

Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho

Instituto de Química

Engenharia Química - Graduação

Isabelle Zacarias

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR CAPACITIVO PARA DIAGNÓSTICO DA  
DENGUE**

Araraquara

2022

Universidade Estadual Paulista – Júlio De Mesquita Filho

Instituto de Química

Engenharia Química - Graduação

Isabelle Zacarias

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR CAPACITIVO PARA DIAGNÓSTICO DA  
DENGUE**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Engenharia  
Química do Instituto de Química da UNESP  
Araraquara como requisito à obtenção do  
título de bacharel em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno

Coorientador: Dr. Adriano dos Santos

Araraquara

2022

Isabelle Zacarias

## DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR CAPACITIVO PARA DIAGNÓSTICO DA DENGUE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia Química do Instituto de Química da UNESP Araraquara como requisito à obtenção do título de bacharel em Engenharia Química.

**Orientador:** Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno

**Coorientador:** Dr. Adriano dos Santos

Araraquara, 20 de janeiro de 2022

BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_

por Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno

Ints. Doutor em Química

  
\_\_\_\_\_

Profa. Dra. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor

Ints. Doutora em Ciências

  
\_\_\_\_\_

Profa. Dra. Hideko Yamanaka

Ints. Doutora em Química

## **Agradecimentos**

Agradeço ao Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno por ter, em 2016, me proporcionado com a conclusão do meu estágio obrigatório do curso técnico e nos anos seguintes por todo o auxílio com o projeto de pesquisa sem o qual não teria conseguido realizar esse trabalho. Foram etapas de muito aprendizado e que levarei para a vida.

Agradeço também ao Dr. Adriano dos Santos que vem me auxiliando em todas as etapas desta pesquisa. Desde a elaboração do projeto de pesquisa para bolsa FAPESP, até a conclusão do presente trabalho. Me ensinando tanto sobre os conceitos técnicos, de difícil entendimento, quanto sobre o universo da academia de forma geral. Com seu auxílio consegui, não só experimentar o início de uma jornada como pesquisadora, mas também desenvolver competências que estão sendo muito valiosas no mercado de trabalho e na minha vida pessoal.

Agradeço também, ao grupo Nanobionics (Laís, Yuliana, Bea e Edgar) que se mostram sempre dispostos a me auxiliar. Em especial agradeço ao Prof. Dr. Martin Schwellberger Barbosa, essencial para a obtenção dos eletrodos microfabricados e que se tornou um ótimo parceiro de laboratório durante os experimentos de investigação de superfície. E ao Dr. Flávio C.B.Fernandes, primeiro orientador que tive ao entrar no grupo como IC.

Por fim, agradeço à FAPESP, que, pelo processo nº 2018/219111-5, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) forneceu auxílio financeiro para elaboração dos experimentos apresentados nesse trabalho.

## Resumo

A dengue é uma doença negligenciada que afeta severamente a população de diversas regiões de clima tropical ao redor do mundo, incluindo o Brasil. Essa doença é transmitida por meio da picada do mosquito *Aedes aegypti* infectado pelo vírus da dengue (DENV1-4). O diagnóstico da dengue pode ser realizado por duas abordagens diferentes, a Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR), que identifica a presença de RNA do vírus, ou pelo ensaio de imunoadsorção enzimático (ELISA), que detecta a presença de anticorpos e antígenos relacionados à doença. Como esses métodos são onerosos, necessitam de pessoal treinado para execução, e apresentam desafios técnicos para o desenvolvimento de metodologias portáteis, ideais para a testagem em massa da população de forma rápida, novos métodos bioanalíticos são necessários. Entre esses métodos, os biossensores capacitivos têm recebido destaque uma vez possibilitam o desenvolvimento de abordagens sensíveis, portáteis e de simples utilização. Nesse contexto, este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de uma abordagem eletroquímica capacitiva capaz de detectar a proteína não-específica 1 (NS1), uma espécie biomarcadora para o diagnóstico da dengue. Como superfície transdutora de sinal de reconhecimento biológico, utilizou-se wafer de silício revestido com ouro, posteriormente modificada com peptídeo modificado com ferroceno (Fc) Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH<sub>2</sub>. Como etapa inicial da construção do biossensor, realizou-se diferentes procedimentos de limpeza da superfície de ouro, seguidos de caracterização eletroquímica por voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). O procedimento de limpeza que obteve monocamada automontada de peptídeo com maior estabilidade ao longo do tempo é realizado por sucessivas lavagens com solventes orgânicos (álcool isopropílico, acetona) e água ultrapura em banho ultrassônico, seguido de UV/ozônio. Utilizando esse protocolo, o peptídeo eletroativo foi quimicamente adsorvido sobre o eletrodo, culminando numa superfície eletroativa com capacitância eletroquímica (C) de aproximadamente 180  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ . Como espécie de reconhecimento biológico, anticorpo anti-NS1 foi imobilizado sobre o eletrodo por meio do protocolo EDC/NHS, bloqueando os sítios remanescente com SuperBlock™ (PBS). Por meio dessa superfície e utilizando o inverso do sinal de capacitância (i.e.  $1/C_{dl}$ ) como sinal transdutor, foi possível detectar com sucesso a proteína NS1 na concentração 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , com cutoff de 3% (intervalo de confiança de 95%). O valor do sinal de transdução utilizando a proteína BSA como espécie não-específica ficou abaixo de 3%, evidenciando que a superfície reconhece de forma seletiva a proteína NS1. Os resultados desse trabalho demonstram a potencialidade da abordagem eletroquímica capacitiva no desenvolvimento de testes qualitativos (i.e. resultado positivo/negativo) para a dengue e, portanto, como potencial ferramenta para o diagnóstico dessa doença.

**Palavras-chave:** Eletroquímica; Biossensor; Dengue; Espectroscopia de impedância;

## Abstract

Dengue fever is a neglected disease that affects the population of many tropical regions around the globe, including Brazil. This disease is transmitted through the bite of infected *Aedes aegypti* mosquito. The diagnosis of Dengue can be made using two different methodologies: reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), which uses RNA to identify the virus, or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), that detects antibodies and/or antigens. Both methods are expensive and have high technical complexity, as well as intrinsic challenges for miniaturization. Such characteristics impose difficulties for mass population tests, which is an important step to control the spread of infectious diseases. Consequently, new bioanalytic methods emerge as potential tools for diagnosis. Among such methods, capacitive based biosensors are receiving more and more attention since they allow the development of a sensible, portable and easy methodology for diagnosis. In this context, this work goals to develop an electrochemical capacitive based methodology able to detect the non-specific protein of dengue (NS1), a protein biomarker for Dengue. Gold coated silicon wafer was used as electrode, and different cleaning protocols were assessed aiming to immobilize the ferrocene (Fc) modified peptide Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH<sub>2</sub> (pep-Fc) for redox capacitance biosensing. The bare surface as well as the modified gold surfaces were characterized using cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The cleaning procedure which yields more compact self-assembled monolayers (SAMs) comprises ultrasonic bath using a sequence of different organic solvents (isopropyl alcohol and acetone), and ultrapure water, followed by UV/Ozone. Using this cleaning protocol, the pep-Fc modified surface presented a capacitance of about 180  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ . The sensor surface was designed by immobilizing Anti-NS1 antibody (biological receptor) over the pep-Fc modified electrode by EDC/NHS protocol, followed by blocking step with SuperBlock™ (PBS). This system was able to detect selectively NS1 protein in the concentration of 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in phosphate buffer, with a 3% cutoff (95% of confidence interval), using the inverse of the electrochemical capacitance (i.e.  $1/C_{\mu}$ ) as signal transduction. Further studies in complex biological media, such human serum, will be performed in future works, but this study demonstrates the potential use of electrochemical capacitance-based methodology for Dengue diagnosis.

**Key-words:** Electrochemistry; Biosensor; Dengue; Impedance Spectroscopy;

## Lista de Figuras

- Figura 1 - (A) Estrutura do vírus da dengue. (B) O genoma do vírus da dengue possui regiões que codifica as proteínas estruturais e não-estruturais, além de apresentar duas regiões não-codificantes (UTR). Em destaque a proteína NS1, um importante biomarcador para o diagnóstico da dengue.....15
- Figura 2 - Etapas de contaminação do mosquito *Aedes aegypti* com o vírus da dengue e transmissão da doença.....16
- Figura 3 - Esquema ilustrativo e simplificado dos procedimentos para realização do RT-PCR .....18
- Figura 4 - Representação esquemática da metodologia ELISA indireto, correlacionando com fotos de uma placa para o ensaio. Na etapa A, é adicionado antígeno. Após a lavagem, na etapa B é adicionado a amostra contendo anticorpo alvo (biomarcador). Posteriormente, após a lavagem, é incubado o anticorpo secundário (etapa C). Após a lavagem, adiciona-se o revelador (etapa D), ocorrendo a reação colorimétrica, que pode ser interrompida por meio da adição de solução ácida (etapa E). A solução é então analisada para se obter a absorbância da luz num certo comprimento de onda. Por exemplo, no caso do substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) para a enzima HRP, faz-se a leitura em 450 nm.....20
- Figura 5 - Exemplo esquemático do funcionamento de biossensores .....23
- Figura 6 - Curvas de calibração obtidos para quantificação do vírus DENV-1 em tampão PBS, por técnica piezoelétrica (QCM), utilizando 3 sistemas de biossensor diferentes e uma faixa de concentração do analito de  $10^0$  a  $10^3$  pfu mL<sup>-1</sup>. Em vermelho: superfície de cristal modificada com oxido de grafeno (GO) e molécula polimérica impressa (MIP); Em azul: superfície de cristal modificadasomente com a molécula polimérica impressa (MIP); Em preto: Superfície de cristal modificada com oxido de grafeno (GO) e com molécula polimérica não-impressa (NIP); E, por fim, em verde: Sistema controle, biossensor já existente na literatura e que utiliza replicação viral para realizar a quantificação.....24
- Figura 7 - Curva de calibração: isoterma de Lagmuir para a variação entre o sinal SPR para cada concentração de proteína E em duas condições: para o eletrodo contendo receptor imobilizado covalentemente na superfície do ourto (preto), e para receptor adsorvido sobre o eletrodo (vermelho). .....25
- Figura 8 - Representação esquemática de uma monocamada na qual a superfície metálica, é o ouro. E a molécula biológica, é um tiol contendo grupo ligante (-SH) e cadeia de alcanos (-CH<sub>2</sub>-). As moléculas de tiol em conjunto formam, sobre a superfície, a monocamada que altera as propriedades do substrato.....29
- Figura 9 - Exemplo de resultados obtidos por um biossensor eletroquímico baseado em voltametria de pulso utilizado para detecção do material genômico (RNA) do vírus da dengue.

(A) voltametria cíclica e (B) voltametria de pulso diferencial, utilizando espécie eletroativa em solução. ....31

Figura 10 - Exemplo de resultados obtidos por um biossensor eletroquímico baseado espectroscopia de impedância eletroquímica, utilizado para detecção da proteína NS1 do vírus da dengue. (A) Diagrama de Nyquist, evidenciando a variação da resistência à transferência eletrônica em função da concentração do analito, NS1. (B) Resposta relativa do biossensor utilizando espécie específica (NS1) e não específica (fetuína). A maior variação do sinal de transdução da espécie específica demonstra a seletividade do dispositivo. (C) Curva de calibração obtida dos resultados mostrados em (A).....32

Figura 11 - Exemplo ilustrativo de uma monocamada eletroativa, onde é possível identificar a interação entre a monocamada e a superfície metálica, os grupos eletroativos, a interação entre a monocamada e o agente bioquímico e, por fim, a interação entre agente bioquímico e analito de interesse. ....35

Figura 12 - Fotografia do eletrodo tipo wafer, que possui área de 3 mm<sup>2</sup> (eletrodo de trabalho), e contatos elétricos de ouro para conexão com o potenciostato. ....42

Figura 13 - A Figura é uma representação da placa ELISA utilizada no experimento. Em cada linha foi adicionada uma concentração do antígeno, e cada coluna corresponde a uma replicata. As concentrações de NS1 em PB foram as seguintes: A. 5 ng/mL; B. 10 ng/mL; C. 50 ng/mL; D. 100 ng/mL; E. 200 ng/mL; F. 1000 ng/mL; G. Branco; H. Negativo, proteína HSA 1000 ng/mL. Figura à esquerda demonstra a cor dos poços antes e, à direita, após o fim da análise. Detalhes no texto.....45

Figura 14 - Exemplo de voltamograma obtido no processo de polimento eletroquímico do eletrodo de ouro. a) Durante varredura catódica, ocorre a redução de oxigênio a peróxido de hidrogênio (aprox. -0,16 V x Ag/AgCl, 3 M KCl). b) Região em que não ocorre processo faradáico, apenas corrente capacitiva é observada. c) Região de oxidação do ouro com formação de uma monocamada de óxido de ouro.<sup>43</sup> Cada conjunto de picos corresponde a uma orientação diferente da estrutura cristalina do ouro.<sup>42</sup> A parte hachurada (A) indica a região utilizada para o cálculo da área eletroativa da superfície do eletrodo, também conhecido como EASA (*electrochemical active surface area*).....49

Figura 15 - Exemplo de voltamograma e Diagrama de Nyquist para ouro modificado por monocamada de 6COH. A) Exemplo de voltamograma obtido para limpeza do eletrodo de ouro (vermelho) e após formação da SAM de 6COH. Condições: 1 mM de [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> em PB 120 mM contendo 200 mM de KNO<sub>3</sub>, pH 7,4. B) Diagrama de Nyquist impedimétrico obtido para o ouro limpo (vermelho) e após a formação da SAM de 6COH. Condições: potencial DC (potencial formal: 246 mV x Ag/AgCl), perturbação de 10 mV RMS, faixa de frequências de 100 KHz a 0,1 Hz, 50 frequências logaritmicamente espaçadas. Área eletroativa do eletrodo de 0,05 cm<sup>2</sup>.....51

Figura 16 - Resultado de voltametria (A) e AFM (B) para eletrodo tipo wafer. a) Voltamogramas obtidos em meio ácido para dois diferentes eletrodos tipo wafer limpos previamente com a



solução comercial de limpeza da Sigma. Condição: potenciais de 0,3 a 1,5 VxAg/AgCl, 5 ciclos. Velocidade de varredura de 100 mV/s. Ácido sulfúrico a 500 mM. Apenas o último ciclo é mostrado. b) Exemplo de imagem obtida por AFM, com área de 5x5  $\mu\text{m}^2$ , obtida em modo intermitente com taxa de varredura de 0,5 Hz.....52

Figura 17 - Exemplo de monocamadas sem (a) e com (b) defeitos. (a) Monocamada automontada (SAM), isenta de defeitos, formada sobre eletrodo de ouro. (c) Diagrama de Nyquist obtido para o eletrodo modificado com a monocamada de 16MHDA mergulhado numa solução de 12 mM de fosfato, pH 7,4. Potencial aplicado de 0,26 VxAg/AgCl, 3 M KCl, 10 mV de perturbação, frequências de  $10^5$  Hz – 0,1 Hz. (d) Gráfico de Bode para o módulo da impedância ( $|Z|$ ) e ângulo de fase ( $\varphi$ ). Os ajustes foram realizados utilizando o circuito equivalente mostrado em (c).....55

Figura 18 - Caracterizações por voltametria cíclica (A) e espectroscopia de impedância (B e C) da superfície de ouro com SAM de tiol aderida. Medidas realizadas ex-situ em solução de tampão PB 12 mM (pH 7.4) com 3M de  $\text{KNO}_3$ . Cada curva representa um tiol de cadeia diferente: o pentanotiol (em preto), o octanotiol (em vermelho) e dodecanotiol (em verde). Todas as amostras foram obtidas após 48 horas de incubação em temperatura ambiente em solução de etanol contendo 1mM do respectivo tiol. A voltametria cíclica foi realizada entre os potenciais 0.00 e 0.80 V com o eletrodo de Ag/AgCl, 3 M KCl como referência, e com velocidade de varredura de 100 mV/s. A espectroscopia foi realizada no potencial de 0.00 V (vs. Ag/AgCl, 3 M KCl) entre as frequências 0.1 e 100000 Hz.....58

Figura 19 - Voltametria cíclica (A) e espectroscopia de impedância (B) para a monocamada de peptídeo, realizadas ex-situ em solução TBA. A voltametria cíclica foi realizada entre os potenciais 0 e 0,8 V, com Ag/AgCl, 3 M KCl como eletrodo de referência e velocidade de varredura de 100 mV/s. A espectroscopia de impedância foi realizada no potencial formal do sistema (0,35 V) (vs. Ag/AgCl, 3 M KCl) entre 0,1 e 100.000 Hz.....59

Figura 20 - Espectroscopia de impedância para a monocamada de peptídeo. Cada curva representa uma medida sequencial para avaliação da estabilidade de uma mesma monocamada. A monocamada foi obtida após 18 horas de incubação, em temperatura ambiente e em solução de acetonitrila e água (1:1 volume) contendo 2 mM do peptídeo. Todas as medidas foram realizadas em cela convencional de três eletrodos no potencial formal do sistema ( $\approx 0,35\text{V}$  vs. Ag/AgCl, 3 M KCl), com frequências variando entre 0,1 e 100.000 Hz, e utilizando solução de TBA a 20 mM em água/acetonitrila (80/20, v/v). .....61

Figura 21 - Gráfico da densidade óptica (O.D,  $\lambda = 450 \text{ nm}$ ) para diferentes poços contendo concentrações diferentes de antígeno NS1 (ng/mL), mantendo o anticorpo anti-NS1 com concentração fixa de 1  $\mu\text{g/mL}$ . O ensaio foi realizado seguindo o protocolo padrão do ELISA indireto, utilizando seis concentrações diferentes do antígeno, um poço em branco (i.e., apenas solução tampão), e um poço contendo proteína HSA (1000 ng/mL) como negativo. ....62

Figura 22 - Etapas da modificação da superfície do eletrodo com o receptor, bloqueio e análise da estabilização do sinal. A curva em preto (Pep) corresponde à resposta da superfície após

imobilização do peptídeo, a curva em vermelho (Pep + Anti-NS1+Bloqueador) corresponde à superfície modificada com o peptídeo, com a proteína anti-NS1 e com o bloqueador, já as curvas E1, E2, E3 são as curvas correspondentes às medidas de estabilização do substrato, as curvas encontram-se sobrepostas uma à outra, e estão representadas pela cor azul, correspondente à última curva obtida.....63

Figura 23 – A) Espectroscopia de capacitância derivada da impedância para diferentes eletrodos modificados com peptídeo eletroativo e anticorpo anti-NS1. Cada curva representa uma medida em tempos diferentes, 30 minutos após imersão em PB (preto), e 60 minutos após imersão em PB (vermelho, que corresponde ao negativo), e com a adição do antígeno NS1 (verde) a 1 µg/mL em PB (amostra positiva). Os sinais relativos para as amostras positivas e negativas são mostrados em (B). A espectroscopia de impedância foi realizada no potencial formal do eletrodo modificado, variando a frequência entre 0,1 e 100.000 Hz, perturbação AC de 10 mV, e utilizando solução de TBA a 20 mM em água/acetoneitrila (80/20) como eletrólito de suporte.....65

Figura 24 - A) Resultado ilustrativo da espectroscopia de impedância para a análise de seletividade do biossensor. Cada curva representa uma medida em tempos diferentes, as curvas estão sobrepostas e são referentes à: 30 minutos após imersão em PB (E1, preto), 40 minutos após imersão em PB (E2, vermelho) e com a adição do antígeno BSA (verde), por 30 min. Importante notar que as curvas E1, E2 e BSA estão sobrepostas. A espectroscopia de impedância foi realizada no potencial formal de cada sistema (vs. Ag/AgCl, 3 M KCl) entre 0,1 e 100.000 Hz. B). Gráfico de barras para os resultados mostrado em A, comparados para um ensaio “positivo” e “negativo”.....67

## Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1</b>	<b>A problemática da dengue na sociedade contemporânea</b> .....	<b>10</b>
<b>1.2</b>	<b>Referencial teórico</b> .....	<b>14</b>
1.2.1	<i>Dengue: o vírus, transmissão e diagnóstico</i> .....	14
1.2.2	<i>Biossensores</i> .....	23
1.2.2.1	<i>Biossensores eletroquímicos</i> .....	26
1.2.2.2	<i>Espectroscopia de Capacitância Eletroquímica derivada da EIE</i> .....	33
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>36</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Reagentes</b> .....	<b>37</b>
<b>3.2</b>	<b>Caracterização dos substratos</b> .....	<b>38</b>
3.2.1	<i>Preparação do macro eletrodo (tarugo)</i> .....	39
3.2.2	<i>Preparação das superfícies dos eletrodos de wafer de silício revestidos com ouro.</i> .....	40
3.2.3	<i>Preparação do eletrodo de trabalho para aplicação em biossensores</i> .....	41
3.2.4	<i>Formação das monocamadas</i> .....	42
<b>3.3</b>	<b>Formação do biossensor</b> .....	<b>43</b>
<b>3.4</b>	<b>Medidas eletroquímicas</b> .....	<b>44</b>
<b>3.5</b>	<b>ELISA</b> .....	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>47</b>
<b>4.1</b>	<b>Preparação e caracterização da superfície de ouro</b> .....	<b>47</b>
<b>4.2</b>	<b>Modificação dos eletrodos tipo wafer com moléculas de tiol: avaliação eletroquímica</b> .....	<b>53</b>
<b>4.3</b>	<b>Teste da aplicabilidade da superfície para construção de um biossensor</b> .....	<b>58</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>68</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>69</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Este trabalho será iniciado com uma breve introdução à problemática da dengue na sociedade contemporânea, especialmente em evidenciar como o aquecimento global tem intensificado esse problema, e discutir algumas formas de enfrentamento à essa doença. Na sequência, serão apresentados maiores detalhes sobre a doença, seus métodos atuais de detecção, e sobre metodologias promissoras que estão em fase de prova de conceito (os biossensores). Sobre os biossensores, serão abordados e exemplificados os conceitos que suportam esses dispositivos. Finalmente, será dada ênfase nos biossensores eletroquímicos, em especial aqueles baseados na técnica de capacitância eletroquímica.

## 1.1 A problemática da dengue na sociedade contemporânea

O rápido crescimento da economia mundial, a urbanização e o significativo aumento da qualidade de vida da população têm levado a consideráveis problemas ambientais ao redor do mundo como, por exemplo, o desmatamento acelerado, a alta emissão de dióxido de carbono e de outros poluentes, assim como a geração de grande quantidade de resíduos não-biodegradáveis. Diversos estudos têm mostrado os efeitos negativos que a sociedade moderna tem causado ao ambiente e, entre esses efeitos, um dos mais discutidos é o aquecimento global.<sup>1; 2</sup>

O aquecimento global é definido como o aumento da temperatura média do planeta, decorrente tanto de causas naturais como antropogênicas. Desde a época pré-industrial, é possível observar um aumento consistente de 0,2 °C por década.<sup>1; 3</sup> Esse aumento na temperatura possui uma relação preocupante com as mudanças no regime de chuvas e, conseqüentemente, no comportamento da fauna e da flora.<sup>1; 4</sup> Exemplos expressivos e recentes foram as enchentes na Alemanha, ocorrida em julho de 2021, decorrente do aumento acentuado no volume de chuvas da região, causando desmoronamentos e alagamentos, afetando milhares de pessoas e ocasionando centenas de óbitos.<sup>5</sup> No mesmo período, o sudoeste do Canadá e o noroeste dos Estados Unidos vivenciaram ondas de calor (i.e. períodos prolongados de relativa alta temperatura),<sup>6</sup> com regiões chegando a 49°C.<sup>7</sup> Essas ondas de calor, que estão

umentando em frequência, intensidade e duração,<sup>6</sup> são responsáveis por incêndios florestais e agravam problemas de saúde, assim como podem levar ao óbito centenas de pessoas e animais.<sup>7</sup> Infelizmente, eventos como esses citados serão mais acentuados e frequentes com o passar do tempo.<sup>8</sup>

Embora enchentes e ondas de calor sejam notórios exemplos das consequências da ação humana desenfreada no planeta, mudanças mais sutis também ocorrem, como o caso da alteração no comportamento e reprodução de diversas espécies da flora e fauna. Um exemplo dessa mudança decorre diretamente do aumento da temperatura que, somado à mudança no regime de chuvas, favorece a proliferação exacerbada de vetores de doenças, como o *Aedes aegypti*, além de alterar permanentemente ecossistemas de diversas regiões.<sup>4; 9; 10</sup>

O *Aedes aegypti* é uma espécie de mosquito “doméstico” que se alimenta de sangue humano durante o dia e utiliza recipientes com água parada para procriação.<sup>11</sup> Esses recipientes podem ser tanto naturais (e.g. poças, plantas e lagoas), ou antropogênicos (e.g. garrafas, pneus velhos e vasos). Em épocas de chuva, esses materiais empoçam água e se tornam criadouros para o mosquito, aumentando a população da espécie nas áreas urbanas e semi-urbanas.<sup>12</sup> As regiões tropicais e subtropicais são as mais afetadas por sua presença por possuírem temperaturas médias acima de 20°C, ideais ao desenvolvimento do mosquito.<sup>9</sup>

Porém, devido às mudanças climáticas, é possível observar que regiões de clima não tropical que, originalmente, não apresentavam condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento do mosquito, começam a apresentar doenças transmitidas pelo mosquito, como a dengue. Exemplos de países que começam a enfrentar essa problemática, com tendência de acentuar com o passar dos anos, são os países do continente europeu e os Estados Unidos da América.<sup>9; 13; 14</sup> Essa tendência foi discutida por Messina et al.<sup>9</sup>, que apresentou a projeção do aumento das áreas onde a população está em risco de contrair a dengue, deixando evidente o crescimento da problemática e a importância de controlar o avanço da doença.

Além da dengue, o mosquito *Aedes aegypti* também é o responsável pela transmissão da zika e da chikungunya. Todas essas doenças infecciosas são transmitidas por sua picada e, dentre elas, a dengue receberá destaque nesse Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) devido à sua presença constante no Brasil.<sup>14</sup> As manifestações dessa doença podem variar entre assintomática e leve até a chamada *dengue hemorrágica*, sendo a última uma das formas mais graves da doença, e que aumenta as chances do paciente vir a óbito.<sup>9; 13; 14</sup>

Por conta da baixa oferta de uma imunização efetiva, uma vez que as vacinas ainda estão em desenvolvimento,<sup>15</sup> é muito importante o rápido diagnóstico da doença para que (i) ocorra um tratamento adequado do paciente, e (ii) os órgãos governamentais possam realizar rapidamente ações públicas que controlem a proliferação do vetor, minimizando o surgimento de endemias. Assim, diagnosticar os pacientes de forma rápida, precisa e acessível é uma medida importante para o controle da doença.<sup>13</sup> Por conta desse desafio, inúmeras pesquisas estão buscando o desenvolvimento de metodologias para o diagnóstico da dengue, especialmente no formato *point-of-care* (i.e. no local onde o paciente está).

Atualmente, os métodos padronizados e amplamente utilizados para o diagnóstico dessa doença são a Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR, do inglês *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*), e o ensaio de imunoabsorção enzimático (ELISA, do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*).<sup>15</sup> Apesar de ambos os métodos possuírem relativa alta sensibilidade, eles não são de fácil acesso a regiões economicamente menos desenvolvidas e geograficamente distantes (e.g. regiões florestais e/ou montanhosas). Tanto o RT-PCR quanto o ELISA necessitam de equipamentos sofisticados e relativamente caros, além de dependerem de procedimentos complexos que devem ser realizados por profissionais especializados.<sup>15</sup> Esses métodos também apresentam desafios técnicos para o desenvolvimento de metodologias miniaturizadas e de fácil manuseio, essenciais para um diagnóstico *point-of-care*. A somatória dos fatores citados dificulta a testagem em massa da população de forma

rápida, importante para o controle efetivo da doença.<sup>13</sup> Com objetivo de solucionar essa problemática, novos métodos bioanalíticos têm sido avaliados e, entre eles, os biossensores têm se destacado por serem uma alternativa economicamente viável e permitirem o uso de técnicas portáteis para o diagnóstico da dengue.<sup>16</sup>

Dentre os biossensores, aqueles que se baseiam em interfaces eletroativas têm se chamado a atenção de pesquisadores por sua sensibilidade sem a necessidade de utilizarem marcadores, como é o caso do ELISA.<sup>17</sup> Esses biossensores, que utilizam propriedades eletroquímicas como sinal transdutor (i.e. transformação de sinal de reconhecimento biológico em elétrico), permitem o desenvolvimento de dispositivos miniaturizados, ideais para o monitoramento da saúde da população, inclusive em regiões remotas.<sup>17</sup> Portanto, são ferramentas valiosas para o combate de doenças endêmicas e pandêmicas, como é o caso da dengue.

Fica evidente que o desenvolvimento de abordagem *point-of-care* utilizando a propriedades eletroquímicas, como a capacitância, no diagnóstico de doenças é altamente desejável. No entanto, a possibilidade do uso dessa abordagem está restrita, até o momento, numa configuração experimental em que se utilizam eletrodos convencionais (i.e. “tarugos” de ouro). Eletrodos tipo os de tarugo não são ideais para aplicação em campo, uma vez necessitam que sua superfície seja reconstruída entre um teste e outro, e essa reconstrução envolve polimento mecânico e químico,<sup>18</sup> o que torna inviável uma realização *in-locu*. E, por conta do alto custo desse material, também é inviável a utilização única de eletrodo por amostra, importante para evitar a contaminação entre amostras.

Uma alternativa aos eletrodos tarugo são os eletrodos micro-fabricados, que possuem um custo relativamente baixo (quando produzido em larga escala) e permitiriam um teste único por eletrodo, possibilitando o seu descarte e assim evitando contaminações cruzadas. Além disso, esses eletrodos também permitem a miniaturização do sistema de medida. Desta forma, os eletrodos micro-fabricados são uma oportunidade para criação de biossensores *point-of-care*. Porém, faz-se necessário a avaliação da performance desses eletrodos para o diagnóstico clínico.

Neste contexto, esse trabalho de conclusão de curso explora o uso de interfaces eletroativas para o desenvolvimento de biossensor para o diagnóstico da dengue, utilizando a capacitância eletroquímica como sinal transdutor. Maiores detalhes sobre o vírus, em especial sua transmissão e as técnicas padrão para o diagnóstico clínico serão discutidos na próxima seção. Posteriormente, como alternativa aos métodos atuais de diagnóstico, serão apresentados os biossensores, dando especial ênfase aos biossensores eletroquímicos baseados em capacitância eletroquímica. Finalmente, será apresentado os resultados dessa pesquisa, evidenciando ser possível transladar os conceitos científicos em uma possível tecnologia para a melhoria da qualidade de vida da população, em especial para o diagnóstico da dengue.

## **1.2 Referencial teórico**

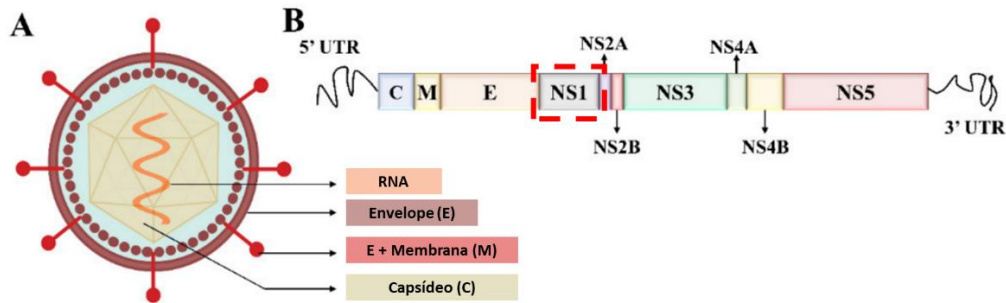
Nessa seção, serão discutidos detalhes sobre a dengue, sobre o vírus, transmissão e diagnóstico. Com relação aos métodos de diagnóstico, serão discutidos os seus pontos positivos e negativos e, como forma alternativa a esses métodos, aqui classificados como “clássicos” ou “padrões”, serão introduzidos os biossensores, e como os biossensores eletroquímicos baseados em superfícies eletroativas podem ser aplicados para diagnóstico da dengue.

### *1.2.1 Dengue: o vírus, transmissão e diagnóstico*

O vírus da dengue é um arbovírus de 40-60 nm<sup>19</sup> que pertence à família Flaviviridae, do gênero Flavivírus, e apresenta quatro sorotipos (DENV 1-4). Esse vírus possui fita simples de RNA positivo, (+)ssRNA, envolta por uma bicamada lipídica (Figura 1A). Seu material genético codifica 10 proteínas diferentes, sendo três estruturais e sete não-estruturais (Figura 1B). As proteínas estruturais são a de membrana (M), envelope viral (E), e nucleocapsídeo (C); enquanto as não-estruturais (NS) são a NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, e NS5.<sup>19</sup> Dentre essas proteínas, a NS1 é considerada como um importante biomarcador para diagnóstico da doença.



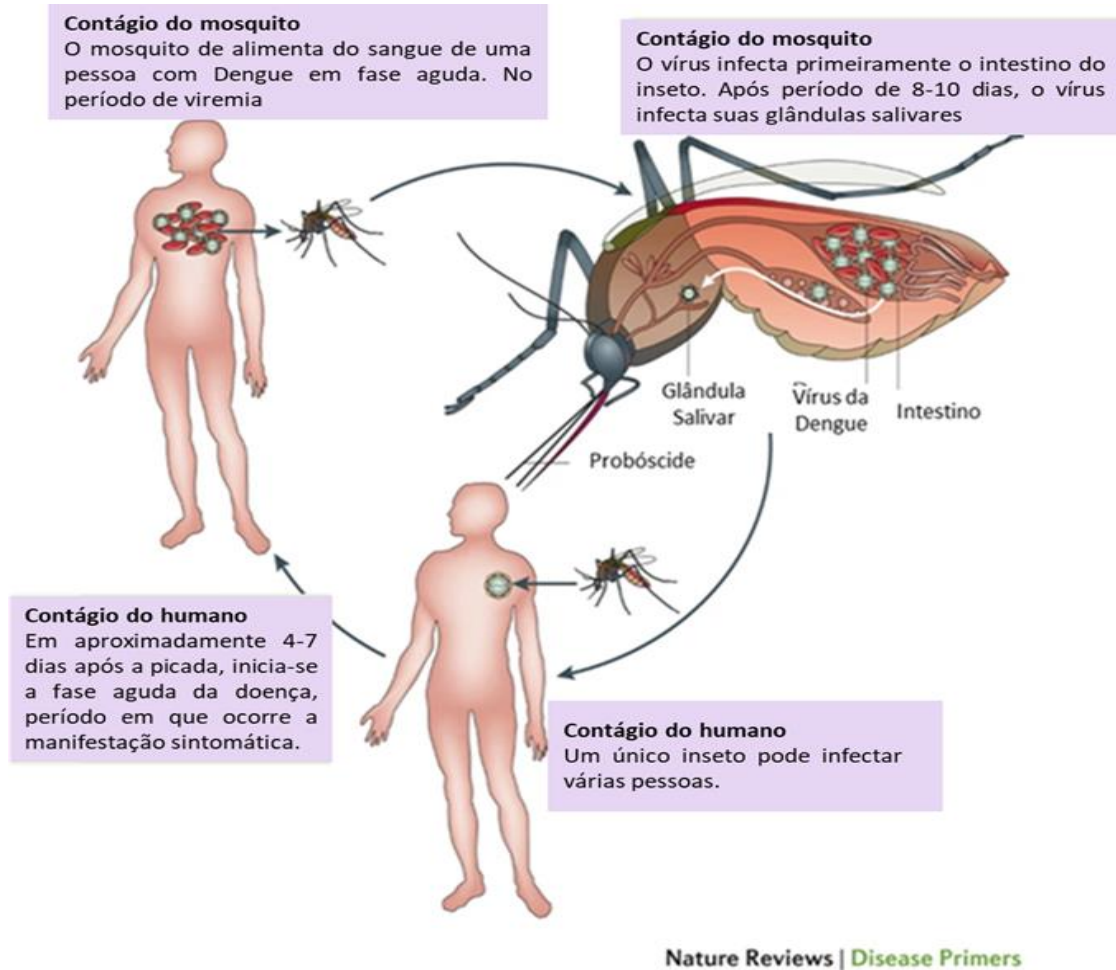
**Figura 1 -** (A) Estrutura do vírus da dengue. (B) O genoma do vírus da dengue possui regiões que codifica as proteínas estruturais e não-estruturais, além de apresentar duas regiões não-codificantes (UTR). Em destaque a proteína NS1, um importante biomarcador para o diagnóstico da dengue.



**Fonte:** Adaptado de Kabir et al.<sup>19</sup>

O contágio da dengue ocorre conforme descrito por Guzman et al.<sup>20</sup> e representado na Figura 2. Nesse processo, se faz necessário que um mosquito saudável entre em contato com o sangue de um paciente infectado que está em fase aguda (presença de sintomas clínicos), no período de viremia. Ao ingerir sangue infectado, o mosquito adquire também o vírus, que se aloja primeiramente no intestino do inseto. Após essa primeira infecção, o vírus migra para as glândulas salivares do *Aedes aegypti* que, a partir desse momento, se torna o vetor da doença. Conseqüentemente, ao picar uma pessoa saudável, ele transmite o vírus e um novo ciclo de contágio se reinicia. Ao longo de sua vida, um único inseto contaminado pode infectar várias pessoas (Figura 2).

**Figura 2** - Etapas de contaminação do mosquito *Aedes aegypti* com o vírus da dengue e transmissão da doença.



**Fonte:** Traduzido e adaptado de Guzman et al.<sup>20</sup>

O alto índice de contágio da doença (um único mosquito pode infectar várias pessoas) relacionado à grande concentração populacional, somado ao risco de morte ocasionado pela reinfecção viral, tem preocupado as autoridades dos países afetados. Dessa forma, aumentam as buscas por alternativas efetivas para controlar esse cenário que se agrava anualmente, intensificado pelas mudanças climáticas.<sup>14; 20</sup> Atualmente, o método mais efetivo de controle da dengue é o combate ao vetor da doença e, para isso, é necessário o rápido diagnóstico do paciente.<sup>13</sup>

Duas metodologias se destacam por apresentarem alta sensibilidade para o diagnóstico da dengue: o RT-PCR e o ELISA.<sup>12</sup> Essas metodologias utilizam como

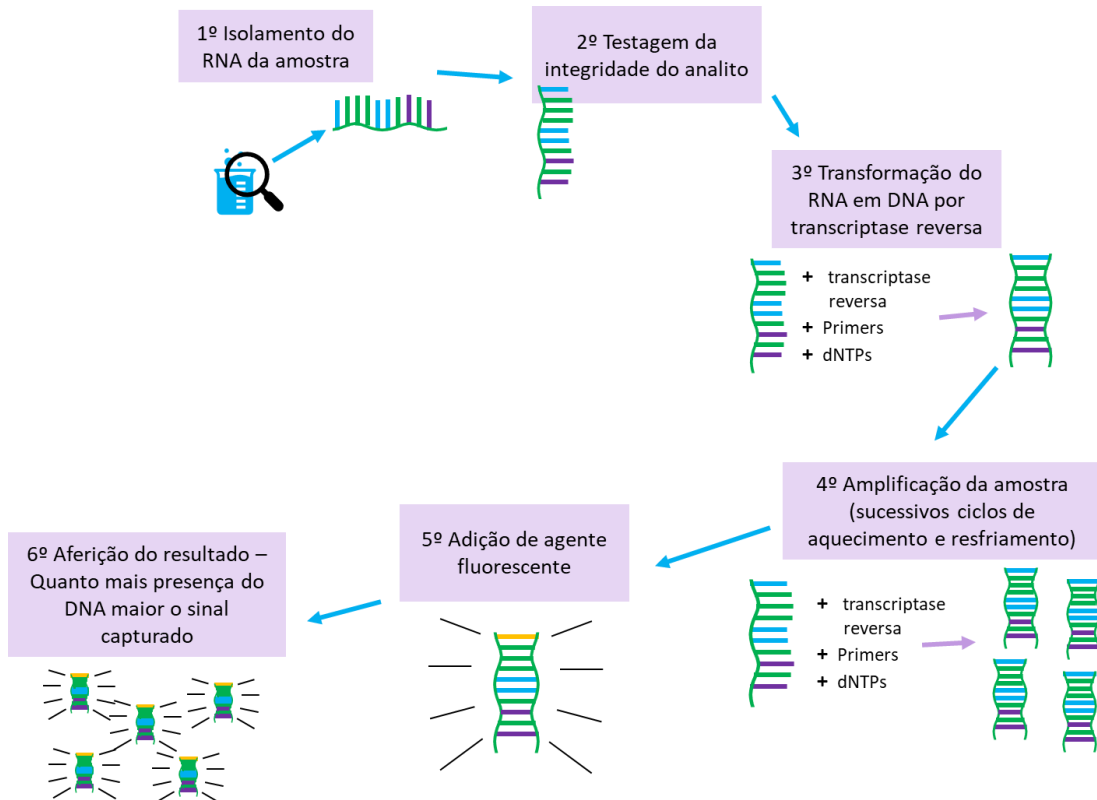
biomarcadores seu material genético (RNA viral), no caso do RT-PCR, e tanto os anticorpos *Anti-DENV IgG/IgM*, quanto os antígenos (e.g. *DENV NS1*) no caso do ELISA.<sup>16</sup> Além dessas abordagens, testes rápidos baseados em imunocromatografia de fluxo lateral também estão disponíveis, mas apresentam relativa baixa sensibilidade.<sup>16</sup>

O RT-PCR utiliza o soro do paciente como amostra clínica, e o RNA viral como analito ou biomarcador. O procedimento para realização do RT-PCR está resumidamente ilustrado na Figura 3.<sup>21</sup> A primeira etapa é a coleta da amostra e a extração do RNA. Para que ocorra o isolamento de forma eficiente, deve ser seguido uma sequência de etapas que podem ser realizadas utilizando kits comerciais. É muito importante evitar qualquer contaminação ou deterioração da amostra, uma vez que esses fatores podem comprometer o resultado do ensaio. Para garantir que a amostra não sofreu nenhuma deterioração durante a preparação, é necessária uma etapa para controle da qualidade do material que assegura a integridade das estruturas de RNA. Uma técnica comumente utilizada é a eletroforese em gel, que consiste na separação do RNA pelo seu tamanho e carga, resultando um “rastros” fluorescente (após revelação com material fluorescente), que é então analisado por algoritmo específico que possibilita avaliar o número de RNA íntegros. A resposta, expressa em RIN (do inglês *RNA integrity number*) representa a qualidade da amostra, com valor de 10 para a de maior qualidade.<sup>21; 22</sup>

Posteriormente, é necessário a transformação do RNA em DNA complementar (cDNA). Para isso, utiliza-se a proteína transcriptase reversa para gerar o cDNA a partir do RNA, um “primer” específico que reconhece a região do RNA e que tem a função de fornecer o ponto inicial da formação da fita complementar, assim como os dNTPs (desoxirribonucleotídeos fosfatados) que serão os blocos construtores da fita complementar. Posteriormente, é realizada a amplificação da amostra por meio do uso de “primers” específicos, dNTPs e a Taq polimerase (DNA polimerase), de forma a se obter maiores quantidades de cDNA após sucessivos ciclos que necessitam de aquecimento/resfriamento. Para obter o sinal para leitura e quantificação de cDNA, é

adicionado uma substância fluorescente. Quanto maior for a concentração do cDNA, maior será a intensidade da fluorescência da amostra.<sup>20</sup>

**Figura 3** - Esquema ilustrativo e simplificado dos procedimentos para realização do RT-PCR



**Fonte:** Elaborada pela autora, e baseado no trabalho de ADAMS<sup>22</sup>

Por utilizar RNA viral para diagnóstico, o RT-PCR é uma metodologia que possui sensibilidade relativamente alta, mas depende de diversas etapas de preparação. Como método de diagnóstico da dengue, ela deve ser realizada em aproximadamente 4-6 dias após o aparecimento dos primeiros sintomas.<sup>21</sup>

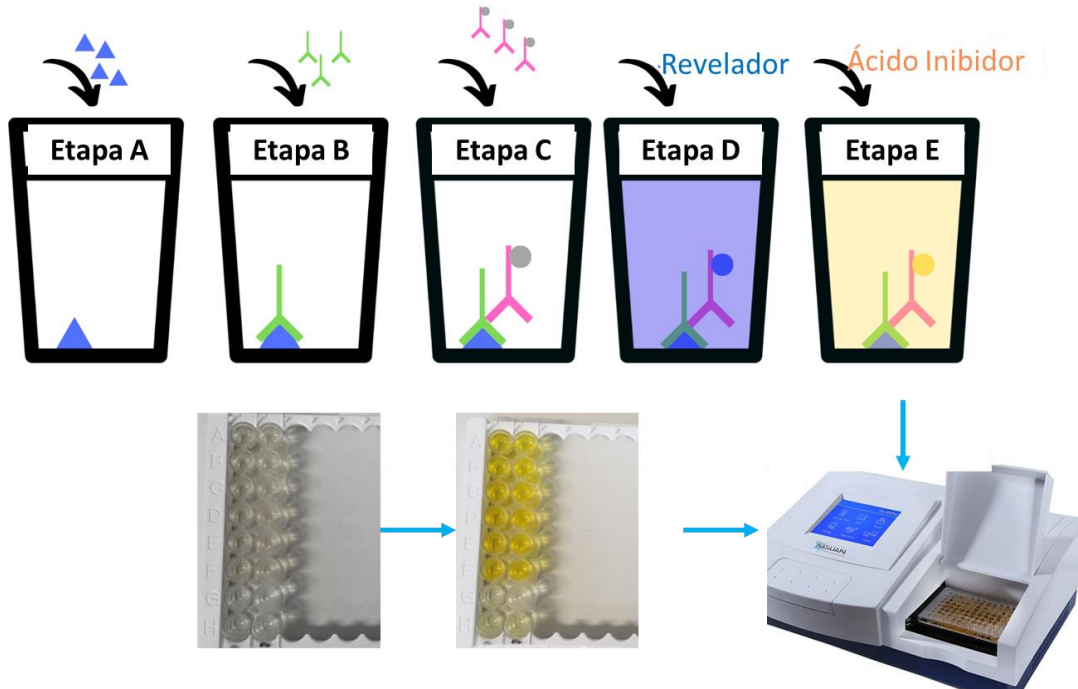
Outros biomarcadores utilizados como alternativa ao material genético são os antígenos e anticorpos IgM/IgG específicos, permitindo um intervalo de tempo maior do que o RT-PCR para o diagnóstico. A detecção dessas proteínas é explorada pelo método ELISA. Essa técnica permite, além da detecção, a quantificação do analito de interesse.<sup>23</sup> Existem diferentes métodos ELISA, sendo eles o método direto, indireto, sanduíche e competitivo (Quadro 1). Na Figura 4 é ilustrado as etapas de método ELISA indireto que recebe esse nome pois a detecção do antígeno se baseia em uma

reação entre o anticorpo primário (após reconhecer o antígeno na placa) e um anticorpo secundário marcado com enzima, geralmente a HRP (Etapas C e D da Figura 4). Após a adição do revelador (que contém o substrato para a enzima), ocorre reação enzimática, alterando a cor do meio reacional e, desta forma, sendo possível quantificar o anticorpo alvo por meio da técnica de Espectroscopia de UV-Vis, mensurando a absorvância da luz de um determinado comprimento de onda.<sup>24</sup>

Para o diagnóstico da dengue, no método ELISA utiliza-se o soro do paciente, e deve ser realizado a partir do dia 8 após início dos sintomas.<sup>21</sup> É uma técnica que depende de instrumentos de relativo alto custo e de pessoal treinado, e podem levar um tempo relativamente longo (dias a semanas) entre o primeiro dia de sintoma e o diagnóstico.<sup>15; 20</sup>

Um interessante biomarcador da dengue que pode ser explorado em ensaios ELISA é a proteína não-específica 1 (NS1). A NS1 é uma proteína secretada pela célula já contaminada, durante a reprodução viral.<sup>9; 25</sup> Ela está presente no soro sanguíneo de paciente em infecção primária e em infecção secundária, porém, em concentrações diferentes. Na primária, a concentração é de 0,04-2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto na secundária ela varia de 0,01-2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .<sup>24</sup> A detecção da NS1 possui uma sensibilidade alta logo nos primeiros sintomas da doença (primeiros 6 dias) e pode ser realizada utilizando amostra de soro do paciente.<sup>9; 21</sup> Desta forma, a detecção de NS1 desponta como uma alternativa viável para a detecção da doença.

**Figura 4** - Representação esquemática da metodologia ELISA indireto, correlacionando com fotos de uma placa para o ensaio. Na etapa A, é adicionado antígeno. Após a lavagem, na etapa B é adicionado a amostra contendo anticorpo alvo (biomarcador). Posteriormente, após a lavagem, é incubado o anticorpo secundário (etapa C). Após a lavagem, adiciona-se o revelador (etapa D), ocorrendo a reação colorimétrica, que pode ser interrompida por meio da adição de solução ácida (etapa E). A solução é então analisada para se obter a absorvância da luz num certo comprimento de onda. Por exemplo, no caso do substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) para a enzima HRP, faz-se a leitura em 450 nm.



**Fonte:** Elaborada pela autora

**Quadro 1** - Relação das principais vantagens e desvantagens de cada abordagem do ELISA

Abordagem ELISA	Vantagem	Desvantagem
Indireta	Mais sensível que a abordagem direta; precisa de menor quantidade de anticorpos marcados. Um anticorpo secundário pode interagir com diferentes anticorpos primários.	O anticorpo secundário pode interagir de maneira não-específica.
Direta	Requer menos etapas que os demais métodos. Boa metodologia para avaliar a resposta entre um antígeno e um anticorpo.	Não é possível amplificar o sinal, diminuindo a sensibilidade; para cada antígeno é necessária uma proteína específica diferente, com marcador acoplado, o que gera aumento no custo dos reagentes.
Sanduíche	De 2-5 vezes mais sensível que as abordagens anteriores. Apresenta maior especificidade. É necessário que ocorram duas interações específicas. Permite análise de amostras multiplexadas.	Pode ocorrer interação entre o anticorpo secundário e o anticorpo primário.
Competitiva (mais de uma metodologia)	Combina as vantagens das técnicas escolhidas, o que permite análise de amostras não tratadas; reprodutível (com pequena variação entre medidas); permite boa diluição da amostra sem afetar a medidas	As desvantagens dependem das metodologias escolhidas, e estarão diretamente associadas a elas.

**Fonte:** Adaptado de Bio Rad Antibodies<sup>23</sup>

Para realização da detecção de NS1 por método ELISA, a empresa *Eagle Bioscience* disponibiliza um kit comercial. Esse kit utiliza o método sanduíche, baseada na interação do tipo “chave-fechadura” que ocorre entre anticorpo e

antígeno. O kit fornece uma placa contendo vários “poços” já com anticorpos específicos para NS1 adsorvidos. A primeira etapa é a adição da amostra (soro, plasma ou cultura celular sobrenadante) a ser analisada (adição do antígeno). Após lavagem, adiciona-se o anticorpo primário conjugado à uma proteína peroxidase (HRP),<sup>26</sup> capaz de reconhecer outro epítipo do antígeno, formando um “sanduíche”.

Posteriormente, após etapas de lavagem e adição da solução reveladora desejada (contendo substrato TMB), a peroxidase catalisa reação, mudando sua cor inicialmente incolor para azul. Após tempo de reação, adiciona-se ácido sulfúrico para inibir a reação, conferindo à solução final coloração amarela, com absorvância máxima em  $\lambda = 450 \text{ nm}$ .<sup>26</sup> Como explicado no manual do kit, entre a adição de um reagente e outro é necessário lavar a amostra para assegurar que qualquer reagente (antígeno ou anticorpo) que não tiver reagido seja removido da solução. O resultado é então obtido pela aferição da absorvância da amostra, comparando-a à curva padrão. O limite de concentração do analito para detecção com ELISA é na ordem de  $10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$ , sendo uma técnica com sensibilidade relativamente alta para a maior parte das aplicações.<sup>26</sup> No entanto, embora seja uma metodologia de relativa alta sensibilidade, as diversas etapas na execução do ensaio se mostram como desafio para a miniaturização do método e para seu uso para testagem em massa e no local em que o paciente se encontra.

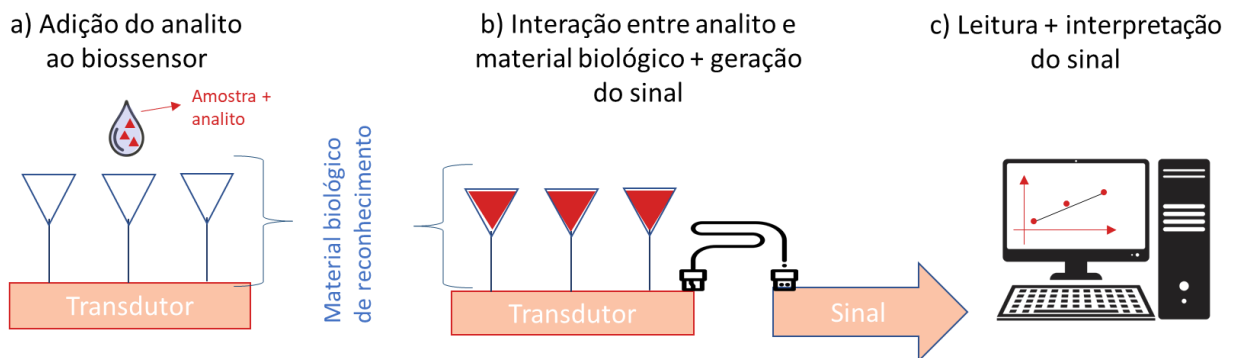
Como comentado anteriormente, tanto o RT-PCR quanto o ELISA apresentam desafios a serem superados para diagnóstico rápido, miniaturizado e de baixo custo. Portanto, diversas pesquisas estão sendo realizadas em busca de alternativas para essas metodologias.<sup>13; 15; 21</sup> Dentre essas alternativas, as que se destacam são os biossensores,<sup>16</sup> uma vez que atendem aos requisitos de miniaturização e sensibilidade, necessárias para o diagnóstico da dengue.



### 1.2.2 Biossensores

Os biossensores são dispositivos compostos por três elementos principais: material biológico ou receptor, transdutor e um leitor de sinal, como ilustrado na Figura 5. O material biológico (e.g., enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos, tecidos, etc.) deve interagir especificamente com o analito de interesse (biomarcador), e essa interação deve gerar um sinal perceptível ao transdutor. O transdutor realiza a conversão desse sinal bioquímico em um sinal mensurável (como o elétrico), que deve ser processado pelo “leitor de sinal”. Dessa forma, a interação bioquímica poderá ser interpretada como um resultado qualitativo (positivo/negativo) ou quantitativo, sendo o último baseado numa curva de calibração. Os biossensores permitem, portanto, a detecção e/ou quantificação de biomarcadores por meio do monitoramento de uma reação ou interação bioquímica.<sup>27</sup>

**Figura 5** - Exemplo esquemático do funcionamento de biossensores

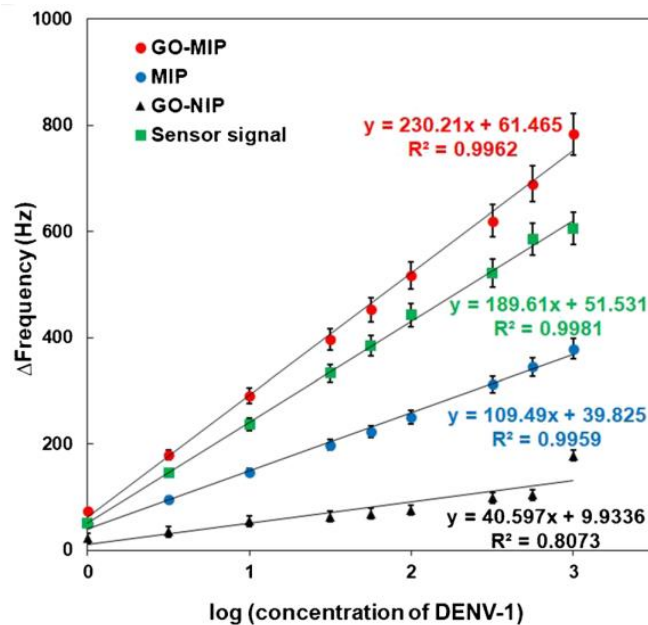


**Fonte:** Elaborada pela autora, baseado em Fatibello<sup>27</sup>

Os biossensores podem utilizar diversas metodologias para realizar a transdução do sinal biológico em um sinal analítico e, por isso, podem ser classificados de acordo com o tipo de transdutor utilizado (e.g., piezoelétrico, óptico, eletroquímico). Por exemplo, um biossensor piezoelétrico é aquele baseado na propriedade piezoelétrica de determinados materiais, como o quartzo, que são capazes de alterar sua frequência de oscilação de acordo com a massa adsorvida em sua face. Diversos biossensores piezoelétricos são desenvolvidos baseados na técnica de Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM, do inglês *quartz crystal microbalance*).<sup>27</sup> Na literatura

existem estudos promissores que comprovam a aplicabilidade desse método para diagnóstico da dengue. Um desses estudos foi relatado por Krongkaew et al. (2021).<sup>28</sup> Nesse estudo, foram utilizadas diferentes configurações de biomoléculas para atuação como material biológico na detecção do vírus DENV-1. Os resultados obtidos estão na Figura 6, que mostra a variação da frequência de oscilação do material piezoelétrico, previamente modificado com o receptor específico, em função da concentração do analito. A frequência é utilizada como sinal por ter uma relação direta com a massa adsorvida sobre o material piezoelétrico.

**Figura 6** - Curvas de calibração obtidos para quantificação do vírus DENV-1 em tampão PBS, por técnica piezoelétrica (QCM), utilizando 3 sistemas de biossensor diferentes e uma faixa de concentração do analito de  $10^0$  a  $10^3$  pfu mL<sup>-1</sup>. Em vermelho: superfície de cristal modificada com oxido de grafeno (GO) e molécula polimérica impressa (MIP); Em azul: superfície de cristal modificadasomente com a molécula polimérica impressa (MIP); Em preto: Superfície de cristal modificada com oxido de grafeno (GO) e com molécula polimérica não-impressa (NIP); E, por fim, em verde: Sistema controle, biossensor já existente na literatura e que utiliza replicação viral para realizar a quantificação.



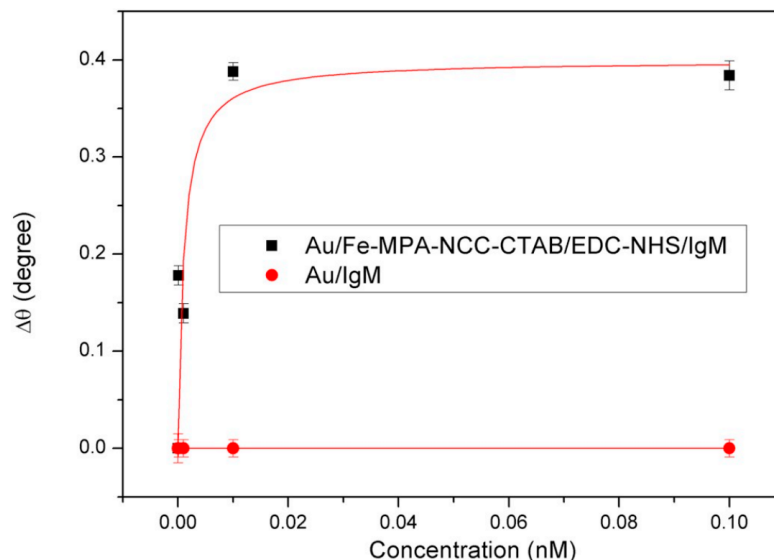
Fonte: Krongkaew<sup>28</sup>

Comparando os resultados obtidos para os sistemas propostos com aqueles já existentes na literatura (Figura 6, verde), os autores conseguiram reduzir o tempo de diagnóstico em 7 dias, retirando a necessidade de replicação viral pré-análise.<sup>28</sup>

Também mantiveram uma alta sensibilidade, conseguindo detectar concentrações de 50 pfu mL<sup>-1</sup>.<sup>28</sup>

Um outro exemplo de transdutor muito estudado na literatura são os ópticos, que utilizam as variações nas propriedades ópticas da interface sensora para a detecção do biomarcador.<sup>29</sup> Os biossensores ópticos são muito utilizados e vem recebendo destaque,<sup>29</sup> porém, esbarram em algumas limitações como a dificuldade de miniaturização. Um exemplo de sensor óptico é aquele baseado na técnica de ressonância de plásmons de superfície (*SPR – surface plasmon resonance*).<sup>30</sup> Nessa técnica, os plásmons de superfície entram em ressonância com o feixe de luz em determinados ângulos de incidência (ângulo SPR), que podem ser monitorados para avaliar a interação receptor-ligante. Essa propriedade foi explorada com sucesso no diagnóstico da dengue no trabalho descrito por Omar<sup>31</sup>, em que foi possível obter curva de calibração para a proteína E (Figura 7).

**Figura 7** - Curva de calibração: isoterma de Lagmuir para a variação entre o sinal SPR para cada concentração de proteína E em duas condições: para o eletrodo contendo receptor imobilizado covalentemente na superfície do ouro (preto), e para receptor adsorvido sobre o eletrodo (vermelho).



Fonte: Omar et. al<sup>31</sup>

Apesar de terem grande importância, tanto as técnicas de QCM quanto as de SPR possuem limitações com relação à portabilidade e custo, assim como apresentam relativa baixa sensibilidade. Por outro lado, as técnicas eletroquímicas vêm recebendo cada vez mais atenção uma vez que possuem grande sensibilidade e utilizam dispositivos de fácil miniaturização e custo relativamente baixo.<sup>15; 17; 32</sup>

Outra vantagem das metodologias eletroquímicas é a possibilidade de realizarem detecção *label-free*.<sup>15</sup> Detecções *label-free* dispensam a presença de marcadores específicos (como enzimas ou espécies fluorescentes utilizadas no ELISA), o que diminui o número de etapas envolvido no procedimento de análise, ideais para os dispositivos *point-of-care*.<sup>17</sup>

#### 1.2.2.1 *Biossensores eletroquímicos*

As metodologias eletroquímicas são especialmente interessantes para a detecção da dengue e de outras patologias da família dos *Flavivírus*. Essas técnicas oferecem alternativas mais econômicas e mais simples do que os métodos atuais “clássicos”.<sup>8; 9</sup>

Os biossensores eletroquímicos mensuram como sinal transdutor variações na corrente, na diferença de potencial e/ou nas propriedades elétricas do sistema (e.g. resistência e capacitância relacionadas a processos eletroquímicos) devido à interação receptor-ligante.<sup>30</sup> Para isso, é necessário que o biossensor tenha componentes que permitam a passagem de corrente elétrica (condutores), e que estejam acoplados a equipamentos que realizem a aplicação de potencial elétrico (potenciostato) ou corrente (galvanostato). A aplicação de potencial/corrente é realizada numa célula eletroquímica constituída de eletrodo de trabalho, contra-eletrodo, eletrodo de referência e uma solução (eletrólito de suporte) que submerge os três eletrodos.<sup>30</sup>

O eletrodo de trabalho é aquele em que os processos eletroquímicos são monitorados e, portanto, ele deve ser modificado convenientemente (e.g. imobilização de receptores biológicos) para que o sinal de reconhecimento biológico seja detectado. De forma geral, no eletrodo de trabalho é aplicado um potencial elétrico que deve ser relativo ao potencial de um eletrodo de referência, de potencial constante (e.g. Ag/AgCl, 3M KCl para eletrólito de suporte aquoso). O contra-eletrodo, de maior área geométrica que o de trabalho (na ordem de 10x ou mais), atua como elemento de passagem de elétrica, de forma a evitar que se flua corrente elétrica no eletrodo de referência. Isso garante que o eletrodo de referência não sofra alterações químicas durante a realização das medidas eletroquímicas, o que alteraria seu potencial e, portanto, perturbaria o ensaio eletroquímico. Por fim, o “contato elétrico” entre os eletrodos é realizado pelo eletrólito de suporte, que é uma solução salina (geralmente KCl, solução tampão fosfato salino,  $\text{KNO}_3$ , dentre outros). Desta forma, o “contato elétrico” é realizado por meio do movimento dos íons na solução sobre atuação de campo elétrico nos eletrodos.<sup>30</sup>

Por se tratar de um componente importante na célula eletroquímica, a escolha e o tratamento da superfície do eletrodo de trabalho são etapas essenciais no desenvolvimento do biossensor. Nesta superfície será realizada a imobilização da espécie biológica receptora, e a estabilidade e reprodutibilidade da interação entre essa superfície e o elemento de reconhecimento impactará diretamente na qualidade do sinal que será analisado.<sup>17</sup> Existem várias possibilidades para essa superfície já documentadas na literatura, porém as superfícies de ouro recebem cada vez mais destaque.<sup>17</sup> O ouro é um metal nobre, que possui como vantagens a resistência à oxidação em temperatura ambiente e a afinidade às moléculas contendo grupo sulfidril (-SH). Por meio dessa afinidade, ocorre forte adsorção química entre a molécula orgânica sobre a superfície, possibilitando a formação de monocamadas automontadas (SAMs, do inglês *self-assembled monolayers*).<sup>17</sup>

As SAMs atuam como uma “ponte” que conecta o receptor biológico à superfície do eletrodo de trabalho. As monocamadas, como a representada na Figura 8, são

adsorvidas de maneira espontânea quando a solução dessas moléculas entra em contato com a superfície metálica. Essa primeira etapa é cineticamente favorável e ocorre rapidamente, na ordem de milésimos de segundos. Entretanto, devido às interações intermoleculares entre moléculas adsorvidas, inicia-se processo de organização da monocamada, de forma a atingir a estabilidade energética. Essa etapa é relativamente mais lenta, necessitando de horas a dias para finalizar. Durante o processo de formação da monocamada, podem ocorrer mudanças na estrutura em condições ambiente. Por isso, as SAMs são denominadas estruturas dinâmicas. A reorganização da monocamada depende da interação entre as próprias moléculas adsorvidas, que buscarão minimizar a energia do sistema e a interação dessas moléculas com a superfície.<sup>33; 34</sup>

Naturalmente, durante esse processo de reorganização surgem defeitos intrínsecos e extrínsecos na estrutura, chamados *pin-holes*. Apesar de natural, é possível diminuir a ocorrência desses defeitos de maneira que não influenciam significativamente nas propriedades da monocamada. O surgimento dos *pin-holes* tem dois motivos: os intrínsecos, que não são controláveis, e os extrínsecos, controláveis. Sabe-se que um dos fatores extrínsecos para o aparecimento desses defeitos é a qualidade do substrato.<sup>34</sup>

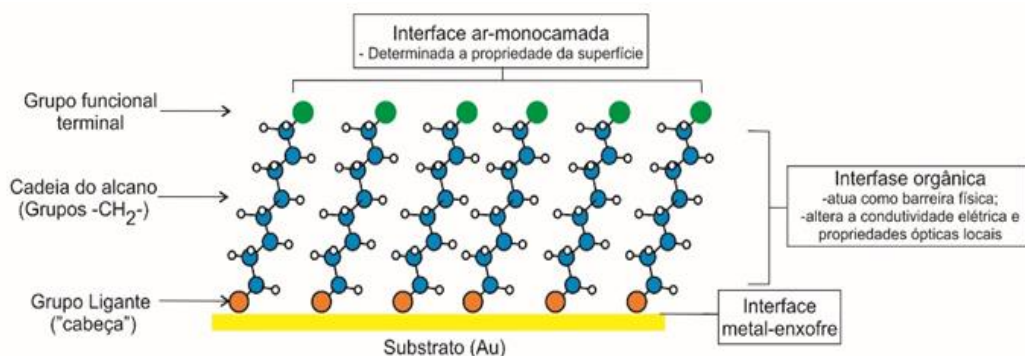
Por isso, apesar das vantagens citadas, a superfície de ouro também necessita de pré-tratamentos para garantir que ela apresentará baixa rugosidade e que esteja sem a presença de impurezas, características essenciais para controlar o aparecimento dos *pin-holes*.<sup>34</sup> Objetivando respostas estáveis e reprodutíveis, são adotados os mais diversos tratamentos da superfície como o polimento físico e o eletroquímico, para assegurar as características ideais do substrato.<sup>17</sup> Atualmente, estudos como o realizado por Tkac et al.<sup>17</sup> para o ouro policristalino propõe procedimentos de polimento mecânico e eletroquímico. O polimento mecânico diminui a rugosidade da superfície, enquanto polimento eletroquímico elimina possíveis contaminantes que estejam presentes.<sup>20</sup> Estudos de nosso grupo de pesquisa possibilitou a criação de

um protocolo de limpeza de superfícies policristalinas para garantir a obtenção de SAMs de forma reprodutível.<sup>35</sup>

Alternativamente às superfícies policristalinas, as cristalinas (e.g., obtidos por sputtering sobre wafer de silício) apresentam o potencial de já serem fabricados com baixa rugosidade e alta pureza e, especialmente, possibilitam a obtenção de eletrodos sob medida. Os eletrodos micro-fabricados permitiriam o desenvolvimento de abordagens portáteis para diagnóstico. Entretanto, são superfícies mais delicadas que os eletrodos de “tarugo” de ouro e necessitam de atenção especial no processo de limpeza.

Uma vez obtida a superfície biossensora, existem diferentes técnicas eletroquímicas que podem ser utilizadas para o monitoramento do sinal de reconhecimento biológico em biossensores. Dentre elas, se destacam as técnicas voltamétricas (como a voltametria cíclica e técnicas pulsadas, como a de pulso diferencial) e a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).<sup>15; 17</sup>

**Figura 8** - Representação esquemática de uma monocamada na qual a superfície metálica, é o ouro. E a molécula biológica, é um tiol contendo grupo ligante (-SH) e cadeia de alcanos (-CH<sub>2</sub>-). As moléculas de tiol em conjunto formam, sobre a superfície, a monocamada que altera as propriedades do substrato.



**Fonte:** Acervo do Grupo de Pesquisa Nanobionics, Instituto de Química da Unesp

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica que consiste em realizar uma varredura de potencial elétrico no sistema e acompanhar a variação da corrente elétrica relacionada.<sup>36</sup> A corrente do sistema varia de acordo com a cinética da reação eletroquímica das espécies presentes na amostra ou no sistema eletroquímico, que

dependente do potencial aplicado, da concentração dos reagentes e da velocidade de varredura dos potenciais.<sup>36</sup> Essa técnica, por ser de relativa baixa sensibilidade que as demais técnicas eletroquímicas, é comumente utilizada na caracterização das interfaces sensoras.

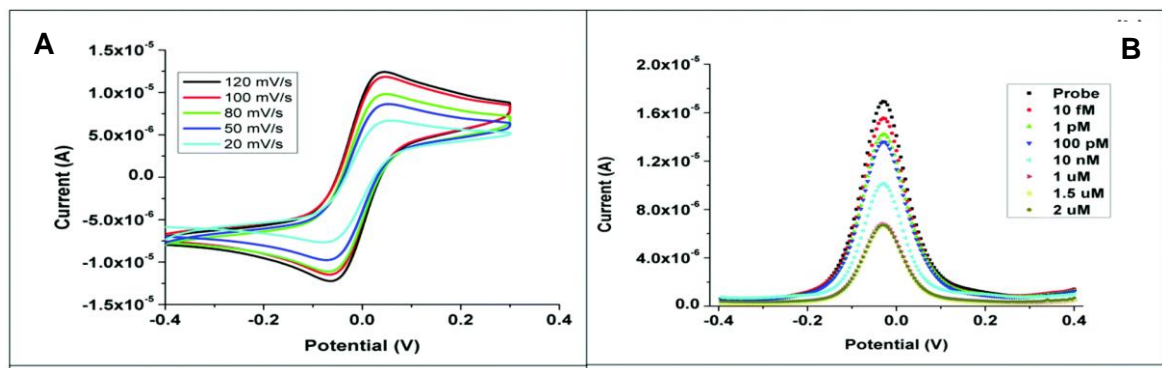
Por outro lado, técnicas pulsadas, como o caso da voltametria de pulso diferencial, por possibilitarem a remoção de corrente elétrica não-faradáica (i.e. corrente iônica) da corrente faradáica (i.e. proveniente de reações de oxi-redução), são as mais utilizadas. Exemplo de biossensor eletroquímico baseado na voltametria de pulso diferencial para o diagnóstico da dengue é mostrado no trabalho de Tripathy et al.<sup>36</sup>. Nesse trabalho, os autores realizam o diagnóstico da dengue utilizando material genômico como biomarcador da doença, uma sequência específica do RNA presente nos quatro sorotipos de vírus. A superfície transdutora do biossensor desenvolvido nesta abordagem consiste em um filme de ouro eletrodepositado em eletrodo de titânio. Essa superfície foi modificada com uma monocamada de tiol, responsável por ancorar as estruturas de ácidos nucleicos (RNA) como receptores. O RNA realiza a interação com o biomarcador, produzindo um sinal bioquímico mensurado pelo transdutor. Para que esse sinal ocorra, espécie eletroativa ( $\text{Fe}^{2+/3+}$ ) foi adicionada ao eletrólito de suporte.

O mecanismo responsável pelo processo de detecção/quantificação atua da seguinte maneira: durante a aplicação de uma diferença de potencial na célula eletroquímica de três eletrodos, as espécies eletroativas sofrem reação de oxi-redução no eletrodo de trabalho (representado por PROBE na Figura 9B). O aumento da concentração da molécula alvo acarreta num decréscimo significativo da corrente, como observado na Figura 9.<sup>36</sup> A diminuição da corrente, nesse caso, está associada ao bloqueio do processo de transferência de elétrons entre a espécie eletroativa e o eletrodo, ocasionado pela mudança na propriedade isolante do filme sob o eletrodo de trabalho, decorrente da interação entre a espécie receptora e a molécula alvo. A variação da corrente pode ser acompanhada tanto por voltametria cíclica (Figura 9A) como por voltametria de pulso diferencial (Figura 9B) sendo a última a mais sensível.



A variação do pico de corrente associado ao processo eletroquímico da espécie eletroativa mostrado na Figura 9B foi utilizada como sinal transdutor, permitindo a detecção e/ou quantificação da molécula alvo na faixa de concentração de fM- $\mu$ M.<sup>36</sup>

**Figura 9** - Exemplo de resultados obtidos por um biossensor eletroquímico baseado em voltametria de pulso utilizado para detecção do material genômico (RNA) do vírus da dengue. (A) voltametria cíclica e (B) voltametria de pulso diferencial, utilizando espécie eletroativa em solução.



Fonte: Tripathy et al.<sup>36</sup>

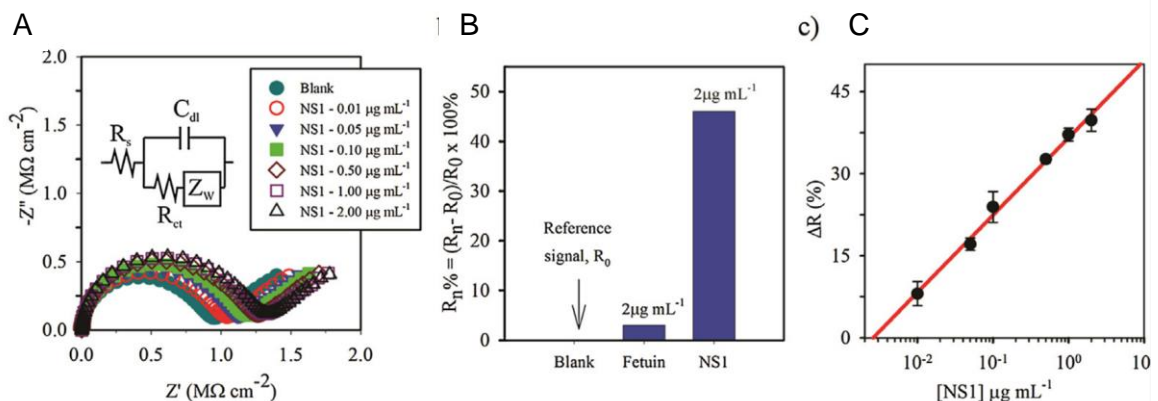
A EIE, por sua vez, consiste em realizar a aplicação de um potencial constante em diferentes frequências de perturbação AC, de baixa amplitude (na ordem de 10 mV, de forma a garantir resposta linear entre potencial e corrente). Apesar dos ensaios eletroquímicos serem realizados de forma semelhante à da voltametria cíclica (i.e. com três eletrodos), a EIE necessita um tratamento de dados mais complexo uma vez que depende de um ajuste nos dados experimentais para representar um circuito equivalente, formado por resistores e capacitores conectados em série e/ou paralelo. Essa técnica vem ganhando importância pela sua relativa sensibilidade, como demonstrado por inúmeros trabalhos.<sup>17</sup>

Um exemplo de biossensor impedimétrico desenvolvido para quantificação da proteína NS1 em soro sanguíneo foi apresentado por Cecchetto et al.<sup>37</sup> Neste trabalho, os autores imobilizaram sobre o eletrodo de trabalho (eletrodo de ouro) anticorpos específicos (anti-NS1) para a espécie biomarcadora (NS1). A célula eletroquímica utilizada foi a de três eletrodos, sendo Ag/AgCl, 3 M KCl (KCl sat.) o eletrodo de referência, e platina o contra-eletrodo. Para que o anticorpo fosse

imobilizado, primeiramente poliu-se e limpou-se o eletrodo de ouro, para assegurar melhor qualidade da superfície para adsorção da monocamada automontada de tióis, responsável pela ancoragem da anti-NS1.<sup>37</sup>

Por meio da adição de espécie eletroativa no eletrólito de suporte ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ), foi possível monitorar o decaimento da corrente do processo eletroquímico em função do aumento da concentração de NS1. Esse decaimento foi avaliado pelo aumento da resistência à transferência de carga entre a espécie eletroativa e o eletrodo ( $R_{ct}$ ), utilizando o circuito de Randles (Figura 10A). O aumento do  $R_{ct}$  pode ser facilmente visualizado pelo aumento do diâmetro do semicírculo obtido no diagrama de Nyquist (Figura 10A). Os demais elementos do circuito, como  $R_s$  (resistência da solução e de contato elétrico),  $C_{dl}$  (capacitância da dupla camada elétrica) e  $Z_w$  (impedância de Warburg, utilizada para descrever o processo difusivo da espécie eletroativa) não se alteram significativamente e, por isso, não foram utilizadas como sinal transdutor.<sup>37</sup>

**Figura 10** - Exemplo de resultados obtidos por um biossensor eletroquímico baseado espectroscopia de impedância eletroquímica, utilizado para detecção da proteína NS1 do vírus da dengue. (A) Diagrama de Nyquist, evidenciando a variação da resistência à transferência eletrônica em função da concentração do analito, NS1. (B) Resposta relativa do biossensor utilizando espécie específica (NS1) e não específica (fetuína). A maior variação do sinal de transdução da espécie específica demonstra a seletividade do dispositivo. (C) Curva de calibração obtida dos resultados mostrados em (A).



Fonte: Cecchetto et al.<sup>37</sup>

Como resultados, os pesquisadores obtiveram um biossensor de relativa alta seletividade frente a proteínas presente no soro, como fetuína, (Figura 10A), e relativa

alta sensibilidade, detectando quantidades de NS1 na ordem de centésimos de  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 10C). Os resultados demonstram a viabilidade do biossensor, que se mostrou capaz de detectar o biomarcador tanto em solução tampão quanto em soro sanguíneo não diluído.<sup>37</sup>

Embora os dois estudos citados demonstrem a possibilidade de diagnosticar a dengue por abordagem eletroquímicas, elas sofrem pelo inconveniente de se adicionar espécie eletroativa em solução para o monitoramento da interação receptor-biomarcador. Uma forma de superar esse inconveniente é por meio do uso de interfaces eletroativas, combinado ao monitoramento da capacitância eletroquímica do sistema. Na próxima seção, serão discutidos em maiores detalhes sobre essas interfaces e como elas podem ser utilizadas para fins analíticos.

#### 1.2.2.2 *Espectroscopia de Capacitância Eletroquímica derivada da EIE*

Para melhor explicar a interpretação dos sinais obtidos de capacitância eletroquímica a partir da metodologia de EIE, iremos utilizar uma analogia com um capacitor de placas paralelas. Inicialmente, importante lembrar que nessa metodologia são utilizadas superfícies eletroativas, como o caso da formação de SAMs em superfície de ouro a partir de tióis modificados com ferroceno, ou peptídeos marcados com ferroceno. A superfície de ouro (placa metálica), nesse caso, corresponde à primeira placa do capacitor, e a monocamada com espécie eletroativa atua tanto como o elemento isolante entre as placas (cadeia peptídica), como a segunda “placa” condutora (espécie eletroativa) esse esquema está representado na Figura 11.<sup>28; 32</sup>

A capacitância resultante, conhecida como capacitância eletroquímica ( $C_{\mu}$ ) é descrita como a combinação em série de uma componente eletrostática ( $C_e$ ) e uma componente mesoscópica, de natureza quântica ( $C_q$ ). Enquanto a primeira está relacionada a separação de cargas, correspondente essencialmente à dupla camada elétrica, a segunda é o resultado da transferência de elétrons entre a espécie eletroativa para a superfície metálica, e vice-versa. A transferência de elétrons está

associada com uma ocupação eletrônica entre diferentes densidades de estados eletrônicos das “placas” (i.e. eletrodo metálico e espécie eletroativa), que pode ser descrita como:

$$\frac{1}{C_q} = \frac{1}{e^2} \left( \frac{1}{DOS_{metal}} + \frac{1}{DOS_{espécie\ eletroativa}} \right) \quad (1)$$

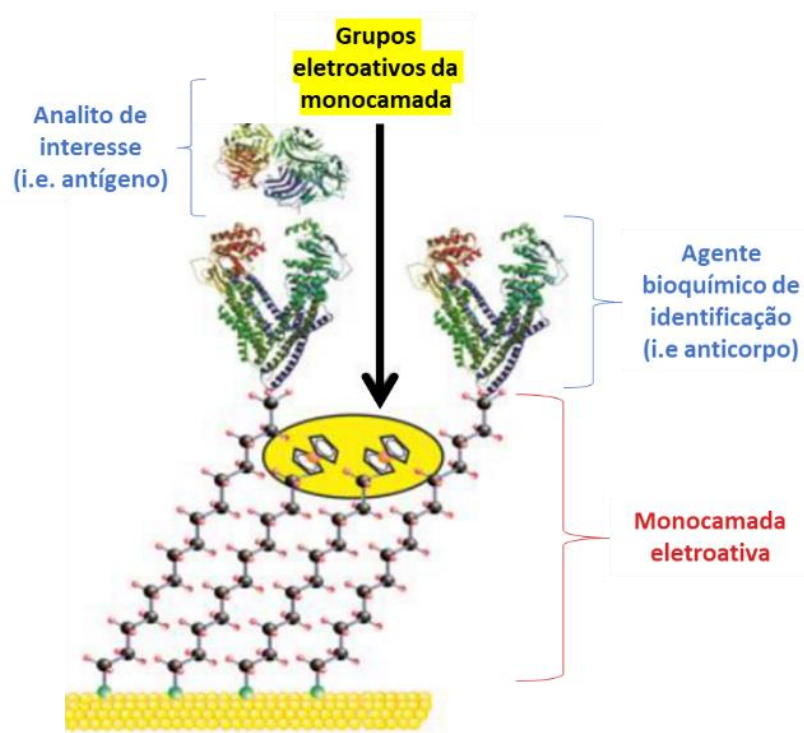
Sendo DOS a densidade de estados (*density of states*), e  $e$  a carga elementar. Como DOS do eletrodo metálico é muito maior do que a da espécie eletroativa, a capacitância quântica é proporcional à densidade de estados do último:

$$C_q \propto DOS_{espécie\ eletroativa} \quad (2)$$

Portanto, como discutido anteriormente, a capacitância resultante do sistema (capacitância eletroquímica) será uma associação em série da capacitância geométrica ( $C_e$ ) oriunda de fenômenos eletrostáticos, com a capacitância quântica da monocamada ( $C_q$ ).<sup>28; 32</sup> Em associações de capacitores em série, a menor capacitância limita a capacitância resultante. Como nesse sistema  $C_q$  é muito menor que  $C_e$ , a capacitância resultante  $C_\mu$  é predominantemente de natureza quântica, de forma que  $C_\mu \sim C_q$ . Portanto, a capacitância mensurada do sistema está relacionada diretamente à DOS da monocamada eletroativa.<sup>32</sup> Já foi observado que a DOS ou capacitância dessas interfaces se alteram de acordo com o ambiente em que as espécies eletroativas se encontram, seja o meio dielétrico (i.e. eletrólito de suporte), seja em proximidade com espécies carregadas e/ou que apresentem momento dipolar (e.g., proteínas, representado na Figura 11), e diversos trabalhos demonstram o seu uso como sinal transdutor em aplicações em biossensores.<sup>17</sup> Como sinal transdutor, geralmente é empregado a variação do inverso da capacitância (i.e.  $1/C_\mu$ ), que por sua vez pode ser associado à energia armazenada do sistema, lembrando que  $E = q^2/2C$  (i.e. energia de um capacitor). A capacitância eletroquímica pode ser acessada por técnicas eletroquímicas, como a EIE, e apresenta valor máximo no potencial formal da espécie eletroativa (i.e. média aritmética dos potenciais de oxidação e redução).<sup>17</sup>

A figura abaixo representa esquematicamente uma monocamada com espécies eletroativas immobilizadas. Pela Figura, é possível notar que, a presença das biomoléculas de identificação (i.e. anticorpos) e a presença do analito de interesse (i.e. antígenos) são claros bloqueadores das espécies eletroativas. Alterando, como explicado, o DOS do sistema.

**Figura 11** - Exemplo ilustrativo de uma monocamada eletroativa, onde é possível identificar a interação entre a monocamada e a superfície metálica, os grupos eletroativos, a interação entre a monocamada e o agente bioquímico e, por fim, a interação entre agente bioquímico e analito de interesse.



**Fonte:** Adaptado de Santos et al. <sup>17</sup>

Assim, a presença de espécies eletroativas immobilizadas em eletrodos metálicos, como apresentado na Figura 11, possui uma densidade de estados, ou DOS que, podem ser acessados por EIE. Como a DOS é sensível ao ambiente em que as espécies eletroativas estão envolvidas, a interação do anticorpo com o antígeno altera a DOS e a energia associada ao capacitor equivalente da interface eletroativa. Essa variação é utilizada como sinal transdutor sensível com aplicação em biossensores.<sup>17</sup>

## 2 OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico, baseado em espectroscopia de impedância eletroquímica, capaz de detectar a proteína NS1, utilizando eletrodos micro-fabricados.

Como objetivos específicos, esse trabalho propõe:

- a. Avaliar metodologia de limpeza dos eletrodos micro-fabricados por VC, EIE e AFM. Nesse caso, pretende-se avaliar a resposta eletroquímica da superfície limpa e modificada com SAMs de tióis (1-pentanotiol, octanotiol e dodecanotiol), que foram utilizados como espécies “padrão” para a modificação da superfície.
- b. Utilizar a metodologia obtida em (a) para limpar superfícies de eletrodos de ouro micro-fabricados. Posteriormente, modificar as superfícies com peptídeo eletroativo (Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH<sub>2</sub>, Cys: cisteína, Ala: alanina, Glu: ácido glutâmico, Fc=ferroceno). Caracterizar eletroquimicamente por VC e EIE.
- c. Imobilizar anticorpos para NS1, bloquear a superfície, e avaliar a interação com o antígeno diluído em solução tampão fosfato (12 mM, pH 7.4). Obter o cut-off do ensaio a partir de ensaios negativos (i.e., solução tampão com NS1 ausente).
- d. Avaliar a especificidade do ensaio utilizando proteína não específica. Nesse caso, BSA.

### 3 METODOLOGIA

Na sequência, iremos abordar os reagentes, equipamentos, configurações e sistemas utilizados para obtenção dos resultados que serão apresentados na seção 4.

#### 3.1 Reagentes

Álcool isopropílico ( $\text{CH}_3\text{-HCOH-CH}_3$ ), acetona ( $\text{CH}_3\text{-CO-CH}_3$ ), etanol ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ ), acetonitrila, ( $\text{CH}_3\text{-CN}$ ) ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), dihidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), hidrogenofosfato de sódio dodecahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ), hexacianoferrato(III) de potássio ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ), hexacianoferrato(II) de potássio ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ), perclorato de tetrabutilamônio ( $\text{TBAClO}_4$ ), 1-pentanotiol ( $\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_4\text{-SH}$ ), octanotiol ( $\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_7\text{-SH}$ ), dodecanotiol ( $\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_{11}\text{-SH}$ ), solução comercial de limpeza de superfícies de ouro (SIGMA, 667978), ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), ácido 16-mercaptohexadecanóico (16-MHDA), 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e n-hidroxisuccinimida (NHS) foram adquiridos da Sigma Aldrich, em concentração analítica e usados sem purificação prévia. Tween-20 foi obtido da Fisher.

A solução de tampão fosfato (PB, 12 mM) foi preparada com 0,0675 g do sal  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 0,8200 g do sal  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  diluídos em 250 mL de água ultrapura, e com o pH ajustado para 7,4 utilizando ácido nítrico diluído em água ultrapura. Para as medidas eletroquímicas realizadas na solução de tampão PB, foi adicionado à solução descrita 7,5827 g de  $\text{KNO}_3$ , eletrólito de suporte para as medidas. Para análise ELISA, foi utilizado PB-Tween, que consiste em Tween dissolvido a 0,05% (v/v) em tampão PB.

A solução de perclorato de tetrabutilamônio (TBA 20 mM) foi preparada adicionando 3,42 g de perclorato de tetrabutilamônio em 100mL de acetonitrila, e em seguida, sob agitação contínua, foi adicional 400mL de água ultrapura, obtendo o volume final de 500 mL da solução.

Para a avaliação do biossensor, foi utilizado o peptídeo composto por Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH<sub>2</sub>, onde Fc é ferroceno, Glu é glutamina, Ala é alanina e Cys é cisteína. O peptídeo foi preparado e purificado utilizando a técnica SPPS (*solid phase peptide synthesis*), seguindo protocolo descrito em Piccoli *et al.* (2018)<sup>17</sup> e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli (Departamento de Bioquímica e Química Orgânica, IQ-UNESP Araraquara). Para o bloqueio da superfície, foi utilizada solução comercial SUPERBLOCK, adquirida da Termo Scientific. O antígeno NS1 e o anticorpo monoclonal anti-NS1 (IgG) foram obtidos da Abcam.

A água ultrapura utilizada tanto na preparação de soluções aquosas quanto nos procedimentos experimentais e para higienização, foi obtida com um filtrador Millipore Corp. (Simplicity System, Bedford, MA, US) e possui como características 18,2 MΩ cm a 25°C.

### 3.2 Caracterização dos substratos

Para a obtenção de voltamograma de limpeza do ouro em meio ácido, utilizou-se macro eletrodo de ouro da Metrohm (diâmetro de 2 mm) para comparação com as superfícies do wafer de silício revestidas com ouro cristalino. As áreas eletroquímicas dos eletrodos foram calculadas de acordo com o trabalho de Oesch *et al.* (1983)<sup>38</sup>, no qual a carga de 410 μC cm<sup>-2</sup> é considerada como necessária para reduzir uma monocamada de óxido de ouro quimicamente adsorvido (obtida em varredura anódica) na proporção de 1:1 entre ouro:oxigênio.<sup>38; 39</sup> Para o cálculo da área ativa do eletrodo, foi utilizada a área do pico de redução obtido na varredura catódica (~ 1,1 V x Ag/AgCl, 3 M KCl), sendo que a carga Q é dada pela relação:

$$Q = \frac{1}{v} \int i \cdot V' \cdot dV' \quad (3)$$

sendo *i* a corrente, *V'* o potencial (contra Ag/AgCl, 3 M KCl) e a velocidade de varredura (0,1 V/s). A área do eletrodo (*A<sub>e</sub>*, em cm<sup>2</sup>) foi calculada utilizando a relação:



$$A_e = \frac{Q}{x} \quad (4)$$

Sendo  $x$  a densidade de carga superficial (em  $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ ) necessária para remover uma monocamada de óxido de ouro. Esse valor depende da orientação da rede cristalina do ouro, sendo comumente utilizado os valores de  $410 \mu\text{C}/\text{cm}^2$  para ouro policristalino<sup>38</sup> e  $444 \mu\text{C}/\text{cm}^2$  para ouro com orientação  $\langle 111 \rangle$ . O fator de rugosidade ( $F_r$ ) foi obtido dividindo-se a área obtida na relação (2) pela área geométrica do eletrodo.

Para a caracterização eletroquímica das superfícies e monocamadas, foram realizadas medidas eletroquímicas no potenciostato da AUTOLAB (PGSTAT30) com módulo FRA controlado pelo software NOVA, e uma célula convencional de três eletrodos: eletrodo de ouro de trabalho (ouro depositado sobre sílica), Ag/AgCl, 3 M KCl, como referência, e o de platina (área mínima de  $2 \text{ cm}^2$ ) como contra-eletrodo. Todas as soluções mencionadas nesta seção serão borbulhadas em  $\text{N}_2$  por 10 minutos para remover oxigênio dissolvido antes dos ensaios.

### 3.2.1 Preparação do macro eletrodo (tarugo)

Para obtenção da voltametria para comparação, esses eletrodos foram polidos utilizando dispersão de alumina (Buehler) de diferentes diâmetros (polindo na ordem decrescente de diâmetros, iniciando com  $1,0 \mu\text{m}$ , seguindo para  $0,3 \mu\text{m}$  e finalizando com  $0,05 \mu\text{m}$ ) utilizando pano de polimento da Buehler (FINE-Mastertex<sup>TM</sup>). Entre cada polimento com diferentes aluminas, o eletrodo era colocado em banho de ultrassom por 5 min com o intuito de remover partículas aderidas na superfície.

A limpeza eletroquímica consiste em realizar voltametria em pH ácido. Para isto, após montar a célula com três eletrodos, foi realizada voltametria cíclica (VC) aplicando-se potenciais de  $-0,2 \text{ V}$  a  $1,5 \text{ V}$ , com velocidade de varredura de  $100 \text{ mV/s}$

(xAg/AgCl, 3 M KCl) utilizando solução 500 mM de ácido sulfúrico, até se obter ciclos de voltamograma com mesmo perfil (geralmente, após 25 ciclos).

Após o processo de limpeza do eletrodo tipo tarugo, ele foi imerso na solução de 16-MHDA a 2mM em etanol puro por 14-16 horas a 25°C para a formação da monocamada automontada com objetivo de obter resultados de referência para comparação com eletrodos de silício revestidos com ouro.

### *3.2.2 Preparação das superfícies dos eletrodos de wafer de silício revestidos com ouro.*

No caso dos eletrodos de silício revestido com ouro cristalino (designados nesse trabalho como eletrodos “tipo wafer”), após o processo de limpeza (solução de limpeza Sigma seguido de voltametria em meio ácido, ou limpeza utilizando sequência de solventes e ozônio, seção 3.2.3), eles foram imersos em soluções a 1 mM contendo moléculas de tiol: 1-pentanotiol, octanotiol e dodecanotiol, separadamente. Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e voltametria cíclica (VC) foram realizadas utilizando no eletrólito de suporte contendo 300 mM KNO<sub>3</sub> e 12 mM de PB, (pH 7,4) contendo ou não a espécie eletroativa (1 mM de [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup>). Voltametria cíclica foi realizada aplicando potenciais de -0,2 V a 0,7 V (contra Ag/AgCl, 3 M KCl, KCl sat.) a 100 mV/s. Adicionalmente, medidas de EIE foram realizadas em uma faixa de frequência de 100 mHz a 100 kHz com amplitude de perturbação de 10 mV (pico a pico) em diferentes potenciais, a serem mencionados no texto.

Medidas de microscopia de força atômica (*do inglês AFM*) foram realizadas em atmosfera ambiente usando o Nanoscope IIIa (Instrumentos Digitais, Santa Bárbara, CA) no modo intermitente, com taxa de varredura de 0,5 Hz.

### 3.2.3 Preparação do eletrodo de trabalho para aplicação em biossensores

Após os testes e caracterizações das superfícies, utilizou-se como eletrodo de trabalho os eletrodos tipo wafer (Figura 12). O protocolo de limpeza utilizado foi o seguinte:

- i. Limpeza em ultrassom por 5 minutos em álcool isopropílico;
- ii. Enxágue com acetona e nova limpeza em ultrassom com acetona por 10 minutos;
- iii. Enxágue com álcool isopropílico e novamente 5 minutos no ultrassom em solução de álcool isopropílico;
- iv. Enxágue com água ultrapura e último ultrassom, realizado em água ultrapura por 15 minutos;
- v. A última etapa de limpeza é a imersão do substrato em atmosfera de ozônio por aproximadamente 15 minutos.

Após a realização do protocolo descrito, os eletrodos foram imediatamente imersos na solução para obtenção de monocamada, ou na solução em que serão realizados os experimentos, de forma a se evitar contaminações.

Os eletrodos foram microfabricados nas dependências do Centro de Tecnologia Renato Archer (CTI- Campinas, Brasil). Os trabalhos foram sob supervisão do Dr. Ricardo Cotrim Teixeira, do Núcleo de Empacotamento Eletrônico. Os substratos foram fabricados depositando camadas de Ti (10nm) e Au (100 nm) sobre lâminas de Si/SiO<sub>2</sub> (Sigma Aldrich) por meio da técnica de rádio frequência, sputtering (sistema próprio). O eletrodo (área de 3 mm<sup>2</sup>) e contatos foram delimitados por meio de fotolitografia laser-writer (Heidelberg DWL-66FS) seguidas de lift-off. Os substratos foram recortados das lâminas utilizando um *wafer dicer* (TOKYO SEIMITSU). Todos os procedimentos foram realizados em ambiente de sala-limpa.

**Figura 12** - Fotografia do eletrodo tipo wafer, que possui área de 3 mm<sup>2</sup> (eletrodo de trabalho), e contatos elétricos de ouro para conexão com o potenciostato.



**Fonte:** Elaborada pela autora

### 3.2.4 Formação das monocamadas

Para a formação das monocamadas de 16-MHDA e alcanotiol foram preparadas soluções de etanol puro contendo 1 mM da molécula de interesse. Os eletrodos permaneceram imersos na solução por aproximadamente 48 horas, em ambiente controlado e com temperatura de aproximadamente 24°C.

Para a formação da monocamada com peptídeo (Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH<sub>2</sub>), foi utilizada solução 2 mM do peptídeo em acetonitrila e água na proporção 1:1 v/v. Os eletrodos de trabalho permaneceram imersos durante a noite, aproximadamente 18 horas, em ambiente controlado com temperatura de 24°C.

Como forma de caracterizar a monocamada peptídica formada sobre wafer, utilizou-se o pico de redução da voltametria da superfície de ouro em meio de ácido sulfúrico. A voltametria da superfície modificada com o peptídeo permite calcular o grau de cobertura da monocamada, em especial daquelas eletroativas. Walczak et al.<sup>40</sup> demonstrou esse cálculo para uma monocamada de 11-Ferrocenilundecanotiol em eletrodos de ouro.<sup>40</sup>

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA} \quad (5)$$

Assim, para obtenção do grau de cobertura da monocamada ( $\Gamma$ ) utilizou-se a equação 5, onde: Q é a carga necessária para oxidar e/ou reduzir a molécula, obtida pela integração da curva correspondente; n é a quantidade de elétrons envolvida na oxirredução; F é a constante de Faraday e A é a área eletroativa do eletrodo.<sup>40</sup>

### 3.3 Formação do biossensor

Para a formação do biossensor, foi realizada limpeza da superfície seguindo o protocolo descrito na seção 3.2.3. O substrato limpo foi imediatamente imerso na solução de peptídeo a 2 mM dissolvido numa mistura de água/acetonitrila (1/1, v/v) por 18 horas em temperatura ambiente (24°C).

Para a imobilização do anticorpo monoclonal anti-NS1 (IgG), o substrato com a monocamada adsorvida foi lavado com solução de tampão PB. Para isso, o eletrodo foi imerso nessa solução por 1 minuto, repetindo esse procedimento duas vezes consecutivas. O substrato foi posteriormente mergulhado em solução contendo os ativadores EDC e NHS nas concentrações de 200 mM e 50 mM, respectivamente, por 30 minutos.

O mesmo procedimento de lavagem com tampão PB foi realizado antes da imersão do substrato na solução 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do anticorpo monoclonal anti-NS1 (IgG). O substrato ficou imerso na solução de anticorpo por 30 minutos. Após esse tempo, nova lavagem em tampão PB foi realizada e o substrato foi mergulhado em solução de bloqueador, por 30 minutos.

Após o bloqueador, foi realizada a primeira medida eletroquímica por voltametria cíclica. Nela obtém-se o valor do potencial formal do sistema, e o primeiro valor de capacitância. A partir de então, são realizadas sucessivas imersões em PB, por 30 min, seguida de medida de espectroscopia, até que o sistema esteja estável.

Após a estabilidade do sistema, é possível realizar a medida utilizando o antígeno específico. Para isso, o substrato é imerso em solução contendo 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  da proteína

NS1, por 30 minutos. Após a imersão, o substrato é lavado em solução PB para remover moléculas adsorvidas inespecificamente. Posteriormente, foi realizada a medida para analisar a variação de sinal.

### 3.4 Medidas eletroquímicas (biossensor)

Para caracterização das monocamadas e para obtenção de sinal para a aplicação testada, foram utilizadas as técnicas de voltametria cíclica e de espectroscopia de impedância eletroquímica. As medições eletroquímicas foram realizadas em potenciostato da AUTOLAB (PGSTAT30) com módulo FRA controlado pelo software NOVA, utilizando solução de perclorato de tetrabutilamônio (TBA) a 20 mM em água/acetoneitrila (80/20, v/v) como eletrólito de suporte.

A voltametria cíclica foi realizada entre os potenciais 0 V e 0,70 V, com velocidade de varredura de 100 mV/s. Para todos os experimentos foi utilizado uma cela eletroquímica com três eletrodos: o eletrodo de trabalho sendo o de ouro modificado com a monocamada e proteínas, o eletrodo de referência o de Ag/AgCl, 3 M KCl, e contra eletrodo de platina.

A espectroscopia de impedância foi realizada no potencial formal de cada eletrodo (i.e., média aritmética entre os picos de oxidação e redução da espécie eletroativa), com frequência variando entre 0,1 e 100.000 Hz, 10 mV de amplitude de perturbação de potencial AC. Desses resultados foram obtidos a capacitância, o ângulo de fase e a impedância de acordo com cada sistema estudado. A parte imaginária ( $C''$ ) e real ( $C'$ ) da capacitância foram obtidas utilizando as relações  $C'' = Z'/2\pi f|Z|^2$ , e  $C' = -Z''/2\pi f|Z|^2$ , respectivamente.

Todas as médias e desvios padrões calculados foram realizados para ao menos 3 amostras independentes, com medidas realizadas em condições idênticas.

### 3.4.1 ELISA

Primeiramente, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  da solução de NS1 diluída em tampão carbonato em diferentes concentrações (de 5 – 1000  $\text{ng mL}^{-1}$ ), conforme esquematizado na Figura 13. A placa ELISA foi mantida *overnight* em geladeira (16h, 4°C). Para analisar a especificidade do ensaio, foram realizadas uma amostra “em branco” (sem adição de NS1) e uma negativa (adição de albumina de soro humano HSA), Figura 13.

**Figura 13** - A Figura é uma representação da placa ELISA utilizada no experimento. Em cada linha foi adicionada uma concentração do antígeno, e cada coluna corresponde a uma replicata. As concentrações de NS1 em PB foram as seguintes: A. 5  $\text{ng/mL}$ ; B. 10  $\text{ng/mL}$ ; C. 50  $\text{ng/mL}$ ; D. 100  $\text{ng/mL}$ ; E. 200  $\text{ng/mL}$ ; F. 1000  $\text{ng/mL}$ ; G. Branco; H. Negativo, proteína HSA 1000  $\text{ng/mL}$ . Figura à esquerda demonstra a cor dos poços antes e, à direita, após o fim da análise. Detalhes no texto.



**Fonte:** Elaborado pela autora

Após a incubação, os poços foram lavados. Para isso, a solução excedente foi retirada dos poços e 200  $\mu\text{L}$  de uma solução de tampão PB-Tween ( $\text{pH} = 7,4$ ) foi adicionada em cada poço. A placa foi mantida sob agitação por 2 minutos. Esse procedimento foi realizado duas vezes após cada etapa.

Posteriormente, os espaços remanescentes na placa que não foram ocupados pelo antígeno NS1 foram bloqueados para evitar sinal não específico. Para isso, adiciona-se 200  $\mu\text{L}$  da solução bloqueio (SUPERBLOCK PBS), deixando por 1 hora e 30 minutos. Após esse tempo, os poços foram lavados com PB-Tween.

Após o bloqueio, 100  $\mu\text{L}$  de solução de anticorpo primário (anti-NS1, IgG, produzido em camundongo) na concentração de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em PB foi adicionado em todos os poços por 2 horas. Posteriormente, a solução foi removida e os poços foram lavados com PB-Tween.

Em seguida, anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo, produzido em cabra) marcado com a enzima peroxidase (HRP) foi utilizado para detectar indiretamente o antígeno NS1. Para isso, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução contendo 1  $\mu\text{g/mL}$  do anti-IgG (diluído em PB) por 1 hora.

Finalmente, após a lavagem dos poços com PB-Tween, foi adicionado 90  $\mu\text{L}$  do revelador TMB. O revelador foi adicionado por 2 minutos, com percepção visível de cor. Após esse tempo, a reação enzimática foi finalizada com a adição de ácido sulfúrico 0,5 M como inibidor da reação. A adição do ácido confere ao sistema coloração amarelada, apresentada na Figura 13. Após essa etapa, as absorbâncias dos poços foram lidas em um leitor de UV-Vis, utilizando comprimento de onda de  $\lambda = 450 \text{ nm}$ .



## 4 Resultados e discussão

Nesta seção são apresentados os resultados obtidos através dos experimentos, inicialmente mostrando os resultados dos procedimentos de caracterização da superfície de ouro em um primeiro momento do ouro livre de modificações em um segundo momento, do outro modificado. E, por fim apresenta-se os resultados da superfície de wafer atuando em um sistema de biossensor para detecção da dengue.

### 4.1 Preparação e caracterização da superfície de ouro

Como citado, garantir a qualidade da superfície que atuará como eletrodo de trabalho é essencial para assegurar a qualidade do biossensor. Assim, a primeira etapa deste trabalho foi analisar diferentes procedimentos de preparação e limpeza.

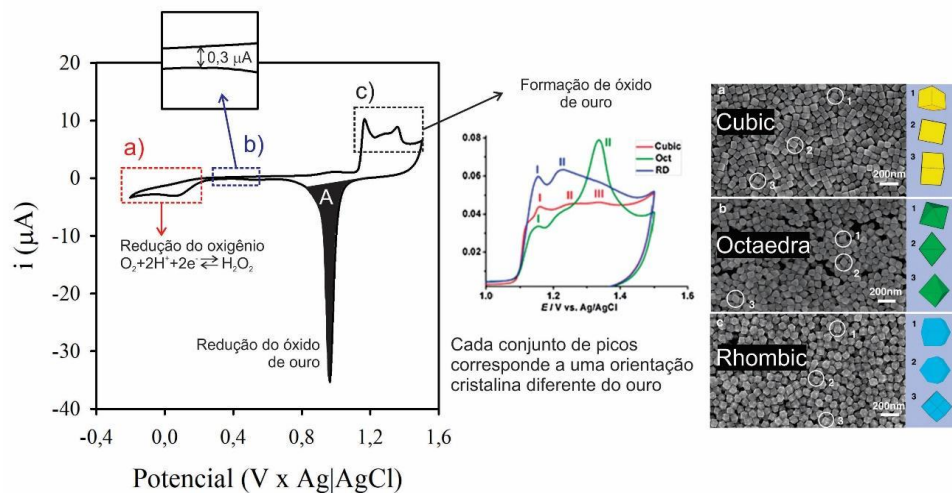
Nessa seção, será apresentado o perfil voltamétrico do eletrodo de ouro da Metrohm (tipo “tarugo”) em meio ácido, de forma a se obter um padrão para análise dos demais eletrodos investigados (i.e. eletrodos do tipo wafer). O motivo de se utilizar o eletrodo da Metrohm é que o ouro apresenta elevada pureza, além de ser possível realizar procedimentos mecânicos de limpeza, como o polimento. Desta forma, foi possível obter uma superfície limpa e com rugosidade controlada. Como exemplo, esse eletrodo foi modificado com uma monocamada de tiol para avaliar as alterações com respeito à transferência de elétrons entre a superfície e espécie eletroativa em solução. Posteriormente, serão mostrados os resultados do perfil voltamétrico em meio ácido do eletrodo tipo wafer, e a correlação com as imagens obtidas por microscopia de força atômica (do inglês AFM). Para estudo da formação das SAMs sobre as superfícies tratadas, avaliou-se a modificação dos eletrodos com três diferentes tióis: 1-pentanotiol, octanotiol e dodecanotiol, por VC e EIE, em eletrólito de suporte isenta de espécie eletroativa.

Antes de realizar a voltametria cíclica no eletrodo tipo “tarugo” em meio ácido, poliu-se a superfície em dispersões de aluminas de diferentes diâmetros como

indicado na seção 3.2.1, Após essa etapa, o eletrodo foi limpo por meio de voltametria de redissolução em meio básico (NaOH, 500 mM, potenciais de -1,7 V a -0,8 V x Ag/AgCl, 100 mV/s, 100 ciclos) com o intuito de remover eletroquimicamente qualquer molécula aderida. Posteriormente, o eletrodo foi imerso em etanol anidro por 20 minutos, uma vez que esse procedimento auxilia na remoção de óxido de ouro na superfície do eletrodo, sendo que ele é removido por meio de sua redução química, com oxidação do etanol a acetaldeído.<sup>41</sup> Por fim, o eletrodo foi imerso em solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 500 mM, e a voltametria cíclica foi realizada aplicando potenciais de -0,2 a 1,5 VxAg/AgCl, 100 mV/s, 25 ciclos. Apenas o último ciclo é mostrado na Figura 14.

Importante notar que o eletrodo de ouro da Metrohm é policristalino, apresentando, portanto, diferentes orientações da rede cristalina do ouro, como a cúbica, octaédrica e rômica (Figura 14). Devido a essas diferenças na rede cristalina, durante a formação de uma monocamada de óxido de ouro na varredura anódica, aparecem diferentes picos na região de 1,2-1,5 VxAg/AgCl, região (c) da Figura 14. A cúbica apresenta três picos, enquanto a rômica e octaedra dois picos. Em todas as redes cristalinas, há a presença de um pico em aproximadamente 1,15 VxAg/AgCl, enquanto na cúbica e rômica em 1,25 VxAg/AgCl (Figura 14). A maior diferença que se pode notar entre os voltamogramas está no pico na região mais oxidativa, em aproximadamente 1,35 VxAg/AgCl, sendo que na octaedra esse pico é o mais pronunciado e, na cúbica, é pouco evidente, e ausente na rômica.<sup>42</sup>

**Figura 14** - Exemplo de voltamograma obtido no processo de polimento eletroquímico do eletrodo de ouro. a) Durante varredura catódica, ocorre a redução de oxigênio a peróxido de hidrogênio (aprox.  $-0,16\text{ V}$  x Ag/AgCl, 3 M KCl). b) Região em que não ocorre processo faradáico, apenas corrente capacitiva é observada. c) Região de oxidação do ouro com formação de uma monocamada de óxido de ouro.<sup>43</sup> Cada conjunto de picos corresponde a uma orientação diferente da estrutura cristalina do ouro.<sup>42</sup> A parte hachurada (A) indica a região utilizada para o cálculo da área eletroativa da superfície do eletrodo, também conhecido como EASA (*electrochemical active surface area*).



**Fonte:** Adaptada de BURKE<sup>43</sup>

Na varredura catódica, a monocamada de óxido de ouro é removida em potencial aproximadamente  $0,9\text{ V} \times \text{Ag}/\text{AgCl}$ , mostrando um pico catódico nesta região (área hachurada A na Figura 14). Como nessa área ocorre o processo de redução, ela pode ser utilizada para a estimativa da área eletroativa do eletrodo (EASA, *electrochemical active surface area*) e, portanto, o fator de rugosidade. Para cada orientação diferente, a carga necessária para a redução da monocamada de óxido de ouro é diferente (Tabela 1). Entretanto, para a superfície de ouro policristalino, a carga de  $410\ \mu\text{C cm}^{-2}$  foi utilizada.<sup>44</sup> Neste caso, o eletrodo apresentou área eletroativa de  $0,050\ \text{cm}^2$ , com  $F_r=1,6$ .

**Tabela 1** - Valores de carga para redução de uma monocamada de óxido de ouro para cada diferente tipo de orientação do plano.

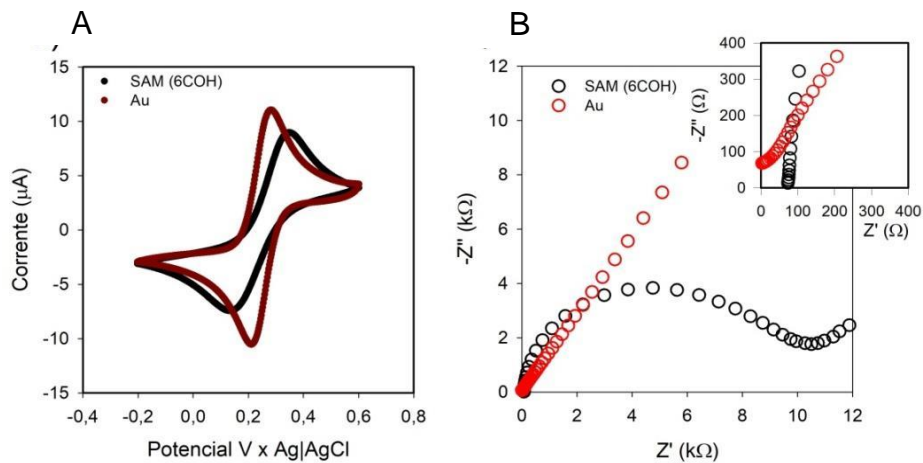
Formato das partículas de ouro	Orientação do plano	Carga ( $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ )
Dodecaedro rômboico	<110>	272
Octaedro	<111>	444
Cúbica	<100>	384

**Fonte:** Adaptado de Trasatti<sup>37</sup>

Continuando no sentido catódico, na região (a) da Figura 14 ocorre a redução de oxigênio presente em solução, formando peróxido de hidrogênio. Essa região pode estar ausente caso a solução de ácido sulfúrico seja purgada em  $\text{N}_2$  por longo tempo. Finalmente, na região (b) da Figura 14 é a janela de potencial em que não ocorre reação redox, apresentando-se apenas como uma região capacitiva.

Apenas como exemplo ilustrativo, a superfície obtida anteriormente foi modificada com 6-mercapto-hexanol (6COH) e avaliada por CV e EIE. Neste caso, a superfície obtida anteriormente foi imersa numa solução a 10 mM dessa molécula por 16 h em temperatura ambiente. Posteriormente, o eletrodo foi lavado com etanol e água, e as medições de CV e EIE foram realizadas novamente (Figura 15).

**Figura 15** - Exemplo de voltamograma e Diagrama de Nyquist para ouro modificado por monocamada de 6COH. A) Exemplo de voltamograma obtido para limpeza do eletrodo de ouro (vermelho) e após formação da SAM de 6COH. Condições: 1 mM de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  em PB 120 mM contendo 200 mM de  $\text{KNO}_3$ , pH 7,4. B) Diagrama de Nyquist impedimétrico obtido para o ouro limpo (vermelho) e após a formação da SAM de 6COH. Condições: potencial DC (potencial formal: 246 mV x Ag/AgCl), perturbação de 10 mV RMS, faixa de frequências de 100 KHz a 0,1 Hz, 50 frequências logaritmicamente espaçadas. Área eletroativa do eletrodo de 0,05  $\text{cm}^2$ .

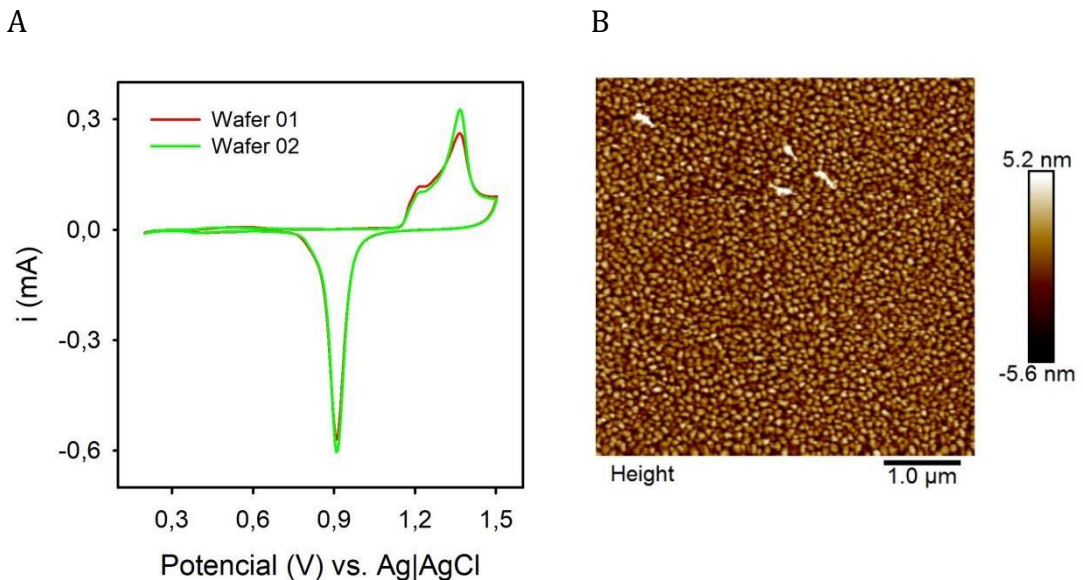


**Fonte:** Elaborada pela autora

Por meio da Figura 15A, observa-se que após a modificação do eletrodo de ouro com 6COH, ocorre uma diminuição dos picos de corrente de oxidação e redução (curva em negro, SAM) quando comparado com o eletrodo limpo (curva em vermelho, Au). Isto ocorre, pois, a monocamada forma um filme isolante sobre a superfície do eletrodo, aumentando o impedimento à passagem de carga e, conseqüentemente, corrente elétrica. Esse fenômeno pode ser mais bem visualizado pelo diagrama de Nyquist mostrado na Figura 15B, observa-se o aumento de  $R_{ct}$  (estimado pelo diâmetro semicírculo), caracterizando um aumento na transferência eletrônica devido à formação do filme isolante (SAM), é evidente o aumento de  $R_{ct}$  (diâmetro do semicírculo, 10  $\text{k}\Omega$ ) quando comparado com a superfície sem modificação.

Para os eletrodos tipo wafer, após limpeza em solução comercial da Sigma, eles foram submetidos à limpeza eletroquímica em meio de ácido sulfúrico. Na Figura 16 são mostrados os perfis voltamétricos para três wafers diferentes.

**Figura 16** - Resultado de voltametria (A) e AFM (B) para eletrodo tipo wafer. a) Voltamogramas obtidos em meio ácido para dois diferentes eletrodos tipo wafer limpos previamente com a solução comercial de limpeza da Sigma. Condição: potenciais de 0,3 a 1,5 VxAg/AgCl, 5 ciclos. Velocidade de varredura de 100 mV/s. Ácido sulfúrico a 500 mM. Apenas o último ciclo é mostrado. b) Exemplo de imagem obtida por AFM, com área de  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ , obtida em modo intermitente com taxa de varredura de 0,5 Hz.



**Fonte:** Elaborada pela autora

Como pode ser observado na Figura 16A, os voltamogramas são reprodutíveis, apresentando dois picos de corrente oxidativa relativos à oxidação do ouro, em 1,20 VxAgCl e em 1,35 VxAg/AgCl. Esses potenciais são concordantes com a orientação octaédrica da rede cristalina do ouro, com orientação do plano tipo  $\langle 111 \rangle$ . Como esperado, o pico de redução é observado em 0,9 VxAg/AgCl. Por meio de 14 amostras independentes, estimou-se a área eletroquímica conforme descrito na seção metodológica 3.2 e, posteriormente, o fator de rugosidade. O fator de rugosidade encontrado foi de  $1,1 \pm 0,1$  ( $N=14$ ), demonstrando possuir baixa rugosidade e ideal para a formação de monocamadas automontadas, diminuindo a incidência de defeitos estruturais causados por fatores extrínsecos.

Ao menos, seis amostras independentes de eletrodos tipo wafer também foram avaliados por AFM. Exemplo de imagem obtida é mostrado na Figura 16B. Por meio dessa técnica o valor da rugosidade obtido foi  $1,27 \pm 0,06$ , um pouco maior do que

aquela obtida por voltametria cíclica. Entretanto, essa diferença pode ser explicada pelo fato de que a técnica de AFM seleciona uma pequena porção de todo o eletrodo (nesse caso, em  $\mu\text{m}^2$ ) diferentemente da técnica eletroquímica (em  $\text{cm}^2$ ).

Desta forma, por possuírem uma superfície com baixa rugosidade e um voltamograma reprodutível, os eletrodos tipo wafer foram utilizados nas análises posteriores, e para a aplicação do biossensor, mostradas a seguir.

#### **4.2 Modificação dos eletrodos tipo wafer com moléculas de tiol: avaliação eletroquímica**

Após a limpeza do eletrodo tipo wafer, foram preparadas superfícies modificadas com o tiol 16MHDA. Esse tiol é uma molécula que contém 15 grupos metileno (-CH<sub>2</sub>-), grupo ligante sulfidril e grupo funcional terminal, a carbonila (-COOH). Portanto, apresenta-se como um tiol de cadeia longa, possibilitando a funcionalização da superfície com grupos carbonilas, ideais para a imobilização de proteína como potencial aplicação em biossensores.

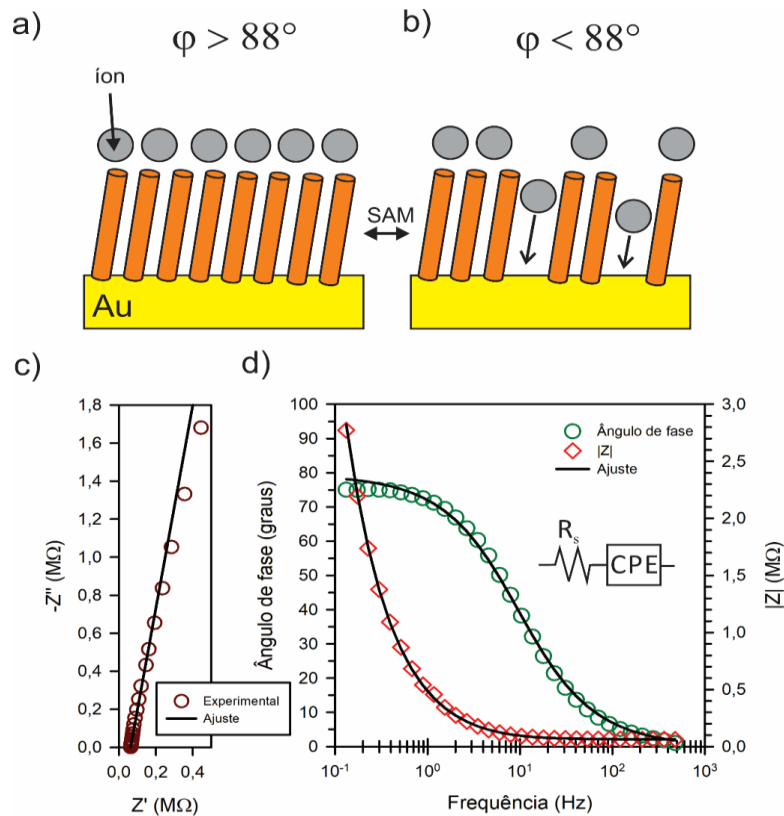
Uma forma de avaliar o efeito de barreira iônica é por meio do protocolo sugerido por Boubour e Lennox (2000).<sup>45</sup> Neste trabalho, os autores utilizaram a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica para avaliar a presença de defeitos estruturais em um eletrodo modificado com tiol mergulhado numa solução eletrolítica tamponada e isenta de espécie eletroativa. Nestas condições, a interface eletrodo/solução pode ser modelada como um resistor (resistência da solução,  $R_s$ ) combinado em série com um capacitor (capacitância da dupla camada elétrica,  $C_{dl}$ ). Se a monocamada não apresenta defeitos, o capacitor é ideal e pode ser descrito como um capacitor de placas paralelas. Alternativamente, o capacitor pode ser substituído por um elemento com constante de fase (CPE), com  $\alpha$  próximo a um ( $\alpha \rightarrow 1$ ) nesse caso, a carga será igual a capacitância, pois a impedância de uma CPE é definida como  $Z_{CPE} = 1/Q(j\omega)^\alpha$  e, como  $Z_C = 1/C(j\omega)$  quando  $\alpha \rightarrow 1$  temos que  $Q = C$ .

A idealidade da capacitância é avaliada pelo ângulo de fase (i.e., a defasagem da função senoidal temporal de resposta de corrente com a função senoidal de perturbação de potencial,  $\varphi$ ) em baixas para médias frequências ( $1 \text{ Hz} < f < 10^3 \text{ Hz}$ ), especificamente em 1 Hz. Neste caso,  $\varphi_{1\text{Hz}} \geq 88^\circ$ . Em frequências maiores que  $10^3 \text{ Hz}$  a impedância total do sistema é dominada pela resistência da solução. Caso  $\varphi_{1\text{Hz}} \leq 88^\circ$ , o capacitor não é ideal e apresenta um componente resistivo devido à corrente iônica nos defeitos da monocamada. Exemplo ilustrativo conceitual dessa situação pode ser observado nas Figuras 17a e 17b.

Neste trabalho, avaliou-se a idealidade da monocamada automontada de 16MHDA como capacitor utilizando solução contendo 300 mM  $\text{KNO}_3$  e 12 mM de PB, (pH 7,4) no potencial de 0,26 V x Ag/AgCl, 3 M KCl. Os resultados são mostrados na Figura 17.



**Figura 17** - Exemplo de monocamadas sem (a) e com (b) defeitos. (a) Monocamada automontada (SAM), isenta de defeitos, formada sobre eletrodo de ouro. (c) Diagrama de Nyquist obtido para o eletrodo modificado com a monocamada de 16MHDA mergulhado numa solução de 12 mM de fosfato, pH 7,4. Potencial aplicado de 0,26 VxAg/AgCl, 3 M KCl, 10 mV de perturbação, frequências de  $10^5$  Hz – 0,1 Hz. (d) Gráfico de Bode para o módulo da impedância ( $|Z|$ ) e ângulo de fase ( $\varphi$ ). Os ajustes foram realizados utilizando o circuito equivalente mostrado em (c).



**Fonte:** Acervo do Grupo de Pesquisa Nanobionics, Instituto de Química da Unesp

Na situação retratada pela figura 17a, quando o eletrodo contendo a SAM está mergulhado numa solução eletrolítica, a interface eletrodo/solução pode ser modelada por um circuito contendo um resistor (resistência da solução,  $R_s$ ) e um capacitor, apresentando ângulo de fase a baixas frequências  $\varphi > 88^\circ$ . Por outro lado, numa monocamada que apresenta defeitos (pinholes), representado na figura 17b, íons podem se difundir para dentro da monocamada, com conseqüente  $\varphi < 88^\circ$  e a SAM não pode mais ser modelada como um capacitor.

Ao analisar o diagrama de Nyquist (Figura 17c), observa-se que a função da parte imaginária da impedância *versus* sua parte real é uma linha reta inclinada em aproximadamente  $80^\circ$ , característico de comportamento capacitivo não ideal (para um capacitor ideal, o diagrama de Nyquist apresentaria uma reta vertical). A impedância total do sistema ( $|Z|$ , na Figura 17d) se mantém constante em altas frequências, até 10 Hz, região da qual seu módulo aumenta consideravelmente até atingir valores de  $|Z| \approx 2,5 M\Omega$ . Notavelmente, observa-se que em altas frequências a resistência da solução predomina ( $\varphi \approx 0^\circ$ ) na resposta no módulo de impedância (Figura 17d). Entretanto, em frequências abaixo de 10 Hz a componente capacitiva pronuncia-se até atingir um valor de ângulo de fase de  $75^\circ$  em 1 Hz. Esse comportamento observado foi análogo entre três medições independentes ( $N = 3$ ), apresentando  $\varphi_{1Hz} = 75,5 \pm 0,3^\circ$ . O comportamento da resposta eletroquímica de impedância foi ajustado utilizando circuito equivalente contendo um resistor (descreve a resistência da solução) conectado em série a um elemento de constante de fase (CPE), que modela a monocamada isolante (Figura 17d). Exemplo de resultado de ajuste são mostrados nas Figuras 17c e 17d. Como o ângulo de fase a 1 Hz não apresenta valores acima de  $88^\circ$ , constata-se que a monocamada não apresenta um comportamento capacitivo ideal, possuindo elemento resistivo. Esse elemento resistivo está relacionado com o ingresso de íons para dentro da monocamada devido à presença de defeitos em sua estrutura.<sup>34</sup>

Assim, utilizou-se um novo protocolo para limpeza, com solventes orgânicos de maneira sucessiva e associados com ultrassom (seção 3.2.3). Os solventes orgânicos têm a função de solubilizar as impurezas orgânicas presentes, e o ultrassom favorece esse processo, além de contribuir com a dessorção dessas moléculas. A última etapa do novo protocolo, o uso de ozônio por 15 minutos, tem a função de oxidar qualquer molécula orgânica presente que não foi removida nas etapas anteriores (detalhes na seção experimental).

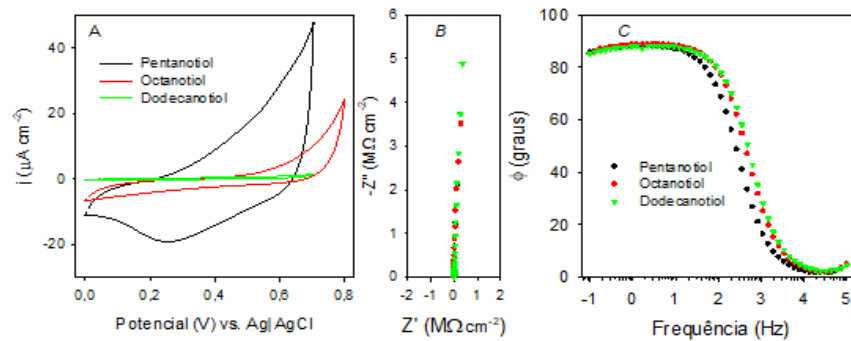
Para avaliar o novo protocolo de limpeza, as superfícies de ouro foram modificadas com SAMs obtidas a partir de três diferentes tipos de alcanotiol, ( $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-SH}$ ).

Foram utilizados o pentanotiol (n=4), octanotiol (n=7) e dodecanotiol (n=11). Utilizando esse protocolo, foi possível melhorar significativamente o ângulo de fase, obtendo  $\theta_{\text{pentanotiol}} = 87 \pm 2^\circ$ ,  $\theta_{\text{octanotiol}} = 88 \pm 1^\circ$  e  $\theta_{\text{dodecanotiol}} = 88 \pm 1^\circ$  (Figura 18) evidenciando que o novo protocolo promove a remoção de impurezas e auxilia na formação de monocamada compacta.

Na Figura 18A, é possível observar o bloqueio de íons da superfície através da voltametria cíclica, realizada sem espécie eletroativa. O aumento do fluxo de carga para cada alcanotiol está relacionado com o efeito capacitivo e isolante que eles possuem, e está relacionada com a equação do capacitor de placas paralelas ( $C \propto 1/d$ , sendo  $d$  a espessura do filme). Como pode ser observado, menores valores de capacitância são obtidos pelo monocamadas de maiores espessuras (o valor de capacitância pode ser estimado pela largura do eixo vertical em qualquer potencial).

Segundo o princípio discutido por Boubour e Lennox (2000)<sup>45</sup>, as monocamadas de tiol não eletroativas, quando mergulhado em eletrólito de suporte com ausência de espécies eletroativas, se comportam como isolantes à passagem de íons, seguindo o modelo de capacitor ideal de Helmholtz.<sup>45</sup> Nesse modelo, o capacitor ideal possui um ângulo de fase  $90^\circ$ , entretanto, valores de aproximadamente  $88^\circ$  (a 1Hz) já indica formação de monocamada isolante.<sup>45</sup>

**Figura 18** - Caracterizações por voltametria cíclica (A) e espectroscopia de impedância (B e C) da superfície de ouro com SAM de tiol aderida. Medidas realizadas *ex-situ* em solução de tampão PB 12 mM (pH 7.4) com 3M de KNO<sub>3</sub>. Cada curva representa um tiol de cadeia diferente: o pentanotiol (em preto), o octanotiol (em vermelho) e dodecanotiol (em verde). Todas as amostras foram obtidas após 48 horas de incubação em temperatura ambiente em solução de etanol contendo 1mM do respectivo tiol. A voltametria cíclica foi realizada entre os potenciais 0.00 e 0.80 V com o eletrodo de Ag/AgCl, 3 M KCl como referência, e com velocidade de varredura de 100 mV/s. A espectroscopia foi realizada no potencial de 0.00 V (vs. Ag/AgCl, 3 M KCl) entre as frequências 0.1 e 100000 Hz.



**Fonte:** Elaborada pela autora

Após todo o estudo realizado sobre as superfícies de ouro, conclui-se que a superfície de ouro eletrodepositadas sobre silício fornece qualidade suficiente para o desenvolvimento de um biossensor. Para entender o processo de formação do biossensor proposto, é necessário lembrar que biossensores dependem de um elemento de reconhecimento biológico aderido à uma superfície metálica transdutora, como na Figura 18.<sup>27; 46; 47; 48</sup> Desta forma, após encontrar o melhor método de limpeza de superfície, desenvolveu-se o biossensor.

#### 4.3 Teste da aplicabilidade da superfície para construção de um biossensor

No biossensor avaliado neste projeto, a superfície transdutora é a superfície metálica do wafer modificada com a monocamada de peptídeo eletroativo, e o elemento de reconhecimento biológico é o anticorpo monoclonal anti-NS1 que será aderido à monocamada. O anticorpo reagirá com a proteína NS1 afetando

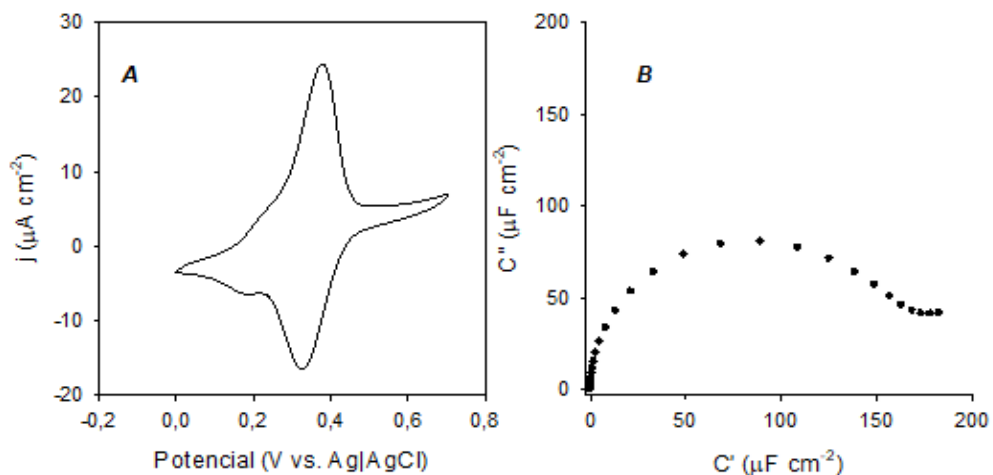
capacitância do sistema. O biossensor construído é, por tanto, classificado como um sensor por capacitância eletroquímica.

Como explicado na seção 2.3.1, na metodologia de EIE é possível mensurar a interação do anticorpo com o antígeno, uma vez que o ambiente em torno das espécies eletroativas afeta a DOS e, conseqüentemente, a resposta capacitiva. Assim, a resposta correspondente à presença do antígeno é obtido pela variação do inverso do sinal de capacitância eletroquímica ( $1/C_{\mu}$ ).<sup>17</sup>

A fim de se obter monocamada eletroativa de peptídeo organizada e empacotada, com o máximo de moléculas aderidas possível, utilizou-se o protocolo de limpeza para a superfície mencionado na seção 3.2.3.

Após o procedimento de limpeza, os eletrodos de wafer foram imediatamente imersos em solução contendo 2 mM do peptídeo eletroativo (Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH<sub>2</sub>, descrito na seção 3.2.4), por aproximadamente 18 horas, em ambiente controlado com temperatura de aproximadamente 24°C, para a formação da monocamada.

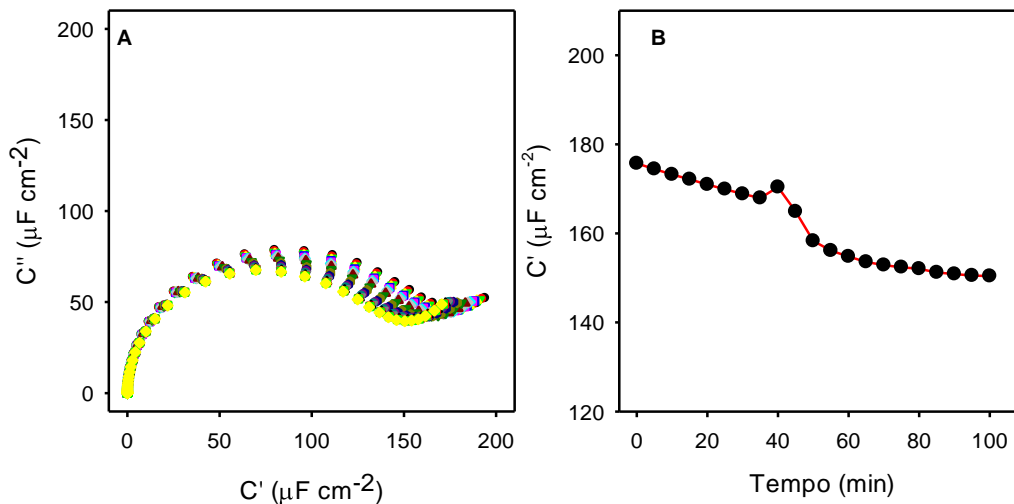
**Figura 19** - Voltametria cíclica (A) e espectroscopia de impedância (B) para a monocamada de peptídeo, realizadas ex-situ em solução TBA. A voltametria cíclica foi realizada entre os potenciais 0 e 0,8 V, com Ag/AgCl, 3 M KCl como eletrodo de referência e velocidade de varredura de 100 mV/s. A espectroscopia de impedância foi realizada no potencial formal do sistema (0,35 V) (vs. Ag/AgCl, 3 M KCl) entre 0,1 e 100.000 Hz.



Fonte: Elaborada pela autora

Inicialmente, realizou-se medidas eletroquímicas por CV e EIE com o objetivo de caracterizar a monocamada. Um exemplo dos resultados dessa caracterização está representado na Figura 19. Como esperado, por voltametria cíclica, observa-se a presença de dois picos majoritários de corrente, o anódico (referente ao processo de oxidação do ferroceno a íons ferrocenium,  $\text{Fc}^+$ , no sentido positivo de  $j, j_{pa}$ ) e catódico (redução do ferrocenium a ferroceno, no sentido negativo de  $j, j_{pc}$ ), com  $j_{pc}/j_{pa} \approx 1$ . A presença desses picos de corrente evidencia o sucesso da imobilização do peptídeo, uma vez que esses picos estão ausentes na superfície sem peptídeo. Utilizando a metodologia descrita por Walczak<sup>40</sup>, foi possível estimar a densidade molecular superficial de peptídeo em  $(0,35 \pm 0,06)$  nmol  $\text{cm}^{-2}$ , valor menor do que aquele para monocamada de 11-ferrocenilundecanotiol, de 0,53 nmol  $\text{cm}^{-2}$  apresentado por Walczak.<sup>40</sup> A diferença pode ser explicada pela presença de grupos mais espaçosos na estrutura do peptídeo em comparação à estrutura de tiol, que é formada por estruturas  $-\text{CH}_2-$  (grupo metileno) em sua cadeia. Na Figura 19B é mostrado o diagrama de Nyquist capacitivo para essa interface, obtido no potencial formal (0,35 V). Observa-se que a interface possui capacitância na ordem de 180  $\mu\text{F cm}^{-2}$  (estimado pelo diâmetro do semicírculo), muito acima da capacitância de dupla camada elétrica (na ordem de 10  $\mu\text{F cm}^{-2}$ ).<sup>49</sup> Medidas ao longo do tempo permitiu verificar que a superfície se estabiliza após 60 min., como apresentado na Figura 20.

**Figura 20** - Espectroscopia de impedância para a monocamada de peptídeo. Cada curva representa uma medida sequencial para avaliação da estabilidade de uma mesma monocamada. A monocamada foi obtida após 18 horas de incubação, em temperatura ambiente e em solução de acetonitrila e água (1:1 volume) contendo 2 mM do peptídeo. Todas as medidas foram realizadas em cela convencional de três eletrodos no potencial formal do sistema ( $\approx 0,35V$  vs. Ag/AgCl, 3 M KCl), com frequências variando entre 0,1 e 100.000 Hz, e utilizando solução de TBA a 20 mM em água/acetonitrila (80/20, v/v).

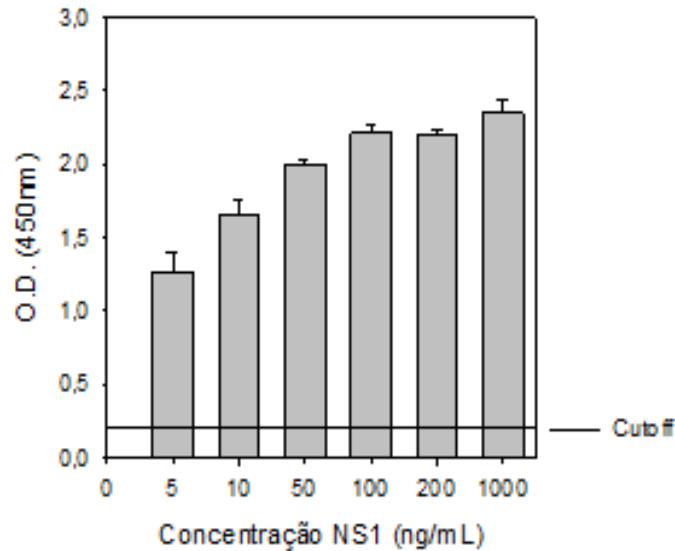


**Fonte:** Elaborada pela autora

Embora a monocamada seja parte essencial do biossensor, somente a presença dela não é suficiente para realizar a detecção do antígeno. A monocamada de peptídeo funciona como uma âncora entre a superfície metálica e a molécula receptora (anticorpo) atuando como elemento de transdução entre o sinal de reconhecimento biológico e um sinal elétrico, por meio da espécie eletroativa. Logo, para detectar o antígeno NS1 da dengue, utilizou-se o anticorpo monoclonal anti-NS1 (IgG).

O anticorpo anti-NS1 é a biomolécula que realizará o reconhecimento da proteína NS1. O reconhecimento biológico ou interação antígeno-anticorpo afeta as propriedades eletrônicas das moléculas de ferroceno presentes na monocamada automontada, em especial a capacitância eletroquímica, que, portanto, pode ser utilizada como sinal transdutor. Antes da realização desse processo de interação é necessário garantir que as proteínas anti-NS1 e NS1 fornecem o sinal de reconhecimento biológico. Essa avaliação foi realizada por ELISA indireto (Figura 21).

**Figura 21** - Gráfico da densidade óptica (O.D,  $\lambda = 450 \text{ nm}$ ) para diferentes poços contendo concentrações diferentes de antígeno NS1 (ng/mL), mantendo o anticorpo anti-NS1 com concentração fixa de  $1 \mu\text{g/mL}$ . O ensaio foi realizado seguindo o protocolo padrão do ELISA indireto, utilizando seis concentrações diferentes do antígeno, um poço em branco (i.e., apenas solução tampão), e um poço contendo proteína HSA ( $1000 \text{ ng/mL}$ ) como negativo.



**Fonte:** Elaborada pela autora

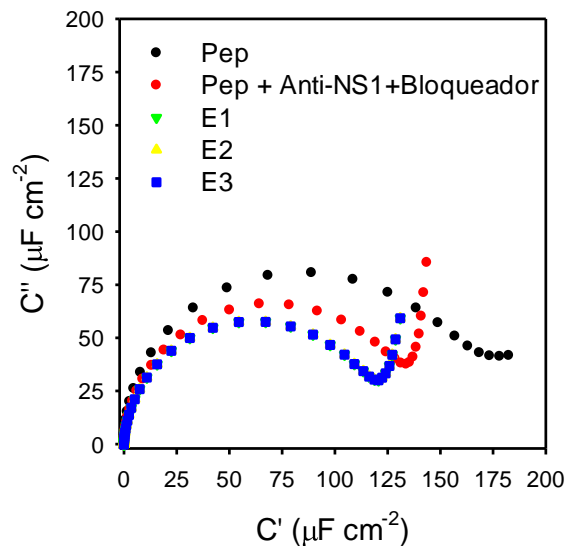
No gráfico da Figura 21 é mostrado a curva de sinal (Densidade óptica ou absorvância para  $\lambda=450 \text{ nm}$ ) *versus* concentração de NS1. O valor de cutoff foi definido como sendo o valor da média da absorvância obtido no poço correspondente ao negativo, que contém a proteína HSA (albumina de soro humano). Como esperado, foi observado que houve interação do par antígeno/anticorpo para as variadas concentrações de antígenos, uma vez que foram atingidos valores de absorvância maiores que aquelas do cutoff.

Com essa constatação, é possível realizar os ensaios para detecção da NS1 no sistema de biossensor proposto. O procedimento inicia-se pela imobilização da monocamada do peptídeo eletroativo (Figura 22, curva preta). Na sequência, é necessário imobilizar a proteína Anti-NS1, responsável pela interação bioquímica com o biomarcador. Para isso, foi realizado a incubação do substrato modificado com peptídeo em solução contendo de moléculas ativadoras (EDC/NHS), por 30 minutos. Após a lavagem da superfície, o eletrodo é imerso numa solução contendo  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$



do anticorpo monoclonal anti-NS1 (IgG), por 1 hora. Após o bloqueio por 1h em solução de Superblock PBS™ os eletrodos estavam totalmente funcionalizados para a aplicação em biossensor (Figura 22, curva vermelha). Como pode ser observado na Figura 22, a capacitância eletroquímica (estimada pelo diâmetro do semicírculo) diminuiu<sup>17</sup> após cada etapa (de 175 para  $\sim 128 \mu\text{F cm}^{-2}$ ), como já observado em outros trabalhos,<sup>49</sup> evidenciando o sucesso da modificação de superfície.

**Figura 22** - Etapas da modificação da superfície do eletrodo com o receptor, bloqueio e análise da estabilização do sinal. A curva em preto (Pep) corresponde à resposta da superfície após imobilização do peptídeo, a curva em vermelho (Pep + Anti-NS1+Bloqueador) corresponde à superfície modificada com o peptídeo, com a proteína anti-NS1 e com o bloqueador, já as curvas E1, E2, E3 são as curvas correspondentes às medidas de estabilização do substrato, as curvas encontram-se sobrepostas uma à outra, e estão representadas pela cor azul, correspondente à última curva obtida.



**Fonte:** Elaborada pela autora

Inicialmente, objetivando conferir a estabilidade da superfície, medidas consecutivas após a incubação do eletrodo em solução tampão PB (30 min.) foram realizadas. Na Figura 22 (verde, amarelo e azul) e na Figura 23A, são mostrados exemplos do comportamento encontrado para o biossensor. Na figura 23A, as medidas entre os brancos (vermelho e preto) não devem variar, indicando estabilidade, como observado. Entretanto, quando o eletrodo é exposto na solução contendo o antígeno ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e nova medição é realizada (verde) observa-se

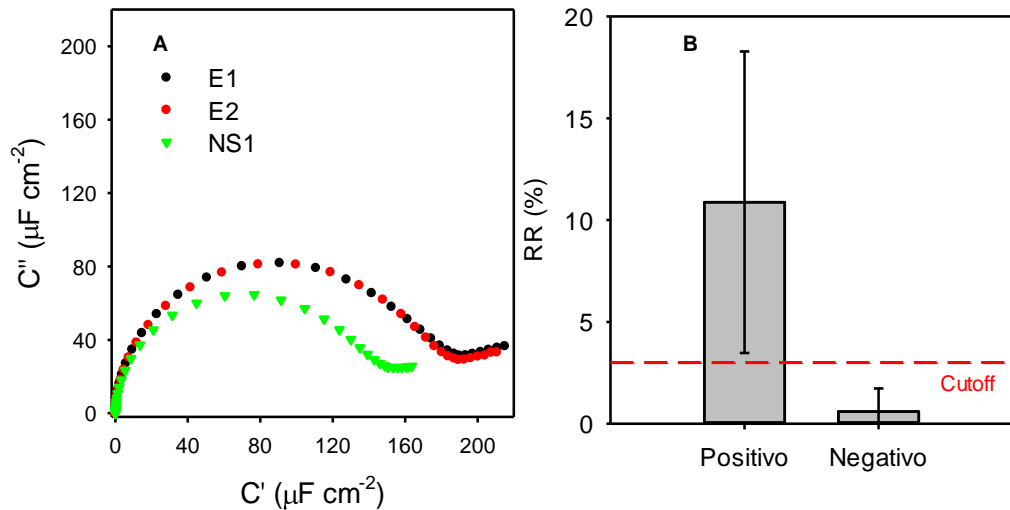
decaimento da capacitância. Esse decaimento é evidência do processo de interação antígeno-anticorpo e, portanto, demonstra a potencial aplicabilidade da superfície investigada no desenvolvimento do biossensor. O sinal relativo (RR) foi obtido utilizando as fórmulas 6 e 7 apresentadas abaixo.

$$RR_{Positivo} = \left| \frac{\frac{1}{C'_{NS1}} - \frac{1}{C'_{E2}}}{\frac{1}{C'_{E2}}} \right| \cdot 100 \quad (6)$$

$$RR_{Negativo} = \left| \frac{\frac{1}{C'_{E1}} - \frac{1}{C'_{E2}}}{\frac{1}{C'_{E2}}} \right| \cdot 100 \quad (7)$$

Onde:  $C'_{NS1}$  é a capacitância após expor o eletrodo em solução contendo NS1, e E1 e E2 são sinais de capacitância do branco (solução tampão fosfato, pH 7,4). Após a estabilidade do sistema (variação menor que 2% entre medidas consecutivas incubando o eletrodo em solução tampão fosfato, pH 7,4, por 30 min. e lavagem), o eletrodo é incubado em solução de antígeno, e a capacitância é novamente mensurada ( $C'_{NS1}$ ). Os valores de capacitância representantes do sistema foram obtidos no fechamento do semicírculo da espectroscopia de impedância, como os presentes na Figura 23A.

**Figura 23** – A) Espectroscopia de capacitância derivada da impedância para diferentes eletrodos modificados com peptídeo eletroativo e anticorpo anti-NS1. Cada curva representa uma medida em tempos diferentes, 30 minutos após imersão em PB (preto), e 60 minutos após imersão em PB (vermelho, que corresponde ao negativo), e com a adição do antígeno NS1 (verde) a 1  $\mu\text{g/mL}$  em PB (amostra positiva). Os sinais relativos para as amostras positivas e negativas são mostrados em (B). A espectroscopia de impedância foi realizada no potencial formal do eletrodo modificado, variando a frequência entre 0,1 e 100.000 Hz, perturbação AC de 10 mV, e utilizando solução de TBA a 20 mM em água/acetoneitrila (80/20) como eletrólito de suporte.



**Fonte:** Elaborada pela autora

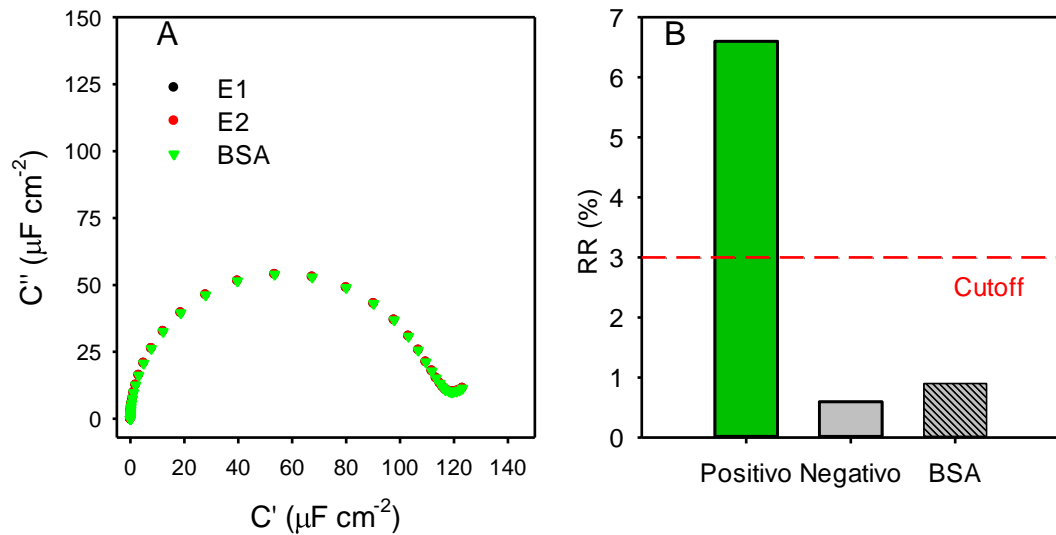
Para conseguir avaliar o quanto a variação da capacitância na presença do antígeno é significativa e, comprovar que o sistema proposto é de fato capaz de detectar a proteína NS1, é necessário comparar a variação de amostras positivas (solução tampão fosfato com presença da NS1, pH 7,4) com a variação de amostras negativas (solução tampão fosfato, pH 7,4). Essa comparação está na Figura 23B, o valor de cutoff exibido na Figura, de 3%, foi calculado somando a média encontrada para as amostras negativas, com o dobro do valor do desvio padrão, correspondendo a um intervalo de confiança de 95%. Para assegurar a significância estatística desse resultado, realizou-se um teste t com  $\alpha = 0,05$ , obtendo um valor-p de 0,002 (unicaudal). Comprovando a hipótese de que os positivos são maiores que os negativos, e de que o sensor proposto tem o potencial de ser aplicado para a detecção de NS1.

Um aspecto importante a ser ressaltado é que esse trabalho teve como objetivo avaliar se a superfície do wafer modificada com a biomolécula é capaz de realizar a detecção qualitativa (i.e., sinal sim/não) da proteína NS1. Por isso, não se buscou otimizar o processo de modificação da superfície do eletrodo de modo a diminuir o desvio-padrão apresentado para o sinal positivo (Figura 23b). Possíveis causas para o relativo alto desvio-padrão dos ensaios positivos foi o número reduzido de amostras utilizadas nessa etapa (N=3), assim como com as diferentes orientações que anticorpo pode adotar sobre o eletrodo, uma vez que o protocolo de imobilização por EDC/NHS não garante uma única orientação do anticorpo sobre o eletrodo. Desta forma, como o reconhecimento biológico entre o antígeno e anticorpo depende da orientação do último, é esperado respostas relativas diferentes para cada superfície obtida com orientações diferentes, como observado.

Futuros estudos são necessários para afirmar uma causa e buscar diminuir os impactos dessa variação. Assim, antes da realização de testes clínicos deverá ser realizados experimentos para controlar a variação entre os resultados, aumentar o número de amostras estudadas e obter uma curva de calibração para diferentes concentrações da proteína. Entretanto, conforme objetivo descrito, a metodologia apresentada provou-se adequada para a detecção do antígeno NS1, uma vez que é possível diferenciar amostras negativas (ausência de NS1) das positivas (presença de NS1).

Por fim, realizou-se um estudo para avaliar a seletividade da superfície utilizando a proteína albumina de soro bovino (*BSA – Bovine serum albumin*) como substituto à NS1. A proteína BSA é muito similar à sua equivalente humana, a proteína HSA (*Human serum albumin*), presente em amostras de pacientes reais e que poderia gerar um falso positivo em exames clínicos. O resultado obtido nesse trabalho Figura 24, indica a tendência do sistema à especificidade para a proteína NS1 com média de 1% de variação do sinal para a proteína BSA, mantendo um resultado abaixo da linha de cutoff, apresentada anteriormente, evidenciando que a interface não reconhece de forma significativa a proteína BSA.

**Figura 24** - A) Resultado ilustrativo da espectroscopia de impedância para a análise de seletividade do biossensor. Cada curva representa uma medida em tempos diferentes, as curvas estão sobrepostas e são referentes à: 30 minutos após imersão em PB (E1, preto), 40 minutos após imersão em PB (E2, vermelho) e com a adição do antígeno BSA (verde), por 30 min. Importante notar que as curvas E1, E2 e BSA estão sobrepostas. A espectroscopia de impedância foi realizada no potencial formal de cada sistema (vs. Ag/AgCl, 3 M KCl) entre 0,1 e 100.000 Hz. B). Gráfico de barras para os resultados mostrado em A, comparados para um ensaio “positivo” e “negativo”.



**Fonte:** Elaborada pela autora

## 5 CONCLUSÕES

Por meio dos experimentos eletroquímicos (EIE e CV) utilizando monocamadas de alcanotíóis, foi possível verificar que o procedimento de limpeza dos eletrodos tipo wafer utilizando diferentes solventes (i.e. acetona, álcool isopropílico e água) em ultrassom, seguido da aplicação de ozônio no eletrodo, possibilita a formação de SAMS organizadas e compactadas, características de uma interface que pode ser modelada a um capacitor ideal (i.e. ângulo de fase maior que  $88^\circ$ ). A definição desse procedimento, capaz de controlar a superfície, permitiu o avanço dos experimentos, realizando os testes de aplicabilidade da superfície proposta no desenvolvimento de biossensor.

Por meio desse protocolo de limpeza, foi possível modificar as superfícies dos eletrodos com receptores específicos para a detecção da proteína NS1, biomarcadora para a Dengue. Os resultados evidenciam que foi possível detectar essa proteína numa concentração a  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  em tampão, com um cut-off de 3%, e de relativa alta seletividade frente à proteína BSA.

Estudos posteriores utilizando amostras mais complexas, como soro humano, serão conduzidos em trabalhos futuros. No entanto, os resultados apresentados nesse TCC demonstram a possibilidade de uso do eletrodo tipo wafer como superfície para o desenvolvimento de biossensores portáteis para o diagnóstico da dengue.

## REFERÊNCIAS

- 1 MCNUTT, M. Climate change impacts. *Science*, v. 341, n. 6145, p. 435-435, Aug. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1243256>
- 2 KAPLAN, S. The undeniable link between weather disasters and climate change. *The Washington Post*, oct. 2020. Disponível em: <https://www.washingtonpost.com/climate-solutions/2020/10/22/climate-curious-disasters-climate-change/>. Acesso em: 14 set. 2021
- 3 NASA. Overview: weather, global warming and climate Change. Global climate change: vital signs of the planet. Disponível em: <https://climate.nasa.gov/resources/global-warming-vs-climate-change/> . Acesso em: 20 jun. 2021
- 4 MUDANÇAS climáticas favorecem o desenvolvimento do *Aedes aegypti*. **Ciclo Vivo**, 27 jan. 2020. Disponível em: <https://ciclovivo.com.br/planeta/crise-climatica/mudancas-climaticas-favorecem-o-desenvolvimento-do-aedes-aegypti/>. Acesso em: 20 jun. 2021
- 5 EDDY, M. et al. European floods are latest sign of a global warming crisis. *The New York Times*. Online: *The New York Times*, July 2021. Disponível em: <https://www.nytimes.com/2021/07/16/world/europe/germany-floods-climate-change.html>. Acesso em: 14 set. 2021
- 6 PERKINS-KIRKPATRICK, S. E.; LEWIS, S. C. Increasing trends in regional heatwaves. *Nature Communications*, v. 11, n. 1, p. 3357, July 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16970-7>
- 7 CANADÁ: o que explica a onda de calor relacionada a dezenas de mortes súbitas no país. **BBC News Brasil**, 30 jun. 2021. Disponível em: <https://www.bbc.com/portuguese/internacional-57672256>. Acesso em: 30 set. 2021
- 8 CECCHETTO, J. et al. Serological point-of-care and label-free capacitive diagnosis of dengue virus infection. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 151, p. 111972, mar. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566319310498>. Acesso em: 20 jun. 2021
- 9 MESSINA, J. P. et al. The current and future global distribution and population at risk of dengue. *Nature Microbiology*, v. 4, n. 9, p. 1508-1515, 01 Sep. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0476-8>. Acesso em: 14 set. 2021
- 10 WWF BRASIL. O que é o aedes? **WWF Brasil**. Disponível em: [https://www.wwf.org.br/natureza\\_brasileira/areas\\_prioritarias/amazonia1/nossas\\_solucoes\\_na\\_amazonia/aetrapp/](https://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/areas_prioritarias/amazonia1/nossas_solucoes_na_amazonia/aetrapp/). Acesso em: 23 jun. 2021

- 11 ABIDEMI, A.; AZIZ, N. A. B. Optimal control strategies for dengue fever spread in Johor, Malaysia. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, v. 196, p. 105585, Nov. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169260720314188> . Acesso em: 23 jun. 2021
- 12 BRASIL. Ministério da Saúde. Dengue aspectos epidemiológicos, diagnósticos e tratamentos. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2002. (n. 176).
- 13 BHARAJ, P. et al. Concurrent infections by all four dengue virus serotypes during an outbreak of dengue in 2006 in Delhi, India. *Virology Journal*, v. 5, n. 1, p. 1, Jan. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-5-1>
- 14 ARSHAD, R. et al. MIP-Based Impedimetric Sensor for Detecting Dengue Fever Biomarker. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 191, n. 4, p. 1384-1394, Aug. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03285-y> .
- 15 KHRISTUNOVA, E. et al. Label-Free Electrochemical Biosensors for the Determination of Flaviviruses: Dengue, Zika, and Japanese Encephalitis. *Sensors*, v. 20, n. 16, Aug. 2020. DOI: <https://www.mdpi.com/1424-8220/20/16/4600>
- 16 BOPPART STEPHEN, A.; RICHARDS-KORTUM, R. Point-of-care and point-of-procedure optical imaging technologies for primary care and global health. *Science Translational Medicine*, v. 6, n. 253, p. 253rv2-253rv2, Sep. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009725>
- 17 SANTOS, A. Fundamentals and Applications of Impedimetric and Redox Capacitive Biosensors. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, v. S7, 01/01 2014.
- 18 TKAC, J.; DAVIS, J. J. An optimised electrode pre-treatment for SAM formation on polycrystalline gold. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 621, n. 1, p. 117-120, Sep. 2008 Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022072808001691> . Acesso em 02 Out. 2021
- 19 KABIR, M. A. et al. Dengue Detection: Advances in Diagnostic Tools from Conventional Technology to Point of Care. *Biosensors*, v. 11, n. 7, June 2021. DOI : <https://doi.org/10.3390/bios11070206>
- 20 GUZMAN, M. G. et al. Dengue infection. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 2, n. 1, p. 16055, Aug. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.55>.
- 21 TEOH, B.-T. et al. The Use of NS1 Rapid Diagnostic Test and qRT-PCR to Complement IgM ELISA for Improved Dengue Diagnosis from Single Specimen. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 27663, June 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep27663> .



- 22 ADAMS, G. A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*, v. 42, n. 3, p. 48-53, June 2020. DOI: <https://doi.org/10.1042/BIO20200034> .
- 23 ELISA: Types of ELISA. **Bio-Rad**. Disponível em: [https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html?JSESSIONID\\_STERLING=90A75CE5FBDC1E9DA57D2761B6095DCF.ecommerce1&evCntryLang=CL-es&cntry=CL&thirdPartyCookieEnabled=true](https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html?JSESSIONID_STERLING=90A75CE5FBDC1E9DA57D2761B6095DCF.ecommerce1&evCntryLang=CL-es&cntry=CL&thirdPartyCookieEnabled=true)  
Acesso em: 02 out. 2021
- 24 ALCON, S. et al. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of the Antigen in the Blood during the Acute Phase of Disease in Patients Experiencing Primary or Secondary Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 2, p. 376, 2002. Disponível em: <http://jcm.asm.org/content/40/2/376.abstract> . Acesso em 02 out. 2021
- 25 SONGPRAKHON, P. et al. Peptides targeting dengue viral nonstructural protein 1 inhibit dengue virus production. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 12933, June 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69515-9> .
- 26 **BIOSCIENCE, E.** Dengue virus NS1 ELISA Kit from Eagle Bioscience. ELISA Kits, Eagle Bioscience. Disponível em: <https://www.biocompare.com/25138-Assay-Kit/13195026-Dengue-virus-NS1-ELISA-Kit/?pda=9956> . Acesso em: 23 set. 2021.
- 27 FATIBELLO-FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. *Química Nova*, v. 15, p. 28-39, 1992.
- 28 NAVAKUL, K. et al. Enhancing sensitivity of QCM for dengue type 1 virus detection using graphene-based polymer composites. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 413, n. 24, p. 6191-6198, Oct. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03410-8> .
- 29 DAMBORSKÝ, P.; ŠVITEL, J.; KATRLÍK, J. Optical biosensors. *Essays in biochemistry*, v. 60, n. 1, p. 91-100, June 2016. DOI: <https://doi.org/10.1042/EBC20150010>
- 30 RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, v. 39, n. 5, p. 1747-1763, Feb. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/B714449K> .
- 31 OMAR, N. A. S. et al. Development of an optical sensor based on surface plasmon resonance phenomenon for diagnosis of dengue virus E-protein. *Sensing and Bio-Sensing Research*, v. 20, p. 16-21, Sep. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214180417301757> . Acesso em 14 out. 2021

- 32 DA SILVA, E. T. S. G. et al. Electrochemical Biosensors in Point-of-Care Devices: Recent Advances and Future Trends. *ChemElectroChem*, v. 4, n. 4, p. 778-794, Apr. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/celec.201600758> .
- 33 ECKERMANN, A. L. et al. Electrochemistry of redox-active self-assembled monolayers. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 254, n. 15, p. 1769-1802, Aug. 2010. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854509003427> . Acesso em: 03 nov. 2021
- 34 LOVE, J. C. et al. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chemical Reviews*, v. 105, n. 4, p. 1103-1170, Apr. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr0300789> .
- 35 WANG, L. et al. Corrosion behaviour of austenitic stainless steel as a function of methanol concentration for direct methanol fuel cell bipolar plate. *Journal of Power Sources*, v. 253, p. 332-341, May 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378775313020119> . Acesso em: 03 nov. 2021
- 36 TRIPATHY, S. et al. A miniaturized electrochemical platform with an integrated PDMS reservoir for label-free DNA hybridization detection using nanostructured Au electrodes. *Analyst*, v. 144, n. 23, p. 6953-6961, Sep. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C9AN01076A> .
- 37 CECCHETTO, J. et al. An impedimetric biosensor to test neat serum for dengue diagnosis. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 213, p. 150-154, July 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400515002427> . Acesso em: 17 nov. 2021
- 38 OESCH, U.; JANATA, J. Electrochemical study of gold electrodes with anodic oxide films—I. Formation and reduction behaviour of anodic oxides on gold. *Electrochimica Acta*, v. 28, n. 9, p. 1237-1246, Sep. 1983. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0013468683850117> . Acesso em: 17 nov. 2021
- 39 DIJKSMA, M. et al. Development of an Electrochemical Immunosensor for Direct Detection of Interferon- $\gamma$  at the Attomolar Level. *Analytical Chemistry*, v. 73, n. 5, p. 901-907, Mar. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac001051h> .
- 40 WALCZAK, M. M. et al. Reductive desorption of alkanethiolate monolayers at gold: a measure of surface coverage. *Langmuir*, v. 7, n. 11, p. 2687-2693, Nov. 1991. DOI <https://doi.org/10.1021/la00059a048> .
- 41 CARVALHAL, R. F.; SANCHES FREIRE, R.; KUBOTA, L. T. Polycrystalline Gold Electrodes: A Comparative Study of Pretreatment Procedures Used for Cleaning and

Thiol Self-Assembly Monolayer Formation. *Electroanalysis*, v. 17, n. 14, p. 1251-1259, July 2005. DOI: <https://doi.org/10.1002/elan.200403224> .

42 WANG, J. et al. Shape-dependent electrocatalytic activity of monodispersed gold nanocrystals toward glucose oxidation. *Chemical Communications*, v. 47, n. 24, p. 6894-6896, May 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C1CC11784J> .

43 BURKE, L. D.; NUGENT, P. F. The electrochemistry of gold: I the redox behaviour of the metal in aqueous media. *Gold Bulletin*, v. 30, n. 2, p. 43-53, June 1997. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF03214756> .

44 TRASATTI, S.; PETRII, O. A. Real surface area measurements in electrochemistry. *Pure and Applied Chemistry*, v. 63, n. 5, p. 711-734, Jan. 1991. DOI: <https://doi.org/10.1351/pac199163050711> .

45 BOUBOUR, E.; LENNOX, R. B. Insulating Properties of Self-Assembled Monolayers Monitored by Impedance Spectroscopy. *Langmuir*, v. 16, n. 9, p. 4222-4228, May 2000. DOI: <https://doi.org/10.1021/la991328c> .

46 FERNANDES, F. C. B. et al. Comparing label free electrochemical impedimetric and capacitive biosensing architectures. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 57, p. 96-102, July 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566314000621> .

47 CHAKI, N. K.; VIJAYAMOHANAN, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 17, n. 1, p. 1-12, Jan. 2002. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566301002779> .

48 AHMED, M. U.; HOSSAIN, M. M.; TAMIYA, E. Electrochemical Biosensors for Medical and Food Applications. *Electroanalysis*, v. 20, n. 6, p. 616-626, Mar. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1002/elan.200704121> .

49 LEHR, J. et al. Label-free Capacitive Diagnostics: Exploiting Local Redox Probe State Occupancy. *Analytical Chemistry*, v. 86, n. 5, p. 2559-2564, Mar. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac403727h> .