi efetuado o teste de ninidrina (Kaiser *et al.*, 1970). Este reagente, a altas temperaturas, reage com grupos amino livres, liberando um composto de cor azul (figura 7). Este teste é, portanto, adequado para indicar a presença de grupos aminos livres e indicativo da eficiência dos passos de acoplamento.

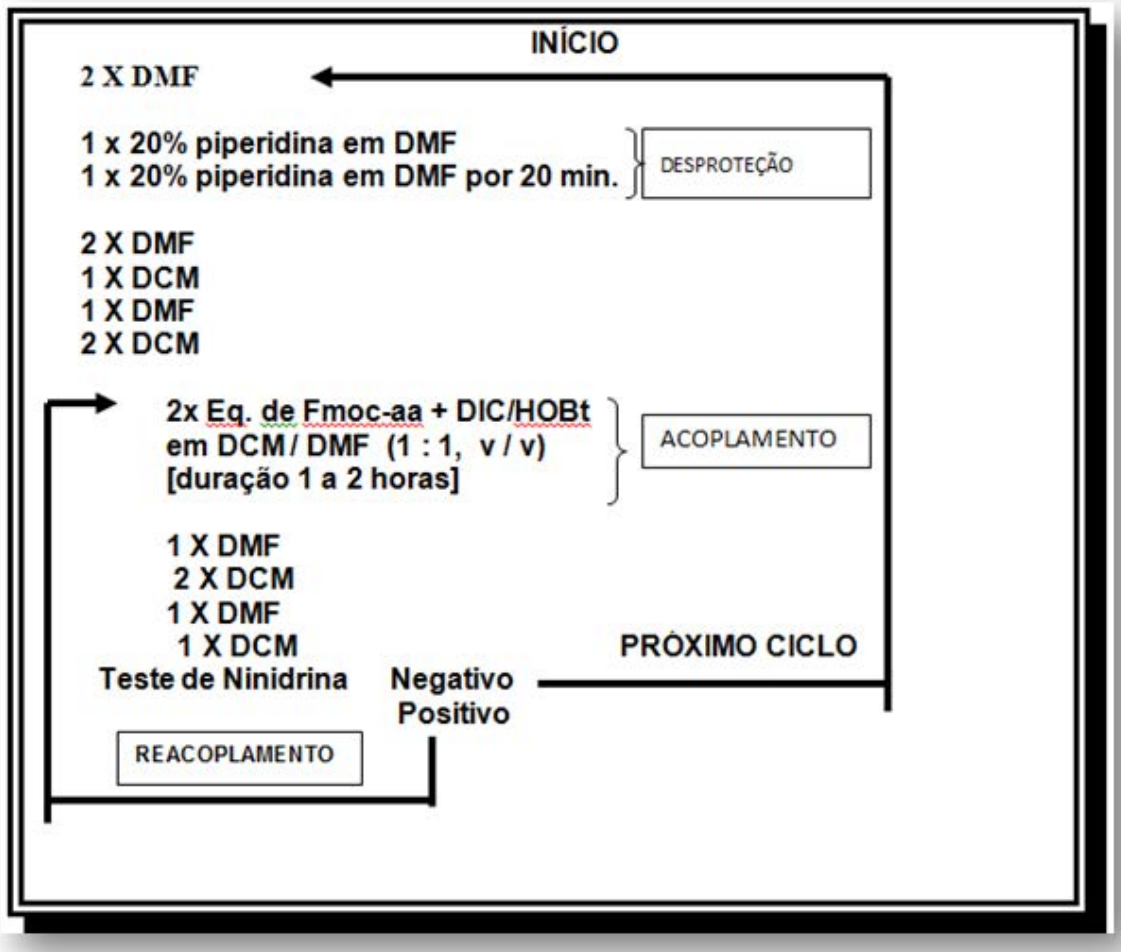
**Figura 7:** Reação que ocorre durante o teste de ninidrina.



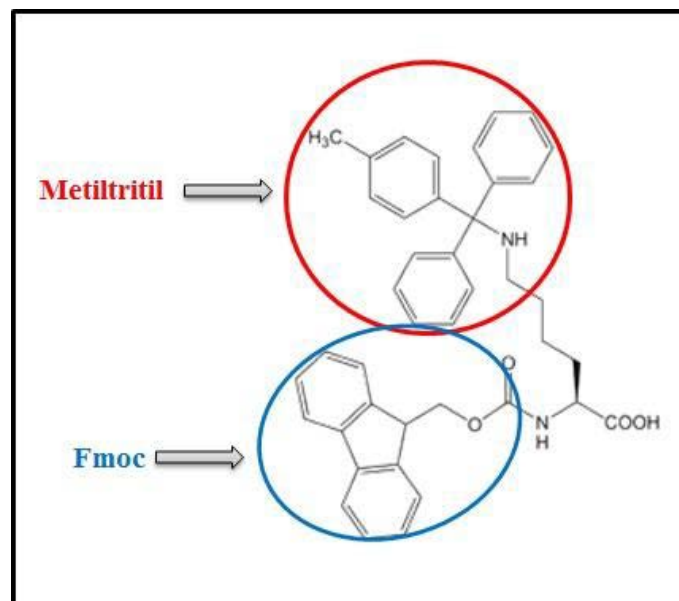
Extraído de: Chemicals and reagents, 2008–2010, Merck.

A estratégia de síntese aplicada neste trabalho utilizou além do grupamento 9-fluorenilmetiloxicarbonil para a proteção do grupo alfa amino (Fmoc, base lábil), o protocolo experimental utilizado está apresentado na figura 8, o grupamento metiltritil (Mtt) ou Fmoc para a proteção da cadeia lateral e principal da Lys respectivamente (figura 9) e o grupamento Tritil (Trt) para a proteção da cadeia lateral da Cys. O protetor Mtt é descrito como lábil na presença de uma solução de 1% de TFA em DCM (Li e Elbert, 2002). Desta forma, após a síntese do peptídeo Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(Mtt)-Ala-Ala-COOH, o protetor foi retirado seletivamente, permitindo o acoplamento da molécula de ferroceno na cadeia lateral do resíduo de Lys por meio do anidrido 3-ferrocenilpropiônico. A Lys caracteriza-se por ter dois grupos aminos, o grupamento alfa responsável pela ligação peptídica, e o epsolon que foi utilizado para a ligação da molécula de ferroceno no meio da cadeia.

**Figura 8:** Esquema da Síntese de Peptídeos em Fase Sólida.



**Figura 9:** Estrutura da Fmoc-Lys(Mtt), em destaque o grupamento metiltritil (Mtt) e o grupamento Fmoc protegendo a cadeia lateral e a principal, respectivamente.



### 3.2 REAÇÕES DE CLIVAGEM

A clivagem dos peptídeos ao final da síntese foi realizada pela adição de diferentes soluções as quais continham o ácido trifluoracético - TFA (Merck®), responsável pela clivagem e os supressores de reações colaterais: triisopropilsilano (TIS) (Acros Organics®), 1,2 etanoditiol (EDT), e água Milli-Q®; em frasco de cintilação sob agitação branda por 2 h. O volume utilizado foi na proporção de 10 mL de solução para cada 1 g de resina. Depois foi executada a precipitação do peptídeo e da resina com éter etílico gelado e o sobrenadante foi descartado. Ao final, o peptídeo foi dissolvido com uma solução contendo 0,045% de TFA em água ultrapura e centrifugado para separar a resina. O sobrenadante resultante contendo o peptídeo foi liofilizado.

### 3.3 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

A purificação dos produtos obtidos foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) em modo semi-preparativo, com solvente A (0,045% de TFA em H<sub>2</sub>O) e solvente B (0,036% de TFA em ACN), fluxo de 5 mL/min, comprimento de onda de detecção de 220 nm, e uma coluna C18 da marca Phenomenex (tamanho 250 mm x 10 mm, 300 Å , tamanho da partícula de 5 µm).

Após a purificação e liofilização dos materiais obtidos, a análise de pureza de cada fração foi realizada por meio de CLAE em um aparelho analítico Shimadzu, com coluna 4,6 mm x 150 mm, de fase reversa C18 Ultrasphere Phenomenex, 300 Å, tamanho da partícula de 5 µm, detecção em 220 nm, utilizando um programa gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 min com fluxo de 1 mL/min.

As análises das massas moleculares dos peptídeos foram realizadas por espectrometria de massas com aparelho Bruker injeção ion trap, para confirmar a obtenção do material desejado, modo eletrospray positivo (MS+) faixa de 200-2000 g/mol.

### 3.4 PREPARAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO ELETRODO

A preparação da superfície do ouro foi feita por polimento manual com aluminas de diferentes tamanhos (1 µm; 0,3 µm e 0,05 µm), partindo da alumina com maior tamanho de partícula para a de menor. Os eletrodos foram sonicados em água para remover as partículas aderidas entre cada passo de polimento. Em seguida as superfícies dos eletrodos foram polidas



eletroquimicamente com NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup> (Potencial de -1,5 V a -0,5 V com uma velocidade de varredura de 50 mV s<sup>-1</sup>) e subsequentemente com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup> (Potencial de -0,2 V a 1,5 V com velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup>) até que o pico de redução do ouro na voltametria cíclica fosse estabilizado (em torno de 50 ciclos).

Após os passos de polimento eletroquímico, as áreas eletroativas foram avaliadas matematicamente por meio da integração do pico catódico do voltamograma do ouro e convertido para a área real da superfície utilizando fator de conversão de 400 μC cm<sup>-2</sup> (Trasatti e Petrii, 1991). Como o fator de rugosidade tem que ser controlado, foi mantido na faixa de 1,2 a 1,5 em todas as medidas realizadas.

### 3.5 ENGENHARIA DA SUPERFÍCIE DO BIOSSENSOR CAPACITIVO

Para a construção da SAM formada por conjugados ferroceno-peptídeos, um eletrodo de Au limpo foi imerso durante 16 h a 25°C em uma solução contendo 1,8 mmol L<sup>-1</sup> de ferroceno-peptídeo em acetonitrila para a formação da monocamada.

Após a formação da monocamada e de sua caracterização por meio das técnicas de voltametria cíclica, espectroscopia de impedância e capacitância, os grupos carboxílicos terminais dos peptídeos foram ativados com 0,4 mol L<sup>-1</sup> de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) e 0,1 mol L<sup>-1</sup> de N-hidroxissuccinimida (NHS) - método de bioconjugação química - durante 30 min antes da ligação covalente do anticorpo. Em seguida, o anti-CRP foi imobilizado pela adição de 200 μL de solução 1 μmol L<sup>-1</sup> de anti-CRP em PBS durante 1 h.

Para o peptídeo Fc-Lys-Ala-Ala-Cys-NH<sub>2</sub> a ligação ocorreu mediante a adição do anticorpo e dos agentes acoplantes EDC e NHS ao eletrodo contendo a monocamada, durante 1,5 h, uma vez que, nesse caso, o anticorpo foi acoplado nos grupamentos aminos livres presente na cadeia lateral da Lys.

Com o objetivo de bloquear sítios não específicos, o eletrodo com o anti-CRP imobilizado foi imerso em 200 μL de solução de 0,1% BSA (Sigla em inglês para *bovine serum albumin*) em PBS durante 1 h a 25 ° C. Entre cada passo, o eletrodo foi lavado com solução tampão PBS.

### 3.6 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS E CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO

Um potenciostato Autolab modelo PGSTAT30 (Metrohm), com um módulo FRA, controlado pelo programa NOVA, foi utilizado para as medidas eletroquímicas. A célula eletroquímica utilizada era formada por três eletrodos, sendo eles: eletrodo de trabalho de ouro de 2,0 mm de diâmetro (Metrohm), um contra-eletrodo de platina (Pt), e um eletrodo de referência de Ag|AgCl (saturado com KCl).

A caracterização eletroquímica foi conduzida utilizando eletrólito suporte de 20 mmol L<sup>-1</sup> TBAClO<sub>4</sub> dissolvido em acetonitrila e água (20:80, v/v) sem a sonda redox, a qual já estava presente no peptídeo. Voltametria cíclica (VC) foi realizada com velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup> entre os potenciais de 0,0 V e 0,7 V relativos ao Ag|AgCl. As medidas de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica foram conduzidas no potencial de meia onda (E<sub>1/2</sub>: potencial “redox in” definido por meio dos picos anódicos e catódicos apresentados nas medidas de VC) e nas regiões não faradaicas (redox out), ambos na faixa de frequência de 10 mHz a 100 kHz com um pico de amplitude de 10 mV.

A análise de Espectroscopia de Capacitância Eletroquímica foi realizada utilizando a relação:  $C^*(\omega) = 1/i\omega Z^*(\omega)$ , onde  $\omega$  é a frequência angular e  $i$  é o número complexo,  $= \sqrt{-1}$  (Bueno, Mizzon e Davis, 2012). No tratamento dos dados de  $Z^*(\omega)$  (impedância real) é possível obter a capacitância imaginária por meio da fórmula:  $C'' = \varphi Z'$  e a real:  $C' = \varphi Z''$  lembrando que,  $\varphi = 1/(\omega|Z|^2)$ , onde  $|Z|$  é o módulo de  $Z^*$ . Os recobrimentos superficiais ( $\Gamma$ , mol cm<sup>-2</sup>) dos filmes eletroativos foram calculados utilizando a equação  $\Gamma = 4C_r k_B T / eF$ , onde  $C_r$  é a capacitância redox por cm<sup>2</sup>,  $k_B$  constante de Boltzmann,  $T$  temperatura absoluta (293 K),  $F$  é a constante de Faraday e  $e$  a carga elementar.

Depois da caracterização eletroquímica, a proteína CRP foi adicionada em alíquotas de 20  $\mu$ L à interface, em uma variação de concentração entre 0,5 nmol L<sup>-1</sup> a 10,0 nmol L<sup>-1</sup>, preparadas em PBS (pH 7,4). O eletrodo foi então lavado com PBS e as medidas de impedância foram realizadas. Todas as medidas foram realizadas em triplicata (três eletrodos). Para confirmar a interação específica entre antígeno-anticorpo (CRP e anti-CRP), um controle negativo foi empregado utilizando fetuína (proteína não específica) a 10 nmol L<sup>-1</sup>.

A fim de verificar a estabilidade do sistema, foi feito um controle da análise da superfície (em apenas um dos modelos de peptídeo). Para este efeito, a variação do sinal foi avaliada adicionando solução tampão sem as alíquotas de solução de CRP a fim de recolher a resposta do sinal (branco). O limite de detecção (LDD) foi calculado com base na definição da IUPAC (Longo e Winefordner 1983).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

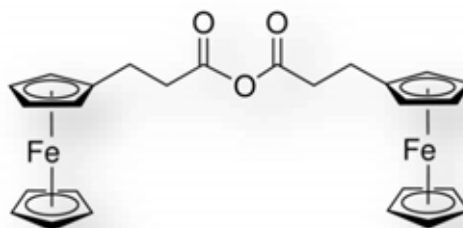
### 4.1 SÍNTESE DO PEPTÍDEO 1

O peptídeo de sequência: Ac-Cys-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-COOH, foi sintetizado de acordo com a metodologia de síntese de peptídeo em fase sólida (SPFS), descrita no procedimento experimental.

A resina escolhida para a síntese trata-se de uma Fmoc-Ala-Wang (polímero funcionalizado com grupos p-alcoxibenzílicos, com o primeiro resíduo de Alanina previamente acoplado). A resina foi escolhida para a obtenção do peptídeo com a extremidade C-terminal na forma de carboxilato, grupo que se faz necessário para a ligação do anticorpo ao peptídeo. O grupo acetil foi adicionado na extremidade N-terminal para evitar que o grupo alfa amino ficasse livre e o acoplamento do ferroceno ocorresse em mais de uma posição no peptídeo. Os resíduos de Ala foram escolhidos visando a montagem de uma monocamada apolar com propriedade capacitiva.

Nesta síntese foi utilizado o resíduo de Fmoc-Lys(Mtt)-OH, que contém um grupo protetor em seu grupamento epsilon ( $\epsilon$ ) amino, denominado Metiltritol (Mtt), o qual é ácido lábil (LEURS *et al.*, 2012). Sendo assim, após o acoplamento de todos os aminoácidos, foi possível realizar a remoção seletiva do Mtt, e posterior acoplamento de um grupo redox ativo (ferroceno), com o peptídeo ainda ligado à resina. Importante ressaltar que, de acordo com a literatura, o grupo Mtt que protege a cadeia lateral da Lys pode ser seletivamente removido com 1% TFA em DCM, fazendo desse aminoácido, um excelente composto para a síntese de conjugados peptídicos (Novabiochem, 2012).

O grupo redox escolhido para a incorporação do ferroceno na cadeia peptídica foi o ácido 3-ferrocenilpropiônico. Para o acoplamento deste composto utilizou-se o anidrido simétrico (figura 10), o qual possui o grupamento carboxílico já ativado, isto é, em condições de ser atacado nucleofilicamente pelo grupamento  $\epsilon$  amino da Lys.

**Figura 10:** Estrutura química do anidrido 3-ferrocenilpropilônico

Extraído de: <http://www.sigmaaldrich.com>

A escala da síntese utilizada foi 0,2 mmol, partindo-se de uma massa inicial de resina de 300 mg. Os ativadores utilizados foram HBTU/NMM. Ao final da síntese e após acetilação, obteve-se uma massa de 460 mg de resina, sendo assim, houve um ganho de massa de 160 mg. Os dados estão resumidos na Tabela 1.

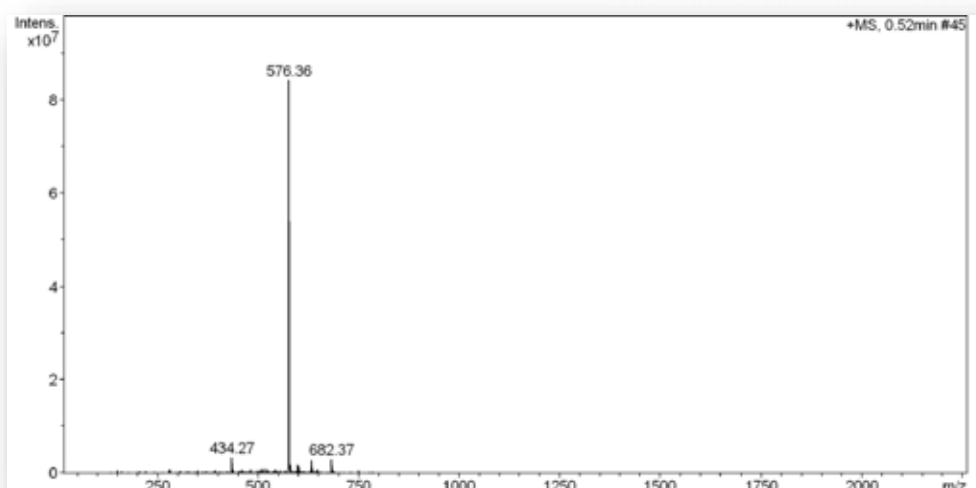
**Tabela 1:** Dados da Síntese da Peptidil-resina Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(Mtt)-Ala-Ala-COO-Wang.

Peptidil-Resina	Ganho de Massa (mg)	Ganho de massa teórico (mg)	Rendimento (%)
Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(Mtt)-Ala-Ala-COO-Wang	160	170,2	94 %

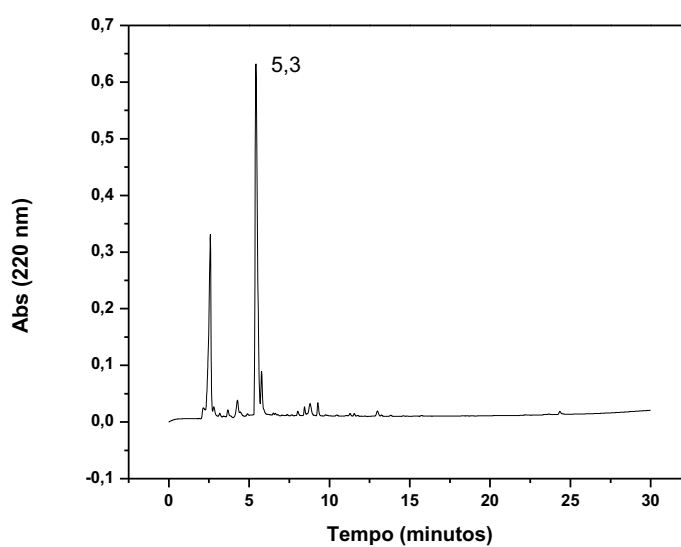
Antes de prosseguir para o acoplamento do anidrido 3-ferrocenilpropilônico, uma micro clivagem (ponta de espátula) foi realizada para a confirmação de que o peptídeo foi sintetizado com sucesso e para verificar a homogeneidade do material obtido. Neste procedimento utilizou-se uma solução de 500  $\mu$ L de TFA/H<sub>2</sub>O/EDT/TIS (94/2,5/2,5/1; v/v/v/v), que rompe a ligação peptídeo resina e retira o protetor Mtt.

A espectrometria de massas confirmou a massa molar do peptídeo desejado: 575,3 g mol<sup>-1</sup> (figura 11). O perfil cromatográfico do peptídeo bruto obtido está apresentado na figura 12 com tempo de retenção de 5,3 min.

**Figura 11:** Espectro de massas referente ao peptídeo Ac-Cys-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-COOH, massa molar de 575,3 g mol<sup>-1</sup>.



**Figura 12:** Perfil Cromatográfico referente ao peptídeo bruto Ac-Cys-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-COOH, com tempo de retenção de 5,3 min (Coluna Analítica Fase Reversa C18, 4,6 mm x 150 mm, Ultrasphere Phenomenex com fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 220 nm, 5 μm, 300 Å, programa gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 min).



Após a confirmação do peptídeo desejado e visando o acoplamento do ferroceno, se fez necessário que o grupo Mtt da Lys fosse retirado. A remoção do Mtt libera o grupo amino da cadeia lateral desse aminoácido, permitindo assim, sua reação com o anidrido 3-ferrocenilpropionico, formando uma ligação amida com a cadeia lateral da Lys.

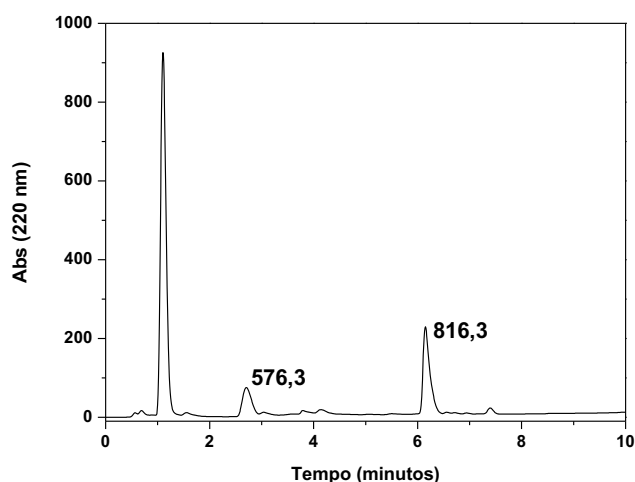
Partindo-se de uma escala 0,1 mmol da resina (230 mg de resina), realizou-se a retirada do Mtt a partir de uma solução contendo 5% de TFA em DCM, durante 15 min. A porcentagem de TFA foi aumentada, em relação ao protocolo já estabelecido pela Novabiochem, com o intuito de que todo protetor Mtt fosse retirado. A realização do teste de ninidrina, após esta reação, permitiu analisar de modo qualitativo a presença de grupos aminos livres. O resultado positivo, ou seja, a coloração azul com intensidade média do teste indicou resultado parcialmente satisfatório, uma vez que, apenas com esse teste, não é possível determinar quantitativamente a quantidade de Mtt removida.

Como teste inicial para a incorporação do ferroceno, utilizou-se uma escala de 0,01 mmol (23 mg) da resina previamente desprotegida na cadeia lateral da Lys, como descrito acima, com 5 mg de anidrido 3-ferrocenilpropionico (0,01 mmol). O composto anidrido 3-ferrocenilpropionico possui massa molar de  $498 \text{ g mol}^{-1}$ . A razão 1:1 (mol:mol) foi escolhida em razão do alto valor financeiro do anidrido utilizado.

Após 2 h de acoplamento, uma alíquota foi submetida ao teste de ninidrina. O resultado foi positivo, indicando que ainda havia grupos aminos livres, ou seja, nem todo ferroceno havia sido acoplado. Sendo assim, deixou-se acoplando durante 24 h. Como esperado, a incorporação do ferroceno foi complexa, pois alguns estudos demonstraram que a síntese de peptídeos contendo este composto necessita de maior tempo de reação (Miklán *et al.*, 2007). Contudo, mesmo após esse tempo, os grãos ainda apresentavam coloração azul quando submetidos ao teste, porém com coloração menos intensa. Conclui-se que, o ferroceno tinha sido acoplado em larga escala, porém não totalmente, o que ocasionava a presença dos grupos aminos livres, que podiam ser detectados no teste de ninidrina.

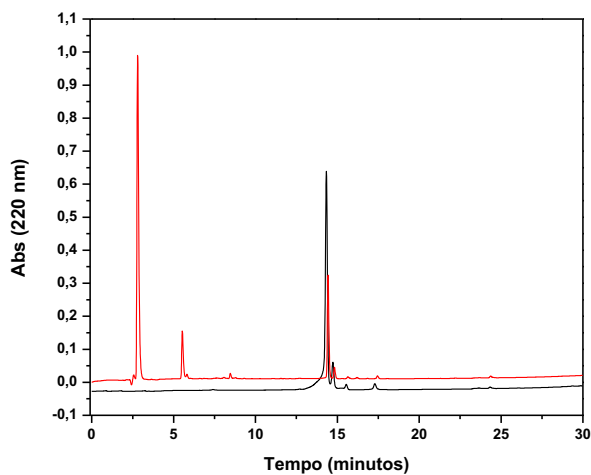
A peptidil-resina obtida, contendo agora a molécula de ferroceno, foi clivada usando 200  $\mu\text{L}$  de TFA/ $\text{H}_2\text{O}$ /EDT/TIS (94/2,5/2,5/1). A partir da clivagem obteve-se 4 mg do peptídeo bruto. Este material foi caracterizado por LC/MS (cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas), confirmando a presença de pico de massa referente ao peptídeo sem o ferroceno ( $576,3 \text{ g mol}^{-1}$ ) e um pico referente ao composto esperado, isto é, com a molécula de ferroceno acoplada ( $816,3 \text{ g mol}^{-1}$ , ver figura 13).

**Figura 13:** LC-MS referente ao peptídeo Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(Fc)-Ala-Ala-COOH. Massa Molar de 816,3 g mol<sup>-1</sup> (coluna C8, 2 x 30 mm, 5-95% solvente B em 10 min).



O peptídeo foi purificado em sistema CLAE analítico, por meio de várias injeções, devido à pequena quantidade de peptídeo bruto obtido. Os solventes utilizados foram os descritos anteriormente (A e B), em um programa de 5 a 95% de B em 30 min, sendo recolhido o pico do material contendo o ferroceno (Figura 14). Após a purificação, obteve-se uma massa de 0,8 mg de peptídeo puro, com grau de pureza de 91%, de acordo com o perfil cromatográfico mostrado na figura abaixo.

**Figura 14:** Perfil cromatográfico do peptídeo bruto em vermelho Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(Fc)-Ala-Ala-COOH, e puro em preto, com grau de pureza de 91%. (Coluna Analítica Fase Reversa C18, 4,6 mm x 150 mm, Ultrasphere Phenomenex com fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 220 nm, 5 μm, 300 Å, programa gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 min).



Visando obter um protocolo de síntese com maior rendimento em termos de quantidade e qualidade de peptídeo puro, partiu-se para uma síntese utilizando maior quantidade de resina inicial.

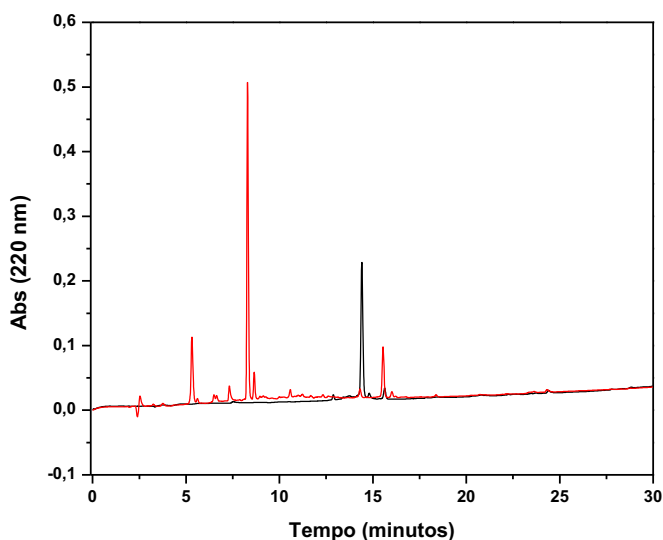
Para uma nova síntese do mesmo material, partiu-se de 230 mg de peptidil-resina, a qual já havia sido submetida a 15 min de reação para remoção do Mtt. No entanto, antes do acoplamento do ferroceno esta foi submetida a mais 15 min de reação em uma solução 5% TFA em DCM, totalizando 30 min. A presença de peptídeo sem o ferroceno pode ser atribuído a dificuldade de acoplamento dessa molécula ou ainda a desproteção incompleta do grupo Mtt da cadeia lateral da Lys. Neste sentido, o aumento no tempo de desproteção do Mtt foi realizado para confirmar a retirada de todo o grupamento Mtt. Posteriormente, 50 mg de anidrido 3-ferrocenilpropiónico foram acoplados durante 24 h.

O peptídeo foi clivado com 2,5 mL de solução TFA/H<sub>2</sub>O/EDT/TIS (94/2.5/2.5/1), obtendo-se uma massa de peptídeo bruto de 34 mg. De acordo com o cromatograma da figura 15, pode-se concluir que, para o protocolo aplicado, houve a formação de muitos contaminantes, dificultando assim, a purificação do composto. Pode-se notar que o pico referente ao peptídeo de interesse com tempo de retenção de 14,3 min, encontra-se em menor escala.

De qualquer modo, o peptídeo foi purificado em um sistema CLAE semi-preparativo com um programa de 15 a 50% de solvente B em 120 min, as frações foram analisadas em um sistema CLAE analítico, programa de 5 a 95% de B em 30 min. Foram obtidos 0,6 mg do peptídeo de interesse, com uma pureza de 91%, como pode ser visto na figura 15.



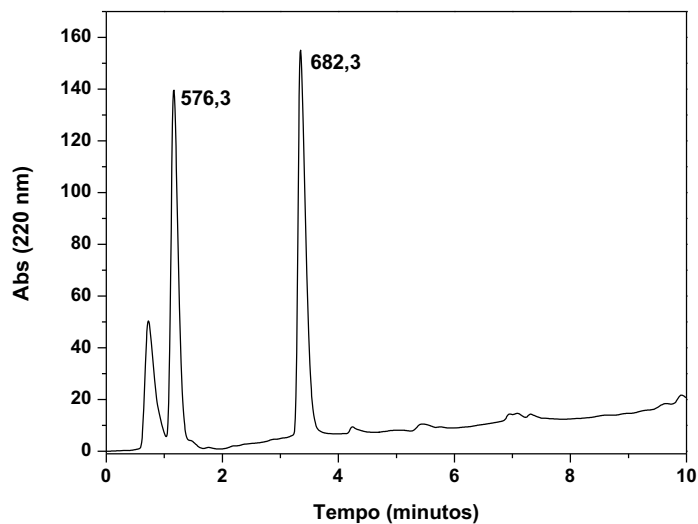
**Figura 15:** Perfil cromatográfico do peptídeo bruto em vermelho Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(Fc)-Ala-Ala-COOH. Perfil cromatográfico do peptídeo puro em preto com 91% de pureza. O pico referente ao peptídeo é o de 14,3 min (Coluna Analítica Fase Reversa C18, 4,6 mm x 150 mm, Ultrasphere Phenomenex com fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 220 nm, 5  $\mu$ m, 300 Å, programa gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 min).



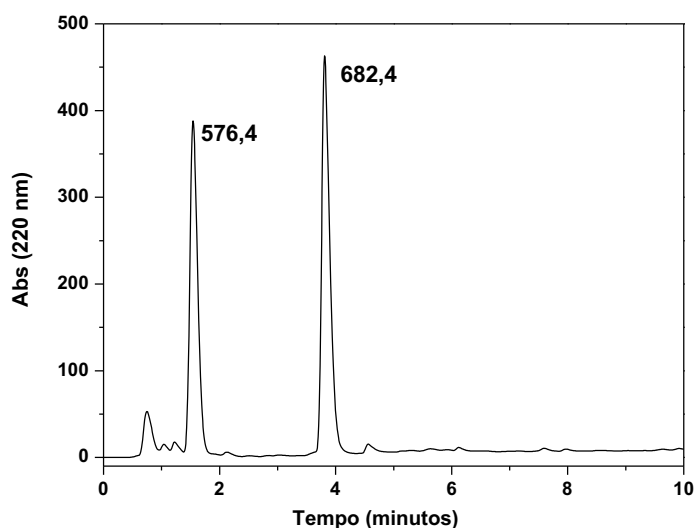
Alguns estudos já haviam demonstrado, que o anel do grupo ferroceno poderia ser degradado em meio ácido (Martić *et al.*, 2011). Sendo assim, no intuito de limitar o tempo de contato com o TFA, foram testadas novas metodologias, agora com diferentes soluções de clivagem. Além disto, foram utilizadas diferentes soluções para a retirada do Mtt e menor tempo de acoplamento do ferroceno.

Para isso, 70 mg de resina foram expostas a 5% de TFA em DCM durante 30 min, e 15 mg de anidrido 3-ferrocenilpropionico foram acoplados durante 1 h. A resina foi dividida em duas porções de aproximadamente 35 mg e submetidas a soluções de clivagens diferentes: [1] TFA/H<sub>2</sub>O/EDT/TIS (94/2,5/2,5/1) e [2] TFA/TIS/H<sub>2</sub>O/fenol/EDT (82,5/5/5/2,5). Em ambas as clivagens, obteve-se 4 mg de peptídeo bruto, porém, sem o rendimento desejado, pois a quantidade formada do peptídeo de interesse, com massa molar de 816,3 g mol<sup>-1</sup> foi irrelevante (ausência do pico do peptídeo desejado nos cromatogramas obtidos - figuras 16 e 17). A massa de 682 g mol<sup>-1</sup> encontrada em ambos os casos, refere-se a um contaminante não caracterizado.

**Figura 16:** LC-MS do peptídeo bruto Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(Fc)-Ala-Ala-COOH. Acoplamento de 1 h e clivagem com solução [1] (coluna C8, 2 x 30 mm, 5-95% B em 10 min).



**Figura 17:** LC-MS do peptídeo bruto Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(Fc)-Ala-Ala-COOH. Condição de acoplamento de 1 h e clivado com solução [2] (coluna C8, 2 x 30 mm, 5-95% B em 10 min).

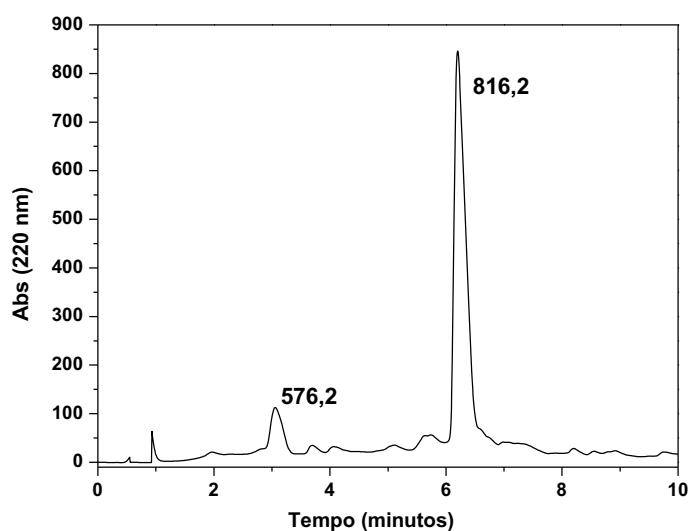


Como os protocolos anteriores não permitiram a obtenção do material desejado com bom rendimento, em termos de quantidade de peptídeo obtido e grau de pureza, havia ainda a necessidade de estabelecer um método eficiente para a síntese de conjugados ferroceno-peptídeo, desta forma, mais testes foram realizados.

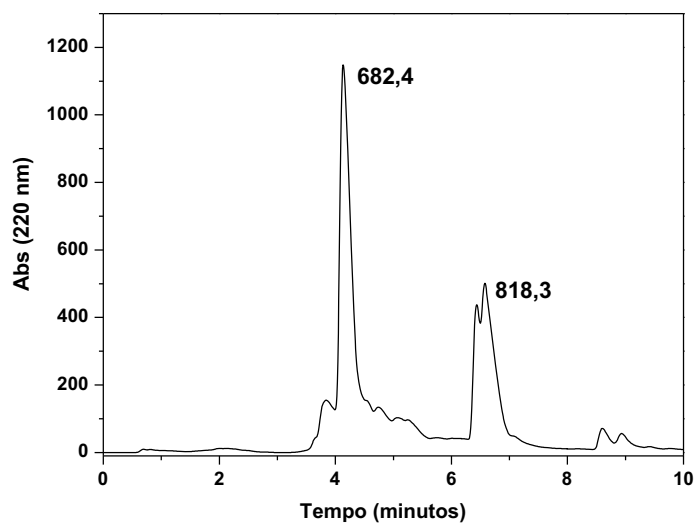
Para um novo protocolo de retirada do Mtt, 150 mg da resina contendo o peptídeo Ac-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-COOH foram submetidos a solução de 1% de TFA em DCM durante 1 h. No

entanto, com o intuito de evitar que a resina ficasse exposta continuamente ao TFA por um tempo longo, a reação foi realizada em duas etapas de 30 min cada, com uma lavagem com DCM/DMF entre elas. Após esta etapa, aproximadamente 42 mg de anidrido 3-ferrocenilpropionico foram acoplados à resina durante 24 h. A resina resultante foi dividida em três porções de 65 mg para realizar clivagens com três soluções diferentes, sendo: [1] TFA/H<sub>2</sub>O/EDT/TIS (94/2,5/2,5/1) – já utilizada anteriormente, [3] TFA/H<sub>2</sub>O (95/5) e [4] TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95/2,5/2,5). Para cada clivagem foram obtidos aproximadamente 10 mg de peptídeo bruto. Os cromatogramas (LC/MS) dos materiais obtidos de cada protocolo estão apresentados nas figuras 18 a 20.

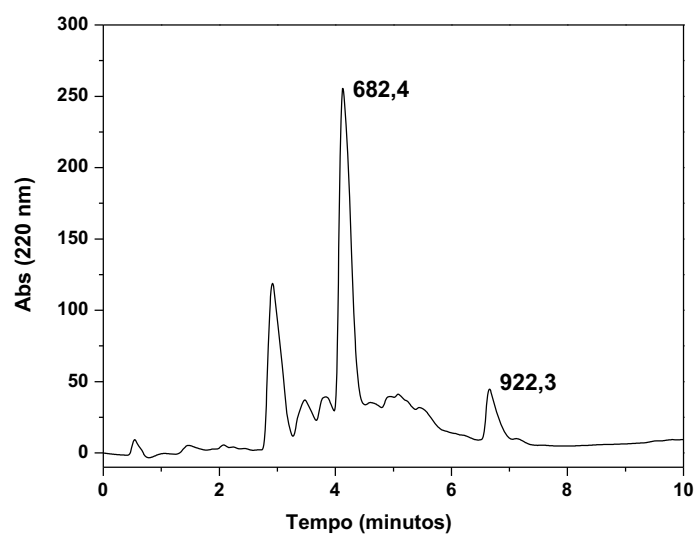
**Figura 18:** LC-MS do peptídeo bruto Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(Fc)-Ala-Ala-COOH, clivado com solução [1] (coluna C8, 2 x 30 mm, 5-95% B em 10 min). O valor apresentado acima do pico corresponde a massa molar do material em g mol<sup>-1</sup>.



**Figura 19:** LC-MS do peptídeo bruto Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(Fc)-Ala-Ala-COOH, clivado com solução [3] (coluna C8, 2 x 30 mm, 5-95% B em 10 min). O valor apresentado acima do pico corresponde a massa molar do material em  $\text{g mol}^{-1}$ .



**Figura 20:** LC-MS do peptídeo bruto Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(Fc)-Ala-Ala-COOH, clivado com solução [4] (coluna C8, 2 x 30 mm, 5-95% B em 10 min). O valor apresentado acima do pico corresponde a massa molar do material em  $\text{g mol}^{-1}$ .



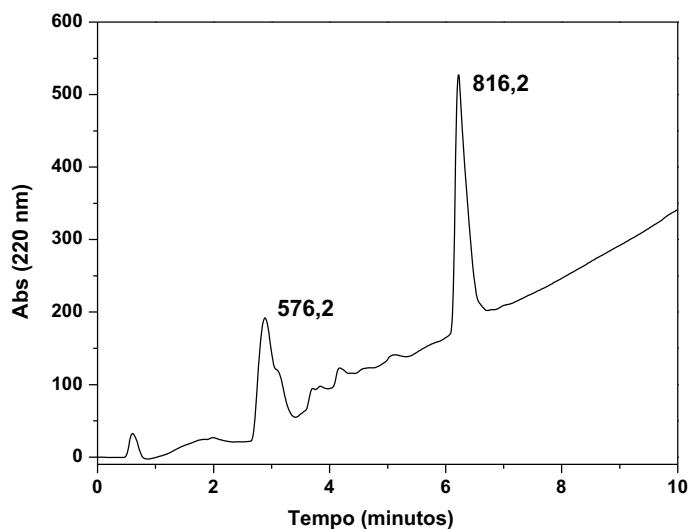
De acordo com o que pode ser visto na figura 18, o protocolo utilizando a solução de clivagem [1] (TFA/H<sub>2</sub>O/EDT/TIS) foi o mais eficiente, pois formou o peptídeo de interesse contendo o composto ferroceno - massa molar de 816,3 g mol<sup>-1</sup> (pico com tempo de retenção em torno de 6,5 min para corridas em LC/MS). Desta forma, acredita-se que a segunda clivagem realizada anteriormente utilizando esta solução provavelmente apresentou um erro experimental que impediu a obtenção do material desejado em grande quantidade (figura 15).

Já em relação aos outros dois protocolos aplicados, pode-se notar que, a solução de clivagem influenciou diretamente na formação do peptídeo de interesse, sendo assim, ao utilizar apenas TFA/H<sub>2</sub>O e TFA/H<sub>2</sub>O/TIS, além da produção de contaminantes não determinados, não houve a formação do ferroceno-peptídeo. Vale ressaltar também que, no protocolo [3] o peptídeo Ac-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-COOH não foi encontrado.

Em nova síntese, 230 mg de resina foram expostas a uma solução de desproteção do Mtt contendo 1% de TFA em DCM durante 30 min. Desta forma, foi testado a redução do tempo da etapa de desproteção do Mtt no rendimento final do peptídeo. O teste de ninidrina realizado resultou em uma coloração azul, ou seja, teste positivo. Em 100 mg dessa resina foram acoplados 28 mg de anidrido 3-ferrocenilpropionico durante 24 h.

O peptídeo foi clivado com 1,5 mL de solução TFA/H<sub>2</sub>O/EDT/TIS (94/2,5/2,5/1), a qual já havia demonstrado ter sido a mais eficiente. Obteve-se 35 mg do peptídeo bruto com um perfil cromatográfico semelhante ao obtido no protocolo anterior, quando a solução de clivagem [3] foi utilizada e o tempo de desproteção do Mtt de 1 h. A obtenção do peptídeo de interesse com massa molar de 816,3 g mol<sup>-1</sup>, pode ser confirmada no cromatograma da figura 21.

**Figura 21:** LC-MS do peptídeo bruto Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(Fc)-Ala-Ala-COOH. Condição de retirada do Mtt realizada com 1% de TFA em DCM (coluna C8, 2 x 30 mm, 5-95% B em 10 min). O valor apresentado acima do pico corresponde a massa molar do material em  $\text{g mol}^{-1}$ .



Os dados dos estudos realizados estão resumidos na tabela 2, onde foram avaliados três parâmetros importantes em relação à síntese do peptídeo contendo ferroceno em sua estrutura: a retirada do protetor Mtt, o acoplamento do ferroceno e a solução de clivagem. Em termos de retirada do grupamento Mtt, foram testadas soluções utilizando-se TFA com 1% e 5%, bem como, diferentes tempos de exposição da resina a essa solução. O objetivo era obter a retirada de todo o grupamento Mtt do peptídeo que estava na resina, visto que, todos os resultados geraram peptídeo sem a presença do ferroceno (massa molar de  $576,3 \text{ g mol}^{-1}$ ). A ausência do peptídeo contendo ferroceno poderia ser devido a presença deste grupo protegendo o resíduo de Lys na etapa de acoplamento, o que impediria a formação do peptídeo ligado ao ferroceno.

No que diz respeito ao acoplamento, de acordo com o que já havia sido investigado na literatura (Miklán *et al.*, 2007), foi evidente a necessidade de maior tempo de acoplamento para que todo o ferroceno pudesse ser acoplado. É importante ressaltar novamente que, a formação do peptídeo sem a presença do ferroceno, pode também ser compreendida como uma falha no acoplamento da molécula de ferroceno nessa etapa.

A fim de tornar amplo o estudo da síntese de peptídeo contendo a molécula de ferroceno, testes com diferentes soluções de clivagens também foram realizados. Sendo assim, foi possível afirmar que, para que o ferroceno-peptídeo fosse obtido com sucesso, a solução a ser utilizada é a composta por TFA/H<sub>2</sub>O/EDT/TIS (94/2,5/2,5/1).

Desta forma, a melhor metodologia encontrada para a síntese do peptídeo com ferroceno foi a desproteção do grupo Mtt com 1% de TFA em DCM durante 30 min e solução de clivagem contendo TFA/H<sub>2</sub>O/EDT/TIS (94/2,5/2,5/1). No entanto, o peptídeo sem ferroceno ainda foi obtido, mostrando que a retirada do Mtt e/ou o acoplamento do ferroceno não foram completos, indicando que o protocolo ainda precisa ser melhorado.

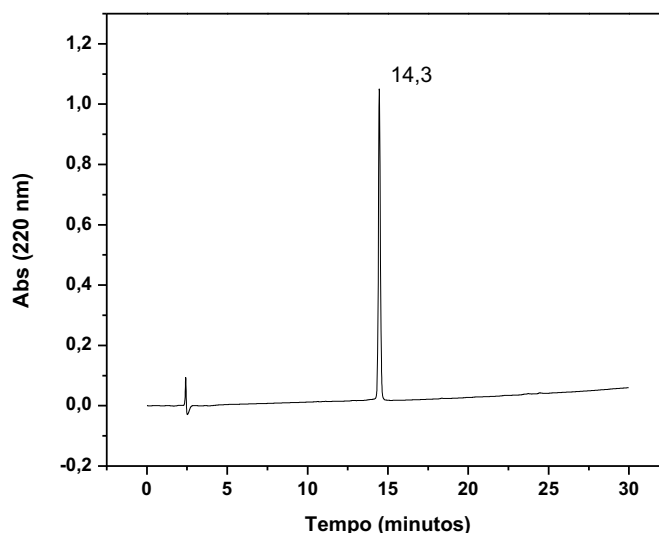
Utilizando a melhor metodologia acima descrita, o peptídeo bruto foi obtido e purificado em sistema CLAE semi-preparativo, programa de 15 a 50% de solvente B em 120 min, as frações foram analisadas em um CLAE analítico, programa de 5 a 95% de B em 30 min. Foram obtidos 2 mg do peptídeo de interesse, com uma pureza de 99% (figura 22).

**Tabela 2:** Dados comparativos das sínteses realizadas para a obtenção do peptídeo Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(Fc)-Ala-Ala-COOH.

Quantidade de Resina (mg)	Desproteção do Mtt	Tempo de desproteção	Solução de Clivagem	Tempo de Acoplamento (horas)	Peptídeo Obtido
23	5% TFA em DCM	15 min	TFA/H <sub>2</sub> O/EDT/TIS	24	SIM
230	5% TFA em DCM	2 de 15 min	TFA/H <sub>2</sub> O/EDT/TIS	24	NÃO
35	5% TFA em DCM	30 min	TFA/H <sub>2</sub> O/EDT/TIS	1	NÃO
35	5% TFA em DCM	30 min	TFA/TIS/H <sub>2</sub> O/fenol/EDT	1	NÃO
50	1% TFA em DCM	2 de 30 min	TFA/H <sub>2</sub> O/EDT/TIS	24	SIM
50	1% TFA em DCM	2 de 30 min	TFA/H <sub>2</sub> O	24	NÃO
50	1% TFA em DCM	2 de 30 min	TFA/H <sub>2</sub> O/TIS	24	NÃO
100	1% TFA em DCM	30 min	TFA/H <sub>2</sub> O/EDT/TIS	24	SIM**

\*\* : melhor protocolo desenvolvido

**Figura 22:** Perfil cromatográfico do peptídeo Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(Fc)-Ala-Ala-COOH - 99% de pureza. Condição de retirada do Mtt realizada com 1% de TFA em DCM (Coluna Analítica Fase Reversa C18, 4,6 mm x 150 mm, Ultrasphere Phenomenex com fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 220 nm, 5  $\mu$ m, 300 Å, programa gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 min).



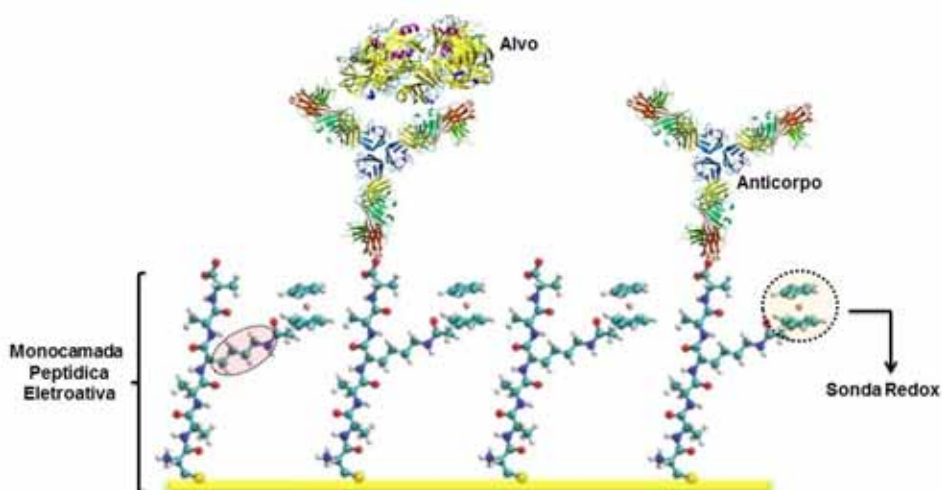
#### 4.2 DESENVOLVIMENTO DA MONOCAMADA PEPTÍDICA 1 E DO BIOSENSOR

Depois de o peptídeo ser sintetizado e purificado com sucesso, partiu-se para a próxima etapa do trabalho: a confecção da monocamada auto-organizada (SAM).

Para isso, o resíduo de Cys contido no peptídeo foi ligado covalentemente ao eletrodo de ouro através de seu grupo tiol existente em sua cadeia lateral, durante 16 h de reação. Posteriormente, na extremidade C-terminal ocorreu a ligação do anticorpo anti-CRP. Nessa montagem foi utilizado um resíduo de Cys na porção N-terminal para imobilização ao eletrodo de ouro, e um grupo carboxila livre na porção C-terminal, para ancorar o anticorpo por meio de seus grupos aminas. Nessa segunda etapa utilizou-se os ativadores EDC/NHS. Além disso, destacamos que o peptídeo, por meio da cadeia lateral da Lys, contém o ferroceno em sua estrutura. Esse proporciona ao peptídeo uma atividade redox, respondendo eletroquimicamente as perturbações do meio em que se encontra. O esquema da montagem do biossensor pode ser visto na figura 23.

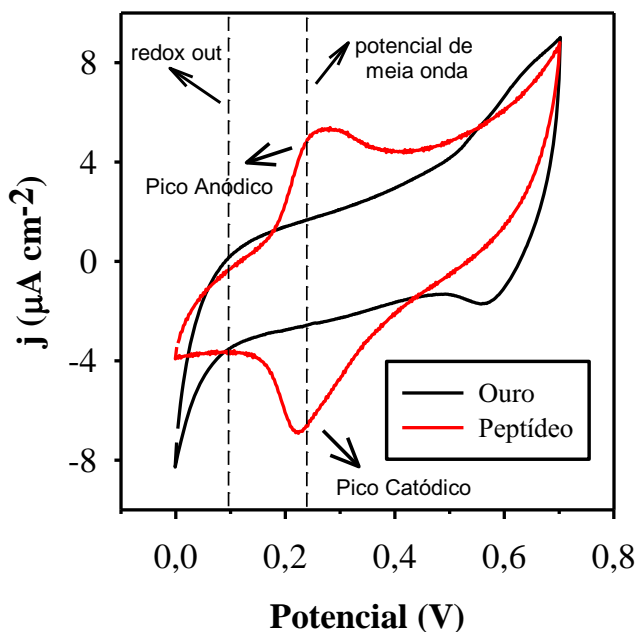


**Figura 23:** Esquema do desenvolvimento do biossensor formado por: eletrodo de ouro funcionalizado, monocamada auto-organizada peptídica contendo a sonda redox e anticorpo imobilizado para detecção do alvo de interesse (proteína C reativa).



A funcionalização do eletrodo com o peptídeo eletroativo foi verificada por voltametria cíclica, ver figura 24. A partir dos resultados, foi evidente a imobilização do peptídeo ao eletrodo de ouro, uma vez que os picos anódicos e catódicos, característicos da atividade redox do ferroceno ancorado ao peptídeo, foram encontrados. Estes estavam ausentes quando o ouro foi avaliado individualmente, isto é, antes da imobilização do peptídeo. Os picos anódicos e catódicos permitiram estabelecer o potencial de meia onda como  $0,24 \text{ V} \left( \frac{\text{POTENCIAL ANÓDICO} + \text{POTENCIAL CATÓDICO}}{2} \right)$ , referente ao eletrodo Ag|AgCl.

**Figura 24:** Voltametria cíclica (VC) do peptídeo ativo redox. As linhas potencial de meia onda e “redox out” indicam as regiões onde a espectroscopia de capacitância eletroquímica (ECE) foi realizada, como descrito em Materiais e Métodos. Nota-se a presença de picos catódicos e anódicos na curva do peptídeo (vermelho), que estão ausentes na análise de ouro. As medições foram realizadas a uma velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$  com potencial de 0,0 a 0,7 V (V x Ag | AgCl), utilizando  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  de solução TBAClO<sub>4</sub> como eletrólito suporte.



Realizando-se a integração dos picos de oxidação, foi possível estimar o grau de cobertura da superfície redox como aproximadamente  $7,9 \times 10^{-11} \text{ mol/cm}^2$ , o que resultou em um valor menor que o obtido em monocamadas confeccionadas com tióis (aproximadamente  $4,4 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$  - Fernandes *et al.*, 2014). O cálculo para o recobrimento da monocamada peptídica está demonstrado abaixo.

$$\Gamma = 4C_r k_B T / eF \quad \text{Equação 2}$$

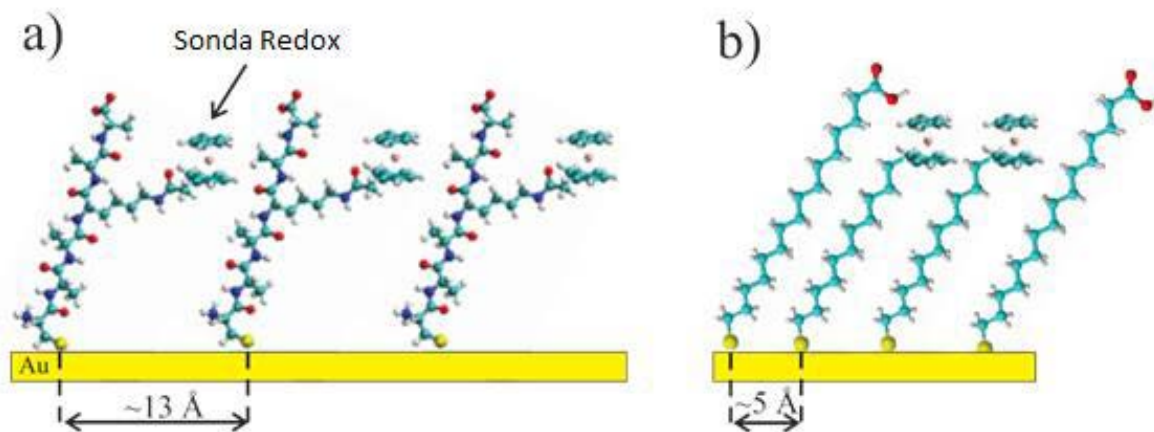
$$\Gamma = 4 \times 7,9 \times 10^{-5} \times 293 \times 1,3 \times 10^{-23} / 1,6 \times 10^{-19} \times 95.506$$

$$\Gamma = 7,9 \times 10^{-11} \text{ mol/cm}^2$$

A superfície de cobertura encontrada aqui é semelhante às obtidas em trabalhos anteriores, utilizando também a abordagem de SAM de peptídeos:  $14,14 \times 10^{-11} \text{ mol/cm}^2$  (Gatto e Venanzi, 2013). A cobertura de superfície mais elevada obtida na metodologia com alcanotióis é uma evidência de formação da SAM mais compacta, quando comparada com o SAM de peptídeo, como pode ser visto na figura 25. É importante lembrar que a sonda redox foi ligada à cadeia

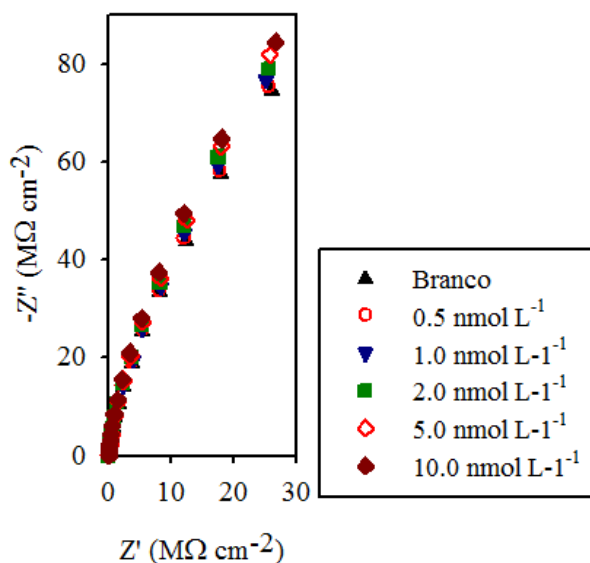
lateral de Lys, a qual contém o grupo  $\epsilon$  amino livre. A longa cadeia lateral de Lys e a ramificação propila do grupo que contém o ferroceno são flexíveis, totalizando sete átomos de carbono e um grupo amino. Esta estrutura somada a presença da cadeia lateral dos resíduos de Ala promovem uma menor compactação da monocamada auto-organizada em relação ao que é encontrado em SAM de alcanotióis. Destaca-se que o estudo de SAM de alcanotióis citado acima utilizou cadeias não ramificadas (constituída de:  $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$  ácido 16-mercaptohexadecanóico e  $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$  11-(ferrocenil)undecanotiol), o que facilita sua compactação

**Figura 25:** Representação esquemática da distância teórica entre duas cadeias peptídicas,  $\sim 13\text{\AA}$ . Este valor foi estimado considerando o comprimento da cadeia lateral de Lys na forma linear e contendo a sonda redox. (b) Espaçamento de duas cadeias alcanotiol em uma SAM,  $\sim 5 \text{\AA}$ , de acordo com Ulman et al. 1989



Como discutido anteriormente, o sinal da capacitância redox é originado a partir da capacidade de armazenamento de carga da SAM eletroativa, apresentando neste caso o ferroceno ligado à cadeia alcanotiol ou peptídica. A perturbação na capacidade redox do sistema, que pode ser chamada de "impressão digital de carga", pode ser obtida a partir da obtenção dos dados de impedância e capacitância. De fato, a análise da impedância realizada no potencial "redox in" de meia-onda ( $0,24 \text{ V}$ ), extraído da voltametria cíclica, não mostrou grandes alterações na curva de Nyquist após a interação entre os eletrodos e a solução alvo de detecção (figura 26).

**Figura 26:** Curva de Nyquist para dados de impedância do peptídeo ligado a anti-CRP em superfície de ouro, para várias concentrações do alvo CRP.



Este comportamento pode ser explicado pelo fato da análise impedimétrica estar relacionada com a resistência de transferência de carga e, aqui, a transdução de sinal está relacionada com as características de carga, ou seja, é puramente capacitivo.

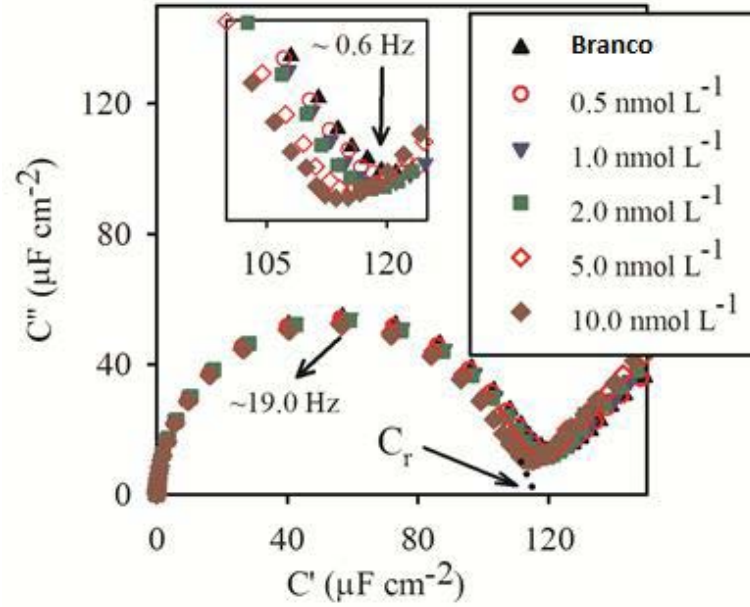
Este problema pode ser facilmente superado convertendo os dados de impedância para capacitância, originando uma curva de Nyquist equivalente (curva capacitiva Nyquist).

A capacitância redox é detectada nas superfícies onde ocorre a transferência de elétrons a curtas distâncias, desde que a energia eletroquímica possa ser armazenada nos centros redox presentes. Quimicamente, esta transferência é atingível pelo uso de uma monocamada de curto comprimento redox-marcada ligada a superfície de ouro, que funciona como um eletrodo de trabalho modificado. A capacitância redox é detectada devido a uma consequência da mudança da capacidade de armazenamento da energia eletroquímica, a qual ocorre na interface SAM/eletrodo, durante os eventos de ligação antígeno/anticorpo.

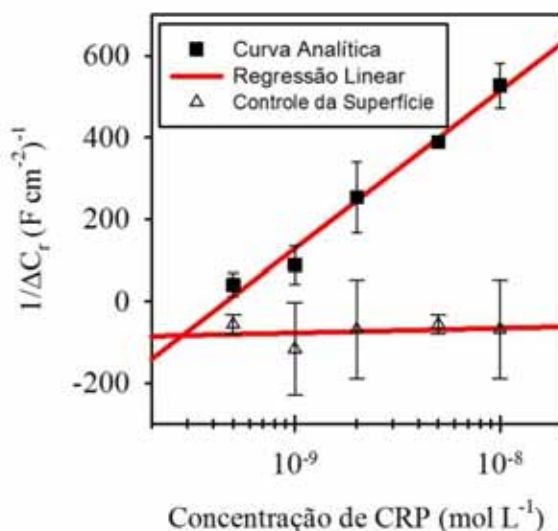
Na curva de Nyquist (figura 27) podem ser encontradas as variações de capacitância redox ( $C_r$ ) que estão associados ao evento de ligação do alvo, isto é, a interação anticorpo-antígeno. Os valores de  $C_r$  são obtidos experimentalmente do gráfico relacionando a capacitância imaginária com a real. O menor valor de capacitância imaginária após a obtenção do semicírculo dividida pela área do eletrodo é a capacitância redox. A maior capacidade de resposta é exibida pela capacitância em comparação com os dados de impedância, conforme mostrado na curva de capacitância de Nyquist e no inserto da figura 27, destacando-se a utilidade do biosensoramento capacitivo redox. A partir destes resultados, a curva analítica foi obtida (figura 28), a qual permitiu

o cálculo da constante de afinidade  $K_a$  e do limite de detecção. Os resultados encontram-se resumidos na Tabela 3.

**Figura 27:** Curva de Nyquist para dados de capacitância do peptídeo eletroativo com anti-CRP funcionalizado em superfície de ouro, para várias concentrações de CRP.



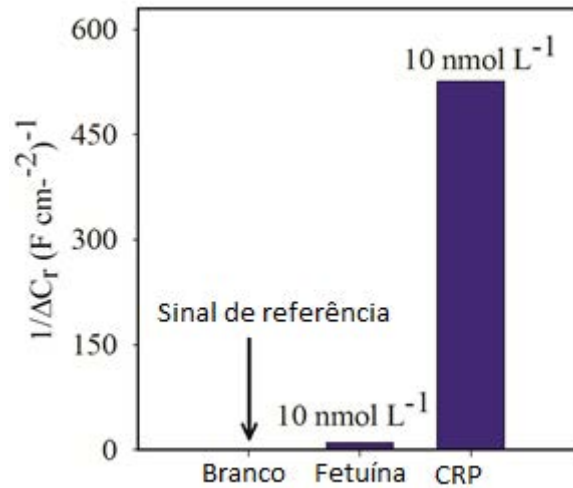
**Figura 28:** Curva analítica obtida a partir da curva de Nyquist para dados de capacitância. A resposta linear é obtida traçando o inverso de  $\Delta C_r$  ( $1/\Delta C_r = 1/C_{r,[CRP]} - 1/C_{r,branco}$ , onde  $1/C_{r,branco}$  é o inverso da capacitância do biossensor depois de exposto à solução de PBS sem alvo), contra o logaritmo da concentração de CRP. O ajuste da regressão linear foi de 98%. Os dados foram obtidos no potencial de meia onda, ou seja 0,24 V vs Ag|AgCl.



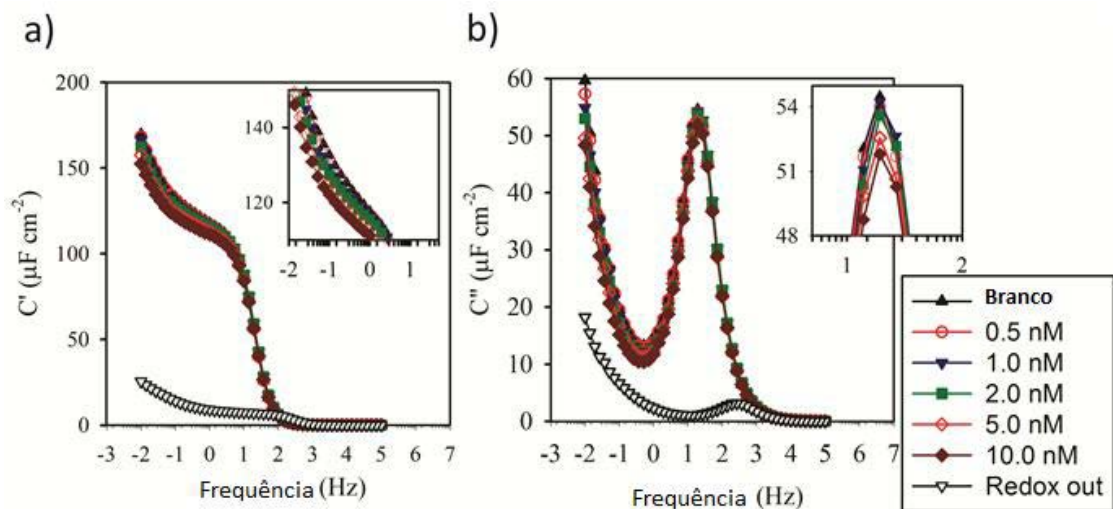
Para verificar a especificidade do eletrodo pela CRP, interações inespecíficas foram avaliadas utilizando fetuína a 10 nmol L<sup>-1</sup>. Fetuína é uma das proteínas mais abundantes no sangue. Desta forma, foi possível investigar se o sensor em questão era seletivo, ou respondia também a interações não específicas. Nenhuma variação de sinal foi observada, evidenciando-se nenhuma interação de fetuína com o anti-CRP (figura 29).

Como mostrado na figura 30, os componentes capacitivos reais e imaginários foram sensíveis somente ao potencial de meia onda (“redox in”), não respondendo a outros valores de potencial – “redox out”, demonstrando claramente que a presença do ferroceno no peptídeo sintetizado, domina os sinais eletrostáticos e iônicos, resultando apenas na resposta capacitiva do biossensor (ocorrem alterações nos valores das capacitâncias reais e imaginárias, como pode ser visto nos insertos da figura 30).

**Figura 29:** Resultados da interação da solução tampão, fetuína e CRP ( $10 \text{ nmol L}^{-1}$ ) com o biossensor obtido.



**Figura 30:** a) Variação da capacitância real do biossensor em função da frequência, no potencial de “redox in” (valores onde as medidas são realizadas) e “redox out”. b) Variação da capacitância imaginária do biossensor em função da frequência. Os insertos em (a) e (b) mostram a ampliação dos valores que se sofrem alterações significativas, enquanto que, no “redox out” nada ocorre.



A partir dos dados que foram obtidos da curva analítica foi possível fazer uma comparação entre os parâmetros encontrados para os biossensores contendo SAMs de peptídeos e contendo tióis, como pode ser visto na Tabela 3. Esta última é a metodologia mais utilizada atualmente para a imobilização de SAMs em eletrodos de ouro.

**Tabela 3:** Comparação dos parâmetros analíticos para a detecção eletroquímica de CRP em PBS (pH 7,4) utilizando biossensores contendo SAMs confeccionadas com o peptídeo e com tióis mistos.

Parâmetros	Peptídeo Eletroativo	SAM tiolada (Fernandes <i>et al.</i> , 2014)
Faixa Linear (nmol L <sup>-1</sup> )	0,5 – 10	0,5 – 10
$R^2$	0,98	0,98
Sensibilidade <sup>1</sup> (L nmol <sup>-1</sup> ΔC <sub>r</sub> <sup>-1</sup> )	386	1248
LDD <sup>2</sup> (nmol L <sup>-1</sup> )	0,80	0,24
$K_a$ <sup>3</sup> (L mol <sup>-1</sup> )	(1,4 ± 0,2) x 10 <sup>8</sup>	(5,0 ± 0,3) x 10 <sup>8</sup>

<sup>1</sup>obtida a partir do coeficiente angular da curva analítica; <sup>2</sup>limite de detecção; <sup>3</sup>constante de afinidade.

Algumas das diferenças encontradas comparando os biossensores formados com a monocamada de peptídeo e com a metodologia de alcanotióis estão apresentadas abaixo:

**Linearidade:** Em um estudo anterior, a abordagem de SAM formada por tióis (Fernandes *et al.*, 2014) mostrou linearidade na detecção de CRP na mesma faixa de concentração utilizada neste trabalho (0,5 a 10 nmol L<sup>-1</sup>). Valores acima e abaixo destas concentrações não foram avaliados.

**Sensibilidade:** O coeficiente angular da curva analítica obtido de biossensores montados em SAMs contendo tióis foi maior que o formado por peptídeos (Tabela 3), o que mostrou menor sensibilidade do biossensor contendo o peptídeo. Um fator importante para a obtenção de uma camada eletroativa é que o grupo redox esteja fisicamente perto do receptor (ou da região em que o evento de bioreconhecimento acontece) para ser sensível a estas mudanças. De fato, sugeriu-se que o grupo ferroceno existente no peptídeo (meio da cadeia), encontra-se em uma região com um acesso mais difícil do que aquele presente nos tióis (extremidade). Outro parâmetro que pode afetar a sensibilidade é a proximidade do grupo redox com o eletrodo de ouro, grandes distâncias podem afetar a transferência de elétrons entre o eletrodo de ouro e o grupo ativo redox, diminuindo a sensibilidade. Na verdade, a orientação teórica do peptídeo sugere que o grupo redox é mais distante no peptídeo do que no alcanotiol, diminuindo a sensibilidade.

Para tentar contornar os problemas acima encontrados, tanto em relação à síntese do peptídeo, quanto em relação à sensibilidade, uma nova cadeia peptídica foi desenhada.



### 4.3 SÍNTESE DO PEPTÍDEO 2

O peptídeo de sequência Fc-Lys-Ala-Ala-Cys-NH<sub>2</sub> foi desenhado inicialmente por ser de menor tamanho, possuir o grupo ferroceno ligado na extremidade da cadeia (como acontece na SAM de alcanotiol) e por não envolver uma etapa de desproteção do grupo Mtt.

Inicialmente o peptídeo Lys-Ala-Ala-Cys-NH<sub>2</sub> (sem ferroceno) foi sintetizado de acordo com a metodologia de síntese de peptídeo em fase sólida (SPFS) descrita no procedimento experimental, no entanto, sem a necessidade da desproteção seletiva do grupo Mtt da Lys.

A resina escolhida para essa síntese foi a Rink Amida (resina que possui ligado ao polímero o grupamento ácido 4-[(2',4'-dimetoxifenil)Fmoc-aminometil]fenoxiacetamido). A escala da síntese utilizada foi 0,2 mmol, partindo-se de uma massa inicial de resina de 384 mg. Os ativadores utilizados foram HBTU/NMM. Ao final da síntese, obteve-se uma massa de 524 mg de resina, sendo assim, houve um ganho de massa de 140 mg. Os dados estão resumidos na Tabela 4.

**Tabela 4:** Dados da Síntese da peptidil-resina Lys-Ala-Ala-Cys-RINK

Peptidil-Resina	Ganho de Massa (mg)	Ganho de massa teórico (mg)	Rendimento (%)
Lys-Ala-Ala-Cys-RINK	140	145,6	96 %

Como não há necessidade de desproteção seletiva de nenhum grupo protetor, utilizou-se o composto Fmoc-Lys(Boc)-OH, que é empregado normalmente na SPFS utilizando-se a química Fmoc. Este composto permite a desproteção do grupo ε amino livre somente na etapa de clivagem, sendo o escolhido para o posterior acoplamento do anticorpo (antes acoplado por meio dos grupos carboxilas).

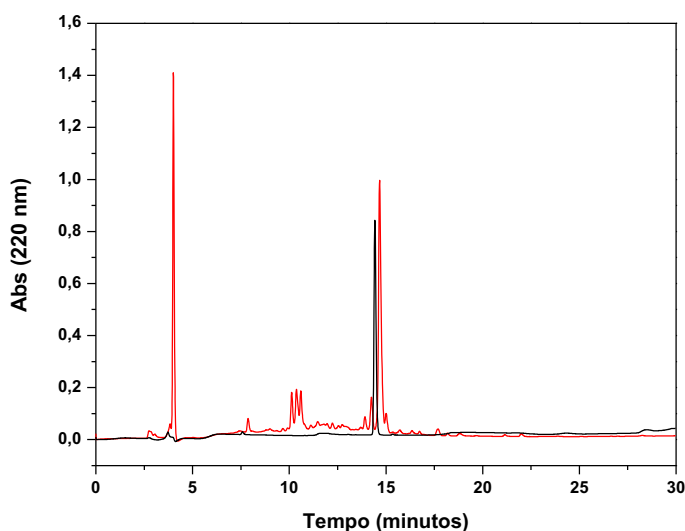
Para o acoplamento do grupo redox, partiu-se de uma escala 0,1 mmol de resina (262 mg de resina). O grupo redox escolhido foi o mesmo que o da síntese anterior: o ácido 3-ferrocenilpropiónico na forma de anidrido simétrico. No entanto, nesta síntese o ferroceno foi acoplado na extremidade N-terminal da cadeia peptídica principal, por meio do grupo α amino da Lys. No acoplamento foram utilizados 50 mg do anidrido de 3-ferrocenilpropiónico, durante 24 h. Após o acoplamento, o teste de ninidrina mostrou resultado negativo, indicando que o acoplamento havia sido realizado com sucesso.

A peptidil-resina obtida, contendo a molécula de ferroceno na sua extremidade amino, foi clivada com a mesma solução utilizada anteriormente: 4,5 mL de TFA/H<sub>2</sub>O/EDT/TIS

(94/2,5/2,5/1). Desta clivagem obteve-se 63 mg do peptídeo bruto, o perfil cromatográfico pode ser visto na figura 31 em vermelho, onde o pico com tempo de retenção em torno de 4 min refere-se ao peptídeo sem a presença do ferroceno (massa molar de  $390,51 \text{ g mol}^{-1}$ ) e o pico referente ao composto esperado, isto é, com a molécula de ferroceno acoplada, possui tempo de retenção em torno de 14,6 min (massa molar de  $631,51 \text{ g mol}^{-1}$ ). A presença de peptídeo sem o ferroceno foi novamente encontrada, indicando que o teste de ninidrina não foi eficiente para o acompanhamento da etapa de acoplamento. Este resultado também mostrou que o acoplamento do ácido 3-ferrocenilpropiónico é realmente difícil.

O peptídeo foi purificado em sistema CLAE semi-preparativo com os solventes A e B descritos anteriormente, em um programa de 20 a 65% de B em 90 min, sendo recolhido o pico do material contendo o ferroceno. Após a purificação, obteve-se uma massa de 4 mg de peptídeo puro, com grau de pureza de 99%, de acordo com o perfil cromatográfico mostrado na figura abaixo (em preto).

**Figura 31:** Perfil cromatográfico do peptídeo bruto em vermelho Fc-Lys-Ala-Ala-Cys. Perfil cromatográfico do peptídeo puro com 99% de pureza em preto. O pico referente ao peptídeo é o de 14,6 min. Coluna Analítica Fase Reversa C18, 4,6 mm x 150 mm, Ultrasphere Phenomenex com fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 220 nm,  $5 \mu\text{m}$ ,  $300 \text{ \AA}$ , programa gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 min.



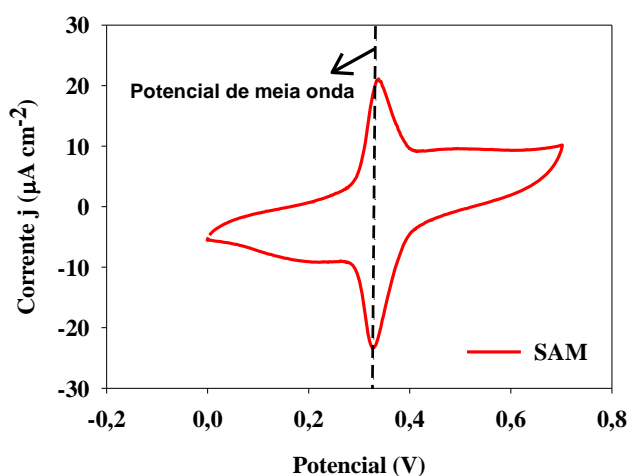
#### 4.4 DESENVOLVIMENTO DA MONOCAMADA PEPTÍDICA 2 E DO BIOSSENSOR

Uma vez que o peptídeo foi sintetizado e purificado com sucesso, partiu-se para a próxima etapa do trabalho: a confecção da SAM.

Novamente aqui o resíduo de Cys contido no peptídeo foi ligado covalentemente ao eletrodo de ouro, durante 16 h de imobilização. Posteriormente, no grupo  $\epsilon$ -amino do resíduo de Lys contido na extremidade N-terminal, foi acoplado o anticorpo anti-CRP por meio dos ativadores EDC/NHS. Nesse caso, os ativadores foram adicionados juntamente com o anticorpo, após a imobilização do peptídeo, no intuito de que os grupos carboxilas do anticorpo fossem ativados e acoplados aos grupos aminos livres presentes no peptídeo (cadeia lateral da Lys). Além disso, em sua cadeia principal, o peptídeo contém a sonda redox (molécula de ferroceno) acoplada na extremidade N-terminal, que neste caso está mais próxima do eletrodo de ouro e do anti-CRP que o peptídeo avaliado anteriormente.

Observando-se o gráfico da voltametria cíclica (figura 32) pôde-se verificar a formação da monocamada peptídica eletroativa, com os picos anódicos e catódicos bem visíveis, no entanto, com densidade de corrente muito maior do que a obtida anteriormente. O potencial de meia onda obtido para este sistema foi de 0,33 V em referência ao eletrodo Ag|AgCl.

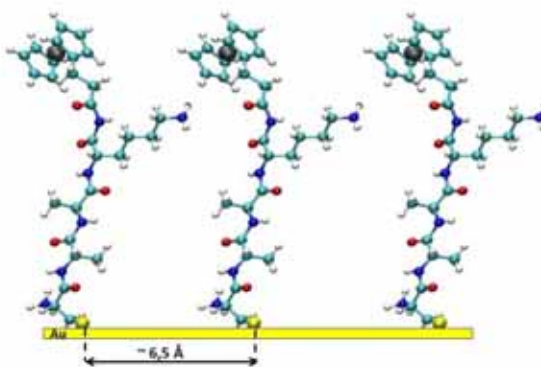
**Figura 32:** Voltametria cíclica (VC) do peptídeo redox. Nota-se a presença de picos catódicos e anódicos na curva da SAM do peptídeo. As medições foram realizadas a uma velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$  com potencial de 0,0 a 0,7 V (V x Ag | AgCl), utilizando  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  de solução TBAClO<sub>4</sub> como eletrólito suporte.



Realizando a integração dos picos de oxidação, foi possível estimar o grau de cobertura da superfície redox, que foi de aproximadamente  $3,0 \times 10^{-10}$  mol/cm<sup>2</sup>. Este valor foi muito mais próximo ao encontrado para as monocamadas constituídas de alcanotióis (aproximadamente  $4,4 \times 10^{-10}$  mol/cm<sup>2</sup> - Fernandes, *et al.*, 2014) e maior que o encontrado para o peptídeo anteriormente estudado ( $7,9 \times 10^{-11}$  mol/cm<sup>2</sup>).

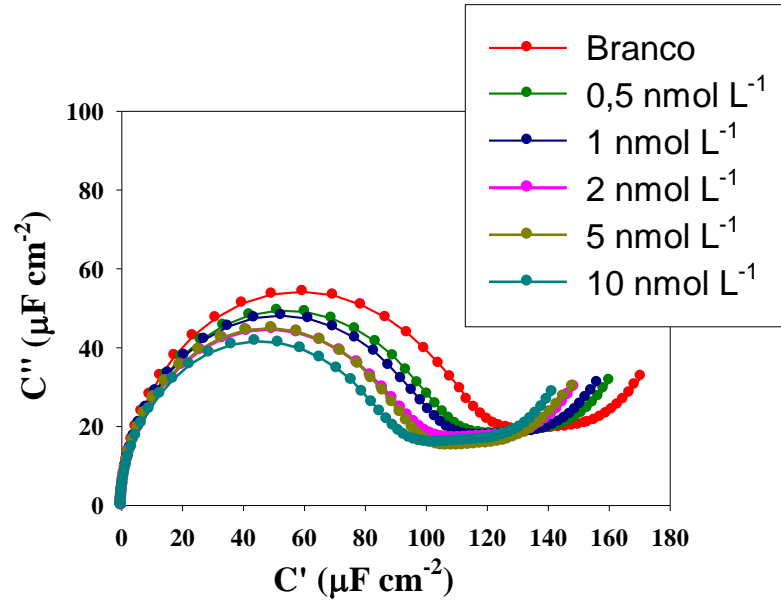
Este resultado mostra que, o desenho da nova sequência peptídica foi satisfatório. A cobertura de superfície mais elevada obtida para essa SAM deve-se ao fato de as cadeias peptídicas estarem mais compactadas do que a sintetizada anteriormente, como pode ser demonstrada na figura 33. A distância entre as cadeias diminuiu, sendo agora de aproximadamente 6,5 Å, tornando esse peptídeo mais próximo da SAM de alcanotiol, a qual apresenta distância entre as cadeias de aproximadamente 5 Å. É importante lembrar que a sonda redox nesse caso foi ligada à cadeia peptídica principal, e não na cadeia lateral da Lys como no peptídeo anterior, o que possibilitou o melhor grau de recobrimento molecular. A ligação do ferroceno no meio da cadeia dificultava o empacotamento das cadeias peptídicas.

**Figura 33:** Representação esquemática do peptídeo Fc-Lys-Ala-Ala-Cys-NH<sub>2</sub>



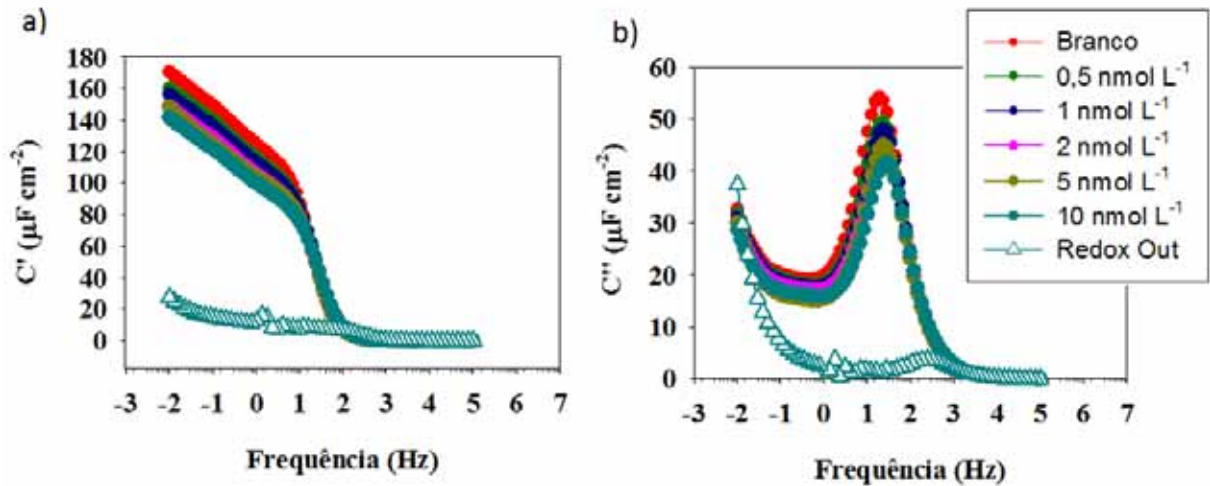
Na curva de Nyquist (figura 34), podem ser encontradas as variações da capacitância redox, que estão associados ao evento de ligação do alvo ao biossensor, isto é, a interação anticorpo-antígeno. A capacitância redox sofreu alterações muito mais significativas do que o biossensor anterior, demonstrando assim, uma maior sensibilidade. Utilizando a curva de Nyquist foi possível determinar os valores de capacitância redox em cada concentração de CRP para confecção da curva analítica.

**Figura 34:** Curva de Nyquist para os dados de capacitância do peptídeo eletroativo com anti-CRP funcionalizado em superfície de ouro, para várias concentrações de CRP.



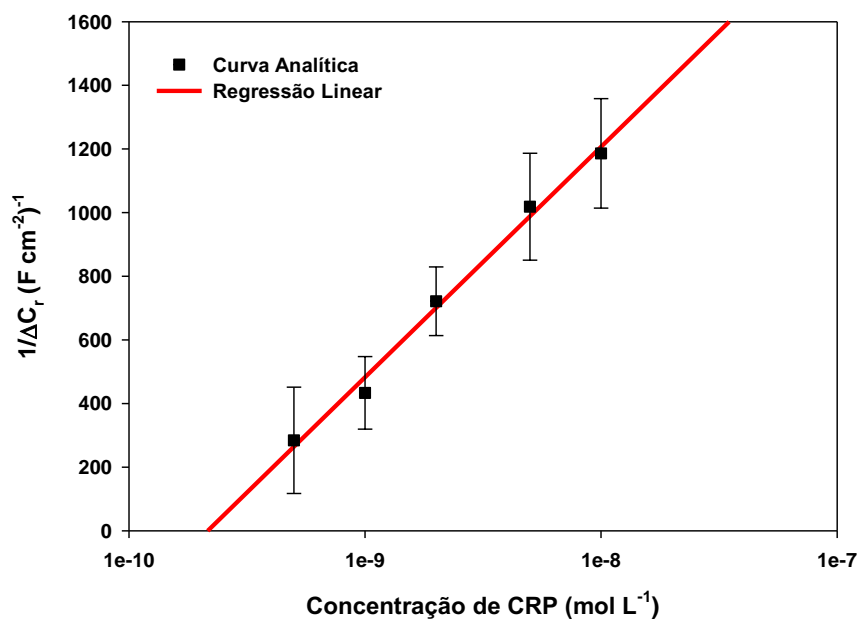
É importante ressaltar também que, como mostrado na figura 35, os componentes capacitivos reais e imaginários são sensíveis ao potencial de meia onda, mas não respondem ao potencial “redox out” (0,1 V), igualmente encontrado no estudo do biossensor anterior.

**Figura 35:** (a) Variação da capacitância real do biossensor em função da frequência, no potencial de “redox in” (valores onde as medidas são realizadas) e “redox out”. b) Variação da capacitância imaginária do biossensor em função da frequência.



A curva analítica foi obtida (figura 36), permitindo assim, o cálculo da constante de afinidade ( $K_a$ ) e LDD. Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 5.

**Figura 36:** Curva analítica obtida a partir dos dados da curva de Nyquist. A resposta linear é obtida traçando o inverso de  $\Delta C_r$  ( $1/\Delta C_r = 1/C_{r,[CRP]} - 1/C_{r,branco}$ , onde  $1/C_{r,branco}$  é o inverso da capacitância do biossensor depois de exposto à solução de PBS sem alvo), contra o logaritmo da concentração de CRP. O ajuste da regressão linear foi de 99%. Os dados foram obtidos no potencial de meia onda, ou seja 0,33 V vs Ag|AgCl.



**Tabela 5:** Comparação dos parâmetros analíticos para a detecção eletroquímica de CRP em PBS (pH 7,4) utilizando biossensores contendo SAM com o peptídeo e com alcanotióis mista.

Parâmetros	Peptídeo Eletroativo	SAM tiolada (Fernandes <i>et al.</i> , 2014)
Faixa Linear (nmol L <sup>-1</sup> )	0,5 – 10	0,5 – 10
$R^2$	0,99	0,98
Sensibilidade <sup>1</sup> (L nmol <sup>-1</sup> ΔC <sub>r</sub> <sup>-1</sup> )	724	1248
LDD <sup>2</sup> (nmol L <sup>-1</sup> )	0,31	0,24
$K_a$ <sup>3</sup> (L mol <sup>-1</sup> )	(5,3 ± 0,2) x 10 <sup>8</sup>	(5,0 ± 0,3) x 10 <sup>8</sup>

<sup>1</sup>obtida a partir do coeficiente angular da curva analítica; <sup>2</sup>limite de detecção; <sup>3</sup>constante de afinidade.

É importante destacar as diferenças encontradas ao comparar a nova monocamada de peptídeo com a metodologia de alcanotiol (a mesma utilizada para comparar os dados do peptídeo anteriormente estudado). Como encontrado no biossensor anterior, este mostrou linearidade na faixa de concentração entre 0,5 e 10 nmol L<sup>-1</sup>. Somado a isto, a sensibilidade encontrada para este biossensor ainda foi menor que a do biossensor contendo SAM alcanotiolada (Tabela 5). As distâncias do grupo redox em relação ao anticorpo (região em que o evento de bioreconhecimento acontece) e ao eletrodo de ouro foram menores, o que pode explicar o aumento da sensibilidade do biossensor (724 L nmol<sup>-1</sup>ΔC<sub>r</sub><sup>-1</sup> - Tabela 5).

Além disso, para o novo peptídeo sintetizado, o biossensor demonstrou um limite de detecção muito mais apropriado para a técnica de biossensoriamento, estando próximo ao valor referente à monocamada de alcanotiol.

A constante de afinidade encontrada aqui foi dentro do erro experimental, igual à obtida para o biossensor com monocamada de alcanotiol, sendo assim, pode-se inferir que, o sítio de ligação do CRP com o anticorpo nos dois biossensores foi o mesmo, apesar dos locais de acoplamento do anti-CRP às SAM terem sido em grupos diferentes. No peptídeo em estudo, este foi ligado aos grupamentos aminos, enquanto que no alcanotiol ele foi acoplado aos grupos carboxilas.

#### 4.5 COMPARAÇÕES DAS MONOCAMADAS PEPTÍDICAS OBTIDAS

Ambos os peptídeos utilizados permitiram a obtenção de monocamadas peptídicas com propriedades satisfatórias para a utilização de um biossensor para detecção da proteína C reativa.

Em relação à síntese, nota-se que, o segundo peptídeo foi mais fácil de ser obtido, uma vez que, não foi necessária a retirada do grupo protetor da cadeia lateral da Lys(Mtt), e o rendimento final e pureza obtidos foram maiores. Porém, mesmo com o acoplamento do ferroceno na cadeia peptídica principal, foi possível observar a presença de peptídeo sem o ferroceno, indicando que essa molécula apresenta dificuldades em seu acoplamento, o que pode estar relacionado ao seu tamanho. Isto poderia ser contornado, ou por meio do uso de maior excesso do composto contendo o ferroceno ou por meio de agentes acoplantes mais eficientes.

Comparando os biossensores obtidos contendo os dois peptídeos estudados, nota-se que o segundo peptídeo também apresentou os melhores resultados quando comparados ao primeiro. As diferenças que explicam este melhor resultado são:

- Tamanho da cadeia peptídica: varia de aproximadamente 17,5 Å para o peptídeo Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(fc)-Ala-Ala-COOH para 10,5 Å no Fc-Lys-Ala-Ala-Cys (ver figura 37), essa diferença de comprimento, possibilita que a carga acumulada na sonda redox, presente na cadeia de menor tamanho, sofra maiores alterações quando o evento de bioreconhecimento acontece (interação antígeno-anticorpo). Este fato pode ser demonstrado pelas maiores variações da capacitância redox obtida para o peptídeo de menor tamanho, e conseqüentemente a melhor sensibilidade ( $0,31 \text{ nmol L}^{-1}$ , ver tabela 6);
- Distância entre as cadeias peptídicas: varia de aproximadamente 13 Å para o peptídeo Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(fc)-Ala-Ala-COOH para 6,5 Å no Fc-Lys-Ala-Ala-Cys. Essa notória diferença de valores é refletida quando se calcula o recobrimento molecular, como pode ser visto na tabela 6. O peptídeo Fc-Lys-Ala-Ala-Cys apresentou um grau de recobrimento maior, demonstrando assim, que a sua monocamada está mais compactada, aumentando o número de cadeias peptídicas sobre o eletrodo de ouro;
- Facilidade de acesso ao ferroceno: no primeiro caso como a sonda redox está presente na cadeia lateral da Lys, e essa aparentemente está situada no meio da cadeia peptídica, pode-se concluir que, a capacidade de armazenamento de carga no ferroceno é comprometida devida a região em que se encontra, enquanto que, para o segundo



peptídeo, como o ferroceno encontra-se na região principal da cadeia, seu acesso é facilitado;

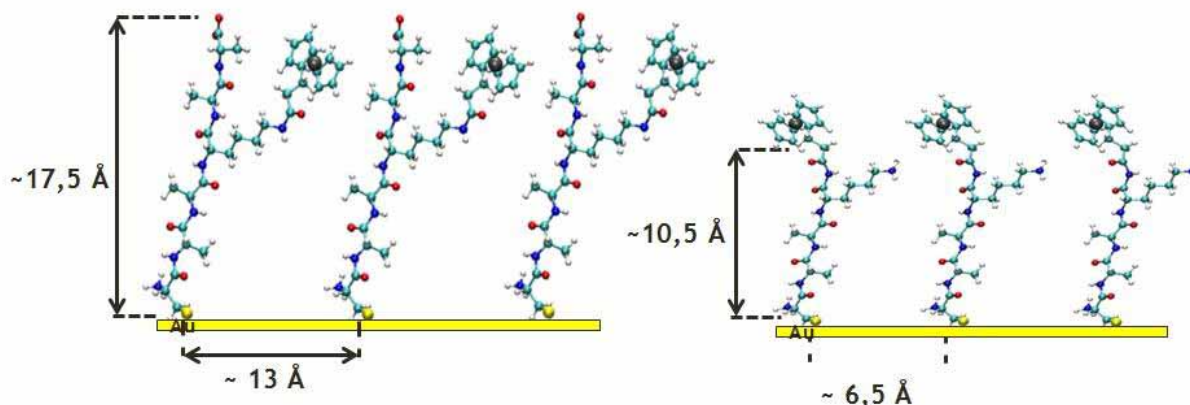
- Distância entre o ferroceno e a região de ligação do anticorpo: outro fator importante é o quanto próximo a sonda redox encontra-se da região onde ocorre a interação anticorpo-antígeno. No primeiro peptídeo, o ferroceno está na cadeia lateral da Lys, estipulando-se a distância entre a Lys e o grupo carboxila de aproximadamente 8 Å. No segundo peptídeo, tanto o ferroceno quanto o grupo amino encontram-se presentes no resíduo N-terminal da cadeia peptídica (Lys), estando mais próximos.

**Tabela 6:** Parâmetros analíticos para a detecção eletroquímica de CRP em PBS (pH 7,4) utilizando biossensores com SAMs constituídas pelos peptídeos eletroativos Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(fc)-Ala-Ala-COOH(anti-CRP) e Fc-Lys(anti-CRP)-Ala-Ala-Cys-NH<sub>2</sub> e monocamada de alcanotiol.

Parâmetros	Peptídeo Eletroativo 1 (Santos et al., 2014)	Peptídeo Eletroativo 2	SAM tiolada (Fernandes et al., 2014)
Faixa Linear (nmol L <sup>-1</sup> )	0,5 – 10	0,5 – 10	0,5 – 10
R <sup>2</sup>	0,98	0,99	0,98
Sensibilidade <sup>1</sup> (L nmol <sup>-1</sup> ΔC <sub>r</sub> <sup>-1</sup> )	386	724	1248
LDD <sup>2</sup> (nmol L <sup>-1</sup> )	0,80	0,31	0,24
K <sub>a</sub> <sup>3</sup> (L mol <sup>-1</sup> )	(1,4 ± 0,2) x 10 <sup>8</sup>	(5,0 ± 0,3) x 10 <sup>8</sup>	(5,0 ± 0,3) x 10 <sup>8</sup>
Recobrimento Molecular (mol/cm <sup>2</sup> )	7,9 x 10 <sup>-11</sup>	3,0 x 10 <sup>-10</sup>	4,4 x 10 <sup>-10</sup>

<sup>1</sup>obtida a partir do coeficiente angular da curva analítica; <sup>2</sup>limite de detecção; <sup>3</sup>constante de afinidade.

**Figura 37:** Representação esquemática das distâncias referentes às monocamadas peptídicas: (a) Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(fc)-Ala-Ala-COOH e (b) Fc-Lys-Ala-Ala-Cys.



## 5. CONCLUSÕES

A síntese de peptídeos em fase sólida possibilitou o desenvolvimento de dois peptídeos marcados com uma sonda redox, de importante função eletroquímica. Os peptídeos foram sintetizados contendo uma molécula de ferroceno, possibilitando assim, uma abordagem eletroanalítica.

Apesar das dificuldades apresentadas, a síntese do peptídeo contendo o ferroceno mostrou ser possível, no entanto, ainda precisa ser melhorada. As diferentes condições de síntese avaliadas demonstraram que, a retirada do grupamento Mtt e a solução utilizada na etapa de clivagem são importantes para o rendimento final. Além disso, na síntese do segundo peptídeo ficou evidente que o acoplamento do ferroceno na própria cadeia peptídica foi mais eficaz, obtendo-se maior quantidade de peptídeo puro com alto grau de pureza. Porém, mesmo nesse caso, ainda ocorre a presença do peptídeo sem ferroceno, o que leva a concluir que, o modo de acoplamento do composto contendo o ferroceno precisa ser otimizado.

Os peptídeos desenhados por nesse trabalho possibilitaram a formação de monocamadas auto-organizadas para a montagem de biossensores, confirmadas por meio das voltametrias cíclica realizadas após imobilização do peptídeo no eletrodo (presença dos picos anódicos e catódicos). As interfaces concebidas, as quais compreendem novos peptídeos eletroativos, foram adequadas para traduzir o evento de bioreconhecimento em concentrações a nível nanomolar do alvo (CRP 0,5-10 nmol L<sup>-1</sup>). A capacidade de detectar o alvo está relacionada com a resposta capacitiva da sonda redox ligada aos peptídeos, a qual se mostrou sensível a alterações no seu ambiente (interação anticorpo-antígeno).

Os biossensores obtidos pela técnica label free permitiram detectar e quantificar a proteína CRP com baixo limite de detecção ( $0,8 \text{ nmol L}^{-1}$  e  $0,31 \text{ nmol L}^{-1}$ ) por meio do biossensoriamento capacitivo redox.

Os resultados aqui apresentados destacam a utilidade e o promissor potencial de peptídeos eletroativos para o desenvolvimento de biossensores na detecção de diferentes biomarcadores utilizando capacitância redox.

## 6. REFERÊNCIAS

AMBLARD, M. et al. Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. **Molecular Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 239-254, 2006.

BARIŠIĆ, L. et al. The first ferrocene analogues of muramyl dipeptide. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 5, p. 678-684, 2011.

BERGGREN, C.; BJARNASON, B.; JOHANSSON, G. Capacitive biosensors. **Electroanalysis**, v. 13, n. 3, p. 173-180, 2001.

BOHUNICKY, B.; MOUSA, S. A. Biosensors: the new wave in cancer diagnosis. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 4, 2010. doi: 10.2147/NSA.S13465.

BRAULT, N. D. et al. Ultra-low fouling and functionalizable zwitterionic coatings grafted onto  $\text{SiO}_2$  via a biomimetic adhesive group for sensing and detection in complex media. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 10, p. 2276-2282, 2010.

BRYAN, T. et al. An optimised electrochemical biosensor for the label-free detection of C-reactive protein in blood. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 39, n. 1, p. 94-98, 2013.

BUENO, P. R.; DAVIS, J. J. Elucidating redox level dispersion and local dielectric effects within electroactive molecular films. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 4, p. 1977-2004, 2014a.

BUENO, P. R.; DAVIS, J. J. Measuring quantum capacitance in energetically addressable molecular layers. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 3, p. 1337-1341, 2014b.

BUENO, P. R.; FABREGAT-SANTIAGO, F.; DAVIS, J. J. Elucidating capacitance and resistance terms in confined electroactive molecular layers. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 1, p. 411-417, 2013.

BUENO, P. R.; MIZZON, G.; DAVIS, J. J. Capacitance spectroscopy: a versatile approach to resolving the redox density of states and kinetics in redox-active self-assembled monolayers. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 30, p. 8822-8829, 2012.

CHIRIACO, M. S. et al. On-chip screening for prostate cancer: an EIS microfluidic platform for contemporary detection of free and total PSA. **Analyst**, v. 138, n. 18, p. 5404-5410, 2013.

CORK, J.; JONES, R. M.; SAWYER, J. Low cost, disposable biosensors allow detection of antibodies with results equivalent to ELISA in 15 min. **Journal of Immunological Methods**, v. 387, n. 1/2, p. 140-146, 2013.

FAYAZFAR, H. et al. DNA impedance biosensor for detection of cancer, TP53 gene mutation, based on gold nanoparticles/aligned carbon nanotubes modified electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 836, p. 34-44, 2014.

FERNANDES, F. C. et al. Label free redox capacitive biosensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 50, p. 437-440, 2013.

FERNANDES, F. C. et al. Comparing label free electrochemical impedimetric and capacitive biosensing architectures. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 57, p. 96-102, 2014.

FIELDS, G. B.; NOBLE, R. L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 35, n. 3, p. 161-214, 1990.

GATTO, E.; VENANZI, M. Self-assembled monolayers formed by helical peptide building blocks: a new tool for bioinspired nanotechnology. **Polymer Journal**, v. 45, p. 468-480, 2013.

GOES, M. S. et al. A dielectric model of self-assembled monolayer interfaces by capacitive spectroscopy. **Langmuir**, v. 28, n. 25, p. 9689-9699, 2012.

GUNAWARDANA, C. G.; DIAMANDIS, E. P. High throughput proteomic strategies for identifying tumour-associated antigens. **Cancer Letters**, v. 249, n. 1, p. 110-119, 2007.

HORNER, S. R. et al. A proteomic biosensor for enteropathogenic E. coli. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 8, p. 1659-1963, 2006.

JOHNSON, A. et al. Sensitive affimer and antibody based impedimetric label-free assays for C-reactive protein. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 15, p. 6553-6560, 2012.

KAISER, E. et al. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 595-598, 1970.

KIRSCH, J. et al. Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and medicine. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 22, p. 8733-8768, 2013.

K'OWINO, I. O.; SADIK, O. A. Impedance spectroscopy: a powerful tool for rapid biomolecular screening and cell culture monitoring. **Electroanalysis**, v. 17, n. 23, p. 2101-2113, 2005.

LEE, H. J.; YOOK, J. G. Recent research trends of radio-frequency biosensors for biomolecular detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 61, p. 448-459, 2014.

LEHR, J. et al. Label-free capacitive diagnostics: exploiting local redox probe state occupancy. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 5, p. 2559-2564, 2014.

- LEITE, W. F. et al. Correlation between C-reactive protein in peripheral vein and coronary sinus in stable and unstable angina. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, 2014. doi:10.5935/abc.20140188.
- LI, D.; ELBERT, D. L. The kinetics of the removal of the N-methyltrityl (Mtt) group during the synthesis of branched peptides. **Journal of Peptide Research**, v. 60, n. 5, p. 300-303, 2002.
- LIN, J. et al. Impedance spectroscopy of bilayer membranes on single crystal silicon. **Biointerphases**, v. 3, n. 2, p. FA33-FA40, 2008.
- LIN, J. et al. Electrically addressable, biologically relevant surface-supported bilayers. **Langmuir**, v. 26, n. 14, p. 12054-12059, 2010.
- LI, J. et al. Peptide aptamers with biological and therapeutic applications. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 4215-4222, 2011.
- LISDAT, F.; SCHÄFER, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 5, p. 1555-1567, 2008.
- LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of detection, a closer look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 712-724, 1983.
- LOVE, J. C. et al. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 4, p. 1103-1169, 2005.
- LUO, X.; DAVIS, J. J. Electrical biosensors and the label free detection of protein disease biomarkers. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 13, p. 5944-5962, 2013.
- MARSH, B. J. et al. Fine-tuning of ferrocene redox potentials towards multiplex DNA detection. **New Journal of Chemistry**, v. 38, p. 5260-5263, 2014.
- MARTIĆ, S. et al. Ferrocene-peptido conjugates: from synthesis to sensory applications. **Dalton Transactions**, v. 40, n. 28, p. 7264-7290, 2011.
- MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. **Food Chemistry**, v. 77, n. 2, p. 237-256, 2002.
- MERRIFIELD, R. B. Solid-phase peptide synthesis. III. An improved synthesis of bradykinin. **Biochemistry**, v. 3, p. 1385-1390, 1964.
- MIKLÁN, Z. et al. New ferrocene containing peptide conjugates: synthesis and effect on human leukemia (HL-60) cells. **Biopolymers**, v. 88, n. 2, p. 108-114, 2007.
- RAY, S.; MEHTA, G.; SRIVASTAVA, S. Label-free detection techniques for protein microarrays: prospects, merits and challenges. **Proteomics**, v. 10, n. 4, p. 731-748, 2010.
- ROMANER, L. et al. The dielectric constant of self-assembled monolayers. **Advanced Functional**, v. 18, n. 24, p. 3999-4006, 2008.

SANTOS, A.; DAVIS, J. J.; BUENO, P. R. Fundamentals and applications of impedimetric and redox capacitive biosensors. **Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques**, 2014. doi: 10.4172/2155-9872.S7-016

SANTOS, A. et al. Impedance-derived electrochemical capacitance spectroscopy for the evaluation of lectin–glycoprotein binding affinity. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 62, p. 102-105, 2014a.

SANTOS, A. et al. Redox-tagged peptide for capacitive diagnostic assays. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 68, p. 281-287, 2014b.

SARKAR, P. et al. Amperometric biosensors for detection of the prostate cancer marker (PSA). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 238, n. 1/2, p. 1-9, 2002.

SATHYARAJ, G. et al. Ferrocene conjugated imidazolephenols as multichannel ditopic chemosensor for biologically active cations and anions. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 716, p. 150-158, 2012.

SONDAG-HUETHORST, J. A. M.; FOKKINK, L. G. J. Electrochemical characterization of functionalized alkanethiol monolayers on gold. **Langmuir**, v. 11, n. 6, p. 2237-2241, 1995.

THAKUR, M. S.; RAGAVAN, K. V. Biosensors in food processing. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 4, p. 625-641, 2013.

TOMIZAKI, K. Y.; USUI, K.; MIHARA, H. Protein-protein interactions and selection: array-based techniques for screening disease-associated biomarkers in predictive/early diagnosis. **FEBS Journal**, v. 277, n. 9, p. 1996-2005, 2010.

TOTHILL, I. E. Biosensors for cancer markers diagnosis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, n. 1, p. 55-62, 2009.

TRASATTI, S.; PETRII, O. A. Real surface area measurements in electrochemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 63, p. 711-734, 1991.

ULUDAG, Y.; TOTHILL, I. E. Cancer biomarker detection in serum samples using surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance sensors with nanoparticle signal amplification. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 14, p. 5898-5904, 2012.

VESTERGAARD, M. et al. A rapid label-free electrochemical detection and kinetic study of Alzheimer's amyloid beta aggregation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 34, p. 11892-11893, 2005.

WANG, J. Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 10, p. 1887-1892, 2006.

WULFKUHLE, J. D.; LIOTTA, L. A.; PETRICOIN, E. F. Proteomic applications for the early detection of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 4, p. 267-275, 2003.

XU, D. et al. Label-free electrochemical detection for aptamer-based array electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 16, p. 5107-5113, 2005.

ZHANG, S. et al. Highly sensitive electrochemical detection of immunospecies based on combination of Fc label and PPD film/gold nanoparticle amplification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 1, p. 129-135, 2008.