

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 22/08/2019.

JULIA PINTO PICCOLI

***“Validação de Monocamadas Peptídicas Auto-Organizadas com Marcador Redox no
Desenvolvimento de Imunossensores Capacitivos”***

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

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli

Araraquara

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

P591v Piccoli, Julia Pinto
Validação de monocamadas peptídicas auto-organizadas
com marcador redox no desenvolvimento de
imunossensores capacitivos / Julia Pinto Piccoli. –
Araraquara : [s.n.], 2019
116 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Eduardo Maffud Cilli

1. Peptídeos. 2. Ferroceno. 3. Resistência elétrica.
4. Biossensores. 5. Eletroquímica. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Validação de Monocamadas Peptídicas Auto-Organizadas com Marcador Redox no Desenvolvimento de Imunossensores Capacitivos"

AUTORA: JÚLIA PINTO PICCOLI

ORIENTADOR: EDUARDO MAFFUD CILLI

COORIENTADOR: PAULO ROBERTO BUENO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. EDUARDO MAFFUD CILLI

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



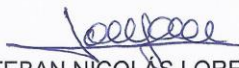
Prof. Dr. NAILTON MONTEIRO DO NASCIMENTO JUNIOR

Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. JOÃO FLAVIO DA SILVEIRA PETRUCI

Instituto de Química / Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia - UFU - Uberlândia



Prof. Dr. ESTEBAN NICOLAS LORENZÓN

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular / Instituto de Ciências Biológicas - UFG - Goiânia



Prof. Dr. OSVALDO NOVAIS DE OLIVEIRA JUNIOR

Departamento de Física e Ciência dos Materiais / Instituto de Física - USP - São Carlos

Araraquara, 22 de fevereiro de 2019

Dados Curriculares

Nome

Júlia Pinto Piccoli

Nome em citações bibliográficas

PICCOLI, J. P.; Julia Pinto Piccoli; Piccoli, Julia Pinto; Júlia Pinto Piccoli; PICCOLI, JULIA P.; PICCOLI, JÚLIA; PICCOLI, JULIA; PICCOLI, Júlia Pinto

Endereço Profissional

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara.
Rua Francisco Degni, 55
Quitandinha
14800900 - Araraquara, SP - Brasil
Telefone: (16) 33019500
URL da Homepage: www.iq.unesp.br

Formação acadêmica/titulação

- 2015 - 2019** Doutorado em Biotecnologia.
Instituto de Química - UNESP/CAR, IQ, Brasil
Título: Validação de Monocamadas Peptídicas Auto-Organizadas com Marcador Redox no Desenvolvimento de Biossensores
Orientador: Eduardo Maffud Cilli
Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2017 - 2017** com período sanduiche em University of Oxford (Orientador: Jason J Davis)
Bolsista (PDSE) Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2013 - 2015** Mestrado em Biotecnologia.
Instituto de Química - UNESP/CAR, IQ, Brasil
Título: “Avaliação da Capacitância e Condutividade em Camadas Peptídicas Nanometricamente Projetadas”, Ano de obtenção: 2015
Orientador: Eduardo Maffud Cilli
Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2009 - 2012** Graduação em Bacharel em Química.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
Título: SÍNTESE E ATIVIDADE DE CONJUGADOS ÁCIDO GÁLICO- GNRH-III
Orientador: Eduardo Maffud Cilli
Bolsista do (a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Formação complementar

- 2015 - 2015** Curso de curta duração em Módulo MUX MULTI4 e SCNR16 - para experimentos sequenciais. (Carga horária: 30h).
Instituto de Química - UNESP/CAR, IQ, Brasil
- 2015 - 2015** Curso de curta duração em Operação no Sintetizador de peptídeos - modelo Tribute. (Carga horária: 25h).
Instituto de Química - UNESP/CAR, IQ, Brasil

2014 - 2014	Curso de curta duração em Operação e manutenção básica no Sistema HPLC. (Carga horária: 10h). Instituto de Química - UNESP/CAr, IQ, Brasil
2013 - 2013	Curso de curta duração em Espectroscopia de Impedância Eletroquímica. (Carga horária: 40h). Instituto de Química - UNESP/CAr, IQ, Brasil
2013 - 2013	Curso de curta duração em Sintetizador Automático de Peptídeos PS3.. (Carga horária: 10h). Instituto de Química - UNESP/CAr, IQ, Brasil
2012 - 2012	Extensão universitária em Curso de Inglês. (Carga horária: 120h). Kaplan, KAPLAN, Estados Unidos
2009 - 2010	Espanhol. (Carga horária: 94h). Fisk University, FISK
2010 - 2010	Curso de curta duração em Cosméticos. (Carga horária: 16h). Instituto de Química - UNESP/CAr, IQ, Brasil
2010 - 2010	Extensão universitária em Curso de Espanhol. (Carga horária: 40h). COINED, COINED, Argentina
2009 - 2009	Curso de curta duração em Química Verde. (Carga horária: 4h). Instituto de Química - UNESP/CAr, IQ, Brasil
2009 - 2009	Curso de curta duração em Química e Tecnologia de Bebidas. (Carga horária: 20h). Instituto de Química - UNESP/CAr, IQ, Brasil
2000 - 2006	Curso de Inglês. (Carga horária: 474h). Cultura Americana, CA, Brasil

Atuação profissional

1.Instituto de Química - UNESP/CAr - IQ

2018 - 2018	Estágio Docência na Disciplina de Físico Química Experimental
2016 - 2016	Estágio Docência na Disciplina de Bioquímica Geral
2015 - 2017	Vínculo: Representante discente, Enquadramento funcional: Congregação, Regime: Dedicação exclusiva
2015 - 2017	Vínculo: Representante discente, Enquadramento funcional: Conselho do programa de pós em biotecnologia, Regime: Dedicação exclusiva
2013 - 2014	Vínculo: Representante Discente, Enquadramento funcional: Congregação, Regime: Dedicação exclusiva
2013 - 2014	Vínculo: Representante Discente, Enquadramento funcional: Comissão de Ética Ambiental, Regime: Dedicação exclusiva
2013 - 2015	Vínculo: Representante Discente, Enquadramento funcional: Comissão da Biblioteca, Regime: Dedicação exclusiva
2010 - 2011	Vínculo: Representante discente, Enquadramento funcional: Congregação do Instituto, Regime: Dedicação exclusiva

2010 - 2010 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Bolsista, Regime: Parcial
Outras informações:
Bolsista Fapesp no Projeto de Iniciação Científica na área de Informática e Aprendizado em Cálculo Avançado

Atividades

2011 - 2011 Direção e Administração, Instituto de Química de Araraquara
Cargos ocupados:
Presidente da Comissão Organizadora da 41 Semana da Química

2011 - 2011 Estágio, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Estágio:
Atividade de Treinamento Técnico na Disciplina de Ciência de Alimentos

2010 - 2011 Conselhos, Comissões e Consultoria, Instituto de Química de Araraquara
Especificação:
Membro Titular da Congregação do Instituto de Química

11/2010 - 11/2011 Direção e Administração, Instituto de Química de Araraquara, Diretório Acadêmico Prof. Waldemar Saffioti - DAWS
Cargos ocupados:
Presidente na Gestão Quimix 2011/2011

2009 - 2010 Direção e Administração, Instituto de Química de Araraquara, Diretório Acadêmico Prof. Waldemar Saffioti - DAWS
Cargos ocupados:
Cargo de Imprensa na Gestão Keep Walking 2009/2010

3. UNESP - FCFAR

2011 - 2011 Vínculo: Estagiária, Enquadramento funcional: Atividades de Treinamento Técnico, Regime: Dedicção exclusiva
Outras informações:
Realização de Atividades de Treinamento Técnico na Disciplina de Ciência de Alimentos do Departamento de alimentos e nutrição. Carga Horária: 90 horas

Revisor de periódico

- 1. BAOJ Neurology**
- 2. International Journal of Amino Acids**
- 3. Diversity in Health and Social Care (Print) (Cessou em 2008. Cont. ISSN 175**
- 4. Saber Científico**

5. **Journal of Food Science and Nutrition**

6. **International journal of chromatography and separation techniques**

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. LORENZÓN, E. N; **PICCOLI, J. P.**; SANTOS-FILHO, N. A.; CILLI, E. M

Dimerization of antimicrobial peptides: a promising strategy to enhance antimicrobial peptide activity. PROTEIN AND PEPTIDE LETTERS. v.26, p.E pub -, 2019.

2. SALAY, LUIZ C.; PRAZERES, ELIELMA A.; MARÍN HUACHACA, NÉLIDA S.; LEMOS, MONIQUE; **PICCOLI, JULIA P.**; SANCHES, PAULO R. S.; CILLI, EDUARDO M.; SANTOS, RUBENS S.; FEITOSA, ELOI

Molecular interactions between Pluronic F127 and the peptide tritrtpticin in aqueous solution. COLLOID AND POLYMER SCIENCE. , v.296, p.809 - 817, 2018.

3. **PICCOLI, JULIA**; HEIN, ROBERT; EL-SAGHEER, AFAF H.; BROWN, TOM; CILLI, EDUARDO M.; BUENO, PAULO ROBERTO; DAVIS, JASON J

Redox Capacitive Assaying of CRP at a Peptide Supported Aptamer Interface. ANALYTICAL CHEMISTRY, v. Just A, p.acs.analchem.7b05374 - 2018.

4. SANTOS-FILHO, NORIVAL; FERNANDES, RAFAELA; SGARDIOLI, BRUNA; RAMOS, MATHEUS; **PICCOLI, JULIA**; CAMARGO, ILANA; BAUAB, TAIS; CILLI, EDUARDO

Antibacterial Activity of the Non-Cytotoxic Peptide (p-BthTX-I)₂ and Its Serum Degradation Product against Multidrug-Resistant Bacteria. MOLECULES, v.22, p.1898 - 2017.

5. **PICCOLI, JULIA P.**; SANTOS, ADRIANO; SANTOS-FILHO, NORIVAL ALVES; LORENZÓN, ESTEBAN N.; CILLI, EDUARDO MAFFUD; BUENO, PAULO R.

The self-assembly of redox active peptides: Synthesis and electrochemical capacitive behavior. Biopolymers (New York. Print). , v.X, p.n/a - n/a, 2016.

6. SANTOS, ADRIANO; **PICCOLI, JULIA P.**; SANTOS-FILHO, NORIVAL A.; CILLI, EDUARDO M.; BUENO, PAULO R.

Redox-tagged peptide for capacitive diagnostic assays. Biosensors & Bioelectronics, v.68, p.281 - 287, 2015.

7. SANTOS-FILHO, NORIVAL A.; LORENZON, ESTEBAN N.; RAMOS, MATHEUS A.S.; SANTOS, CLAUDIA T.; **PICCOLI, JULIA P.**; BAUAB, TAIS M.; FUSCO-ALMEIDA, ANA M.; CILLI, EDUARDO M.

Synthesis and characterization of an antibacterial and non-toxic dimeric peptide derived from the C-terminal region of Bothropstoxin-I. Toxicon (Oxford). , v.103, p.160 - 168, 2015.

8. LORENZÓN, ESTEBAN N.; **PICCOLI, JULIA P.**; CILLI, EDUARDO M.

Interaction between the antimicrobial peptide Aurein 1.2 dimer and mannans. Amino Acids (Wien. Print). , v.46, p.2627 - 2631, 2014.

Capítulos de livros publicados

1. CILLI, EDUARDO MAFFUD; **PICCOLI, Júlia Pinto**; Ernandes, José Roberto; Nakaie, Clovis Ryuichi; Jubilut, Guita Nicolaewsky

Reações de clivagem ácida de aminoácidos e peptídeos ligados a polímeros: relevância para a

metodologia de síntese de peptídeo In: Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4.4 ed. Editora Blucher, 2017, p. 175-196.

2. PETRUCI, J.F.; **PICCOLI, J.P.**; FORTES, P.; CARDOSO, A.A. "Nanomaterials in (air) pollution trace detection" – Editora Elsevier, 2019

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **PICCOLI, J. P.**; HEIN, ROBERT; EL-SAGHEER, AFAF H.; BROWN, TOM; DAVIS, JASON J; CILLI, E. M. REDOX CAPACITIVE IMMUNOSENSOR SUPPORTED BY PEPTIDE INTERFACE In: SBBQ, 2018, Joinville. **47a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2018.

2. **PICCOLI, J. P.**; CILLI, E. M. Self-Assembled Monolayers of redox tagged peptides as platform for capacitive immunosensors In: IUBMB- Advanced School and POSLATAM, 2018, Varadero. **IUBMB-Advanced School and POSLATAM.** , 2018.

3. **PICCOLI, JULIA P.**; SANTOS, ADRIANO; BUENO, P. R.; CILLI, E.M. Self-assembled monolayers of redox peptides in: second International Conference on Peptide Materials for Biomedicine and Nanotechnology PepMat 2016, 2016, Barcelona. **Book of Abstracts**, 2016.

4. **PICCOLI, JULIA P.**; SANTOS, A.; SANTOS-FILHO, NORIVAL ALVES; LORENZÓN, ESTEBAN N.; BUENO, PAULO R.; CILLI, EDUARDO MAFFUD. Synthesis and electrochemical behavior os self assembled peptide monolayers In:45a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, 2016, Natal - Rio Grande do Norte. **45a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica**, 2016.

5. SANTOS-FILHO, NORIVAL A.; LORENZON, E. N.; RAMOS, M. A. S.; **PICCOLI, J. P.**; BAUAB, TAIS M.; FUSCO-ALMEIDA, ANA M.; CILLI, E.M. Dimerization of BthTX-I peptide from C-terminal region of PLA2 homologue Bothropstoxin I: effects in structure and antimicrobial activity In: 24th America Peptide Symposium, 2015, Orlando-**24th APS abstract book, 2015.** , 2015.

6. **PICCOLI, J. P.**; SANTOS, ADRIANO; SANTOS FILHO, N. A.; LORENZON, E. N.; BUENO, P. R.; CILLI, E.M. Self-Assembled Peptide Monolayer: Synthesis and Electrochemical Behavior in Biosensor In: Latin American Postgraduate Program of Biophysics, 2015, Salto. **Abstract Book.** 2015.

7. **PICCOLI, J. P.**; LORENZON, E. N.; SANTOS-FILHO, NORIVAL A.; SANTOS, A.; BUENO, P. R.; CILLI, E. M. Self-assembled peptides monolayers in capacitive biosensors In: 24th America Peptide Symposium, 2015, Orlando. **The American Peptide Society Journal. APS 24. 2015..** , 2015.

8. **PICCOLI, J. P.**; SANTOS FILHO, N. A.; LORENZON, E. N.; SANTOS, A.; FERNANDES, F. C. B.; CILLI, E.M.; BUENO, P. R. Ferrocene-Peptides: a new approach for self-assembled monolayer In: 33rd European Peptide Symposium, 2014, Sofia - Bulgaria. **33rd European Peptide Symposium.** , 2014. v.20. p.1 - 330

9. LORENZON, E. N.; **PICCOLI, J. P.**; BAUAB, T. M.; RAMOS, M. A. S.; CILLI, E.M. Interaction between the antimicrobial peptide Aurein 1.2 dimer and mannans In: 33rd European Peptide Symposium, 2014, Sofia - Bulgaria. **33rd European Peptide Symposium.** , 2014. v.20. p.1 - 330

10. SANCHES, P. R. S.; **PICCOLI, J. P.**; ROCHA, C. A.; CILLI, E. M. Design of New Conjugates peptides using electrical characteristics of breast cancer cell membrane In: 5tv Symosium on Biological Chemistry, Health and medicine, 2013, Ilhabela.

11. **PICCOLI, J. P.**; CILLI, E. M. Synthesis and activity of conjugates Gallic Acid–GnRH-III In: 5 Congresso Brasileiro de Biotecnologia, 2013 **Apresentação de Poster.** , 2013.

12. **PICCOLI, J. P.**; SANCHES, P. R. S.; CILLI, E. M. Synthesis and activity of conjugates Gallic Acid–GnRH-III In: 5th Symposium on Biological Chemistry, health and Medicine, 2013, Ilhabela. **poster presentation-2013.**

13. VICENTE, E. F.; **PICCOLI, J. P.**; COSTA FILHO, A.; NOBRE, T. M.; CILLI, E.M. Interaction of the N-terminus region of Human Dihydroorotate Dehydrogenase (HsDHODH) with Langmuir monolayers. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia - SBBq, 2012, Foz do Iguaçu. **XLI Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society.** , 2012.

14. CESPEDES, G. F.; **PICCOLI, J. P.**; NOBRE, T. M.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; VICENTE, E. F.; LORENZON, E. N.; CILLI, E.M. Synthesis and Interaction with Model Membrane of Different Dengue Virus Serotypes In: II Latin American Federation of Biophysical Societies (LaFeBS) Congress/ XXXVII Brazilian Biophysical Society Congress, 2012, Buzios. **II Latin American Federation of Biophysical Societies (LaFeBS) Congress/ XXXVII Brazilian Biophysical Society Congress.** , 2012.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. **PICCOLI, J. P.**; CILLI, E. M. Synthesis and activity of conjugates Gallic acid - GnRH-III In: 5th Congress of the Brazilian Biotechnology Society (SBBIOTEC) - **BMC Proceedings.**2014.

Orientações e Supervisões

Dissertações de mestrado

1. Natalia Caroline Silva Costa. **Peptídeo Sintético RP1 ligado com ferroceno com atividade anti-leishmania.** 2018. Dissertação (Biotecnologia) - Instituto de Química - UNESP/CAr

Iniciação científica

1. Laiz Napoli Pontes. **Desenvolvimento de Peptídeos Eletroativos com Diferentes Marcadores Redox.** 2016. Iniciação científica - Instituto de Química - UNESP/CAr

2. Thainá Cristina Leal. **Síntese e Caracterização de peptídeos derivados da miotoxina Bothrops asper Lys49.** 2018. Iniciação científica - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Patentes

1. Júlia Pinto Piccoli; CILLI, E. M.; BUENO, PAULO R. Peptide-comprising impedance electrode, 2018. Categoria: Produto. Instituição onde foi depositada: UK Patent Office. País: Inglaterra. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: 1801074.4. Data de depósito: 26/01/2018. Depositante/Titular: Júlia Pinto Piccoli, Eduardo Maffud Cilli, Paulo Roberto Bueno. Depositante/Titular: University of Oxford.

1. MOREIRA, C. G. B. ; AZEVEDO, L. B. S. ; VICENTE, E. F. ; CILLI, E. M. ; SILVA JUNIOR, L. N. ; FUZINAGA, T. Y. T. ; YOKOO, R. S. S. ; **PICCOLI, J. P.** Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020180687638, título: "método para obtenção de peptídeos análogos sintéticos ao peptídeo original utilizado no ensaio de reatividade direta com peptídeos (dpra), peptídeos análogos sintéticos, uso dos peptídeos análogos sintéticos e método in vitro para predição do potencial sensibilizante cutâneo de substâncias hidrofóbicas", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 21/11/2018

Organização de evento

1. **Semana da Química** (2009-2011).
2. **Encontro anual dos ex-alunos** (2013-2018)

Palestras ministradas

1. Síntese de Peptídeos, 2018 – Disciplina de pós-graduação USP – Ribeirão Preto;
2. Biossensores Capacitivos baseados em Peptídeos, 2016.- IQ.UNESP
3. Redox-tagged peptide for capacitive diagnostic assays, 2015. Conferência Brasil/Austrália- IQ-UNESP
4. Peptídeos: Uma Nova Ferramenta na Construção de Biossensores, 2014. Ufscar.

Outras informações

2012 - Melhores 10 trabalhos apresentados no congresso de iniciação científica da UNESP CIC: "Síntese e Atividade de conjugados Ácido Gálico – GnRH-III", UNESP

2016- 2º lugar no Concurso de Prof. Substituto de Química da UNESP Bauru – Edital 041/2016

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais Glória e Paulo, pelo amor incondicional e incentivo.

Ao meu orientador Eduardo, por toda convivência, apoio e ensinamentos.

E amigos, por estarem sempre ao meu lado.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me guiado com luz nesse caminho;

Aos meus pais, os quais sem eles eu não teria conseguido alcançar os meus objetivos da melhor maneira possível;

Ao meu orientador, Eduardo Maffud Cilli, o qual me conheceu no início de 2010, me acolheu como uma filha científica, e me transmitiu toda sua sabedoria, ensinamentos estes, que levarei para toda uma vida;

Aos meus grandes amigos: Esteban, Norival, e Lentilha, meus irmãos de ciência e hoje, professores;

A todos que estiveram presentes na minha trajetória de laboratório: Paulo, Milena, Natália, Mariana, Carol, Jaff, Teresa, Matheus, sem os quais, não seria possível um ambiente de trabalho tão agradável;

A todos funcionários do Instituto de Química, que de alguma forma sempre se disponibilizaram a ajudar;

Aos colegas Juliana e Adriano do Nanobionics, que me auxiliaram nos experimentos;

Aos amigos britânicos, que cultivo com carinho, e ao supervisor Jason J. Davis, os quais foram essenciais para chegar no final desse doutorado;

A todos amigos, que mesmo não fazendo parte do meu ambiente de trabalho, sempre me apoiaram;

Ao Prof. Osvaldo de Oliveira que disponibilizou seu laboratório do IFSP (USP – São Carlos), e ao Andrey, que muito me auxiliou nos últimos meses de doutorado.

E por último, agradeço simplesmente a todos que estiveram presentes de alguma forma na minha vida nesses quatro anos de doutorado, não importa se foi só de passagem, ou se permaneceram; então, se você me conheceu no período de 2015 a 2018, muito obrigada por ter feito a diferença na minha vida e possibilitado minha evolução.

“Happiness is the consequence of personal effort. You fight for it, strive for it, insist upon it, and sometimes even travel around the world looking for it. You have to participate relentlessly in the manifestations of your own blessings. And once you have achieved a state of happiness, you must never become lax about maintaining it. You must make a mighty effort to keep swimming upward into that happiness forever, to stay afloat on top of it.”

— Elizabeth Gilbert, *Eat, Pray, Love*

Resumo

A detecção de doenças demanda a busca por dispositivos de baixo custo, com respostas rápidas, sensíveis e seletivas, e que possam ser usados fora de laboratórios especializados (*point-of-care*). Isso é possível por meio do uso de imunossensores eletroquímicos eficazes no reconhecimento de biomoléculas (biomarcador) de relevância clínica. A eficiência dos imunossensores está associada a formação de monocamadas estáveis e inertes aos demais componentes do sistema. Filmes de peptídeos nanoestruturados contendo uma molécula redox ativa são úteis para o desenvolvimento de imunossensores, por serem estáveis e com propriedades físico-químicas controláveis. Neste trabalho, sequências peptídicas contendo uma molécula de ferroceno foram avaliadas na formação de monocamadas auto-organizadas. A melhor matriz peptídica obtida foi a de sequência Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂, com um rendimento global de síntese de 12%. Esse pequeno rendimento é atribuído principalmente a baixa estabilidade do ferroceno ao meio ácido utilizado na síntese. Sequências contendo um resíduo de Ala a mais ou a menos foram também avaliadas, mas com resultados inferiores em relação aos imunossensores obtidos. Sobre esses filmes peptídicos foram depositados anticorpos ou aptâmeros de DNA para a detecção da proteína CRP, que é um biomarcador de processos inflamatórios e doenças cardíacas. A espectroscopia de impedância eletroquímica e sua derivada capacitância foram utilizadas como técnicas, obtendo-se imunossensores com limites de detecção melhores que os já descritos na literatura, isto é, de 240 pM utilizando-se o anticorpo, e 7,2 pM para o aptâmero. O melhor resultado obtido para o aptâmero, pode ser explicado pelo seu menor tamanho em relação ao anticorpo, o que permite uma maior alteração eletrônica quando ocorre a ligação da CRP, resultando em uma sensibilidade do sistema quase 8 vezes maior (87,7 %) em relação ao imunossensor constituído pelo anticorpo (11,4 %). Ensaio de PM-IRRAS permitiram relacionar os dados analíticos obtidos com a organização do sistema, sendo que quanto maior a estruturação, melhor a detecção. A aplicação do modelo de Langmuir-Freundlich corroborou com os resultados, demonstrando que a monocamada peptídica de sequência Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ apresentou um processo de formação de SAM homogênea, com índice de heterogeneidade próximo a 1. Os resultados obtidos permitem afirmar que as monocamadas peptídicas auto-organizadas podem ser utilizadas para o desenvolvimento de biossensores com diferentes sistemas antígeno/anticorpo, o que permitiria a montagem de novos sistemas “*point-of-care*”.

Abstract

Detection of diseases requires devices that can be inexpensive, with fast, sensitive and selective responses, and can be used outside specialized laboratories (point-of-care). This is possible with electrochemical immunosensors made of nanostructured films, which effective immobilization of biomolecules is obtained to recognize biomolecules (biomarkers) of clinical relevance. Nanostructured peptide films containing an active redox molecule are useful for immunosensors because they are stable and have controllable physicochemical properties. In this work, synthesis of peptides containing redox molecules of ferrocene as self-assembled monolayers (SAMs) were studied. The best peptide matrix comprised the sequence Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂, with a global synthesis yield of 12%. This small yield is attributed by the low stability of the ferrocene in acid medium of the synthesis. Sequences containing a plus or minus Ala residue were also evaluated, showing poorest results than the immunosensors obtained. A layer of antibodies and/or aptamers of CRP, an inflammatory processes and cardiac disease biomarker, was deposited on these peptide films, developing an electrochemical immunosensor for the detection and quantification of CRP. Techniques such electrochemical impedance spectroscopy and its capacitance derived were performed, achieving immunosensors with limit of detection better than those already studied, 240 pM using the antibody as bioreceptor, and 7,2 pM, for the aptamer. The enhanced performance using the aptamer demonstrated better efficiency, once its smallest size allows a better change in the electronic system when occurs the CRP bonding, resulting in a sensitivity of the system almost 8 times superior (87.7%) than the immunosensor constituted by the antibody (11.4%). The PM-IRRAS assays in agreement with the data obtained demonstrated that organization of the system is crucial for an improved detection. The application of the Langmuir-Freundlich model also corroborated with the results, demonstrating that the peptide monolayer sequence Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ presented a homogeneous SAM formation process with a heterogeneity index close to 1. The results obtained enable to confirm that peptides monolayers can be used for the development of biosensors with different antigen/antibody systems, which would permit the advance of new point-of-care systems.

Lista de Figuras

Figura 1. Faixas aproximadas de concentração de proteínas acessíveis para diferentes técnicas analíticas.	28
Figura 2. Representação esquemática de um imunossensor.....	29
Figura 3. Representação Esquemática da interface do eletrodo com seu circuito equivalente (a) e gráfico de Nyquist impedimétrico (b).....	32
Figura 4. Esquema representativo da mudança da capacitância redox em relação às mudanças interfaciais do sistema.....	35
Figura 5. Estrutura da molécula de ferroceno redox ativa utilizada nesse trabalho. Anidrido 3-ferrocenil propiônico.	36
Figura 6. Peptídeo all-in-one em ouro com três distintas funções incorporadas na sequência: (1) reconhecimento biomolecular via RGD; (2) nonfouling via EK; e (3) superfície de ancoragem através da sequência composta por quatro prolinas (P) e um resíduo de cisteína (C).	37
Figura 7. Esquema do protocolo de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS).....	42
Figura 8. Espectrofotômetro PM IRRAS composto por um modulador fotoelástico de cristal ZnSe e uma fonte de luz infravermelha que é refletida pelo substrato metálico para o fotodetector HgCdTe.....	48
Figura 9. Estrutura Química do Peptídeo Ac-Cys-Ile-Ile-Lys(fc)-Ile-Ile-COOH.....	50
Figura 10. Perfil cromatográfico do peptídeo bruto (a); peptídeo puro (b); espectro de massas referente ao peptídeo (c) e ao peptídeo conjugado com ferroceno (d).	52
Figura 11. Voltametria cíclica da monocamada auto-organizada constituída pelo peptídeo Ac-Cys-Ile-Ile-Lys(fc)-Ile-Ile-COOH.	53
Figura 12. Representação esquemática do filme molecular formado pelo peptídeo Ac-Cys-Ile-Ile-Lys(fc)-Ile-Ile-COOH mostrando o carregamento faradaico e não-faradaico no circuito equivalente (a) e um Diagrama de Nyquist Capacitivo (b).....	54
Figura 13. Diagrama de Nyquist impedimétrico (a) e capacitivo (b) para a peptídeo Ac-Cys-Ile-Ile-Lys(fc)-Ile-Ile-COOH após formação de monocamada auto-organizada sob eletrodo de ouro; Diagrama de Bode para capacitância real (C') (c) e capacitância imaginária (C'') (d).	55
Figura 14. Estrutura química do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂	58
Figura 15. Cromatograma do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ bruto em preto e puro em vermelho (>98% de pureza) (a); espectro de massas do peptídeo redox (b); espectro do FTIR da monocamada peptídica redox em eletrodo de ouro (c); espectro de dicroísmo circular do peptídeo em solução (d).59	59
Figura 16. Voltametria cíclica obtida antes e após a formação da monocamada peptídica Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ (a); exemplo de medida de capacitância obtida no potencial in ($\sim 0,360$ V) (b).	61

Figura 17. Voltametria Cíclica da SAM formada pelo peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ (em 20 mM TBAClO ₄ ACN/H ₂ O 1:4, velocidade de varredura 100 mV s ⁻¹).	62
Figura 18. Dessorção por Voltametria Cíclica SAM formada pelo peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ (em 0.5 M KOH, velocidade de varredura 100 mV s ⁻¹).	62
Figura 19. Voltamogramas cíclicos da SAM peptídica Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ em diferentes velocidades de varredura (a) e, picos de corrente anódicos e catódicos em diferentes velocidades de varredura (b).	64
Figura 20. Diagrama de Bode para capacitância imaginária da SAM formada pelo peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂	65
Figura 21. Estabilidade da SAM formada pelo peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ . Diagrama de Nyquist Capacitivo após cada incubação em PBS (a) e sua respectiva alteração na resposta relativa da capacitância redox após cada incubação (b).	66
Figura 22. Diagrama de Nyquist capacitivo, obtido na região faradaica para os processos de modificação do eletrodo contendo SAM formada pelo peptídeo de Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ (vermelho), anti-CRP (azul) e bloqueio com BSA (roxo).	67
Figura 23. Diagrama de Nyquist Capacitivo (a); e diagrama de Bode capacitivo para capacitância imaginária (b) e capacitância real (c) do imunossensor constituído por monocamada do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ , demonstrando a sensibilidade frente a CRP na região faradaica do sistema e ausência de resposta do sensor na região não faradaica (círculos brancos).	68
Figura 24. Resposta relativa após cada incubação do imunossensor constituído por monocamada do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ em crescentes concentrações de CRP (círculos vermelhos) e, depois de incubação com BSA (triângulos amarelos) (a); comparação com 10 nM de Fetuína e 10 nM de CRP (b). Barras de erros representam o desvio relativo das medidas em três eletrodos diferentes.	69
Figura 25. Estrutura química do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH ₂	70
Figura 26. Perfil cromatográfico do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH ₂ bruto (preto) e puro (vermelho).	71
Figura 27. Voltametria cíclica da monocamada auto-organizada formada pelo peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH ₂ (a); diagrama de Nyquist capacitivo para o peptídeo em regiões faradaica e não faradaica (b).	72
Figura 28. Resposta relativa após a incubação do imunossensor contendo SAM formada pelo peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH ₂ em crescentes concentrações de CRP.	73
Figura 29. Estrutura Química do Peptídeo Fc-Glu-Ala-Cys-NH ₂	75
Figura 30. Perfil cromatográfico do peptídeo Fc-Glu-Ala-Cys-NH ₂ bruto (vermelho) e puro (preto).	76
Figura 31. Voltametria Cíclica da monocamada peptídica Fc-Glu-Ala-Cys-NH ₂ (a); diagrama de Nyquist capacitivo para montagem do imunossensor: SAM formada pelo peptídeo (vermelho), após imobilização do anti-CRP (verde) e bloqueio com BSA (marrom) respectivamente (b); diagrama de Bode para capacitância imaginária (c).	77

Figura 32. Monocamadas auto-organizadas formadas pelos peptídeos (a) Fc-Glu-Ala-Cys-NH ₂ (b) Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ (c) Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH ₂	78
Figura 33. Voltametria Cíclica da SAM obtida após imobilização do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ sobre eletrodo de ouro.....	85
Figura 34. Diagrama de Nyquist capacitivo obtido na região faradaica para os processos de modificação do eletrodo com SAM do peptídeo redox Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ (vermelho), imobilização do aptâmero (azul) e bloqueio com BSA (roxo).....	86
Figura 35. Diagrama de Nyquist Impedimétrico (a) e capacitivo (b). Diagrama de Bode capacitivo para capacitância imaginária (c) e capacitância real (d) demonstrando a sensibilidade do imunossensor constituído por monocamada do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ e receptor de aptâmeros, frente à CRP na região faradaica do sistema e ausência de resposta na região não faradaica (círculos brancos).	87
Figura 36. Resposta relativa após incubação do imunossensor, constituído por SAM do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ e receptor formado por aptâmero de DNA, em crescentes concentrações de CRP (círculos vermelhos) e BSA (triângulos amarelos) (a). Resposta após incubação com 5 nM de CRP e 1 mM de HSA (concentração 200.000 vezes maior) (b). Barras de erros representam o desvio relativo das medidas em três eletrodos diferentes.....	88
Figura 37. Curvas de Calibração para os imunossensores formados com SAMs do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ utilizando como receptor anticorpo de CRP (a) e aptâmero de DNA (b); índice de heterogeneidade próximo a 1.	90
Figura 38. Curvas de Calibração para imunossensores formados com SAMs dos peptídeos Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH ₂ utilizando anti-CRP como receptor para quantificar CRP (a), e, imunossensor formado por SAM peptídica de sequência Ac-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ (resultados no apêndice) utilizando aptâmero como receptor para quantificar a proteína C-Reativa (b); índice de heterogeneidade longe de 1.	91
Figura 39. Espectro de PM-IRRAS para o imunossensor com SAM formada pelo peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂	92
Figura 40. Espectro de PM-IRRAS para o imunossensor com SAM formada pelo peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH ₂	93
Figura 41. Espectro de PM-IRRAS para o imunossensor com SAM formada pelo peptídeo Fc-Glu-Ala-Cys-NH ₂	95
Figura 42. Estrutura química do peptídeo sem ferroceno Ac-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂	98
Figura 43. Voltametria cíclica do peptídeo Ac-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ após formação da SAM (velocidade de varredura de 100 mv s ⁻¹ e voltametria de dessorção do tiol em KOH para cálculo de recobrimento molecular	99
Figura 44. Espectro de FTIR do peptídeo Ac-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂	99
Figura 45. Estabilidade da SAM peptídica Ac-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ . Diagrama de Nyquist após cada incubação em PBS e sua respectiva mudança relativa nos valores de R_{ct}	100

Figura 46. Resposta de impedância da monocamada peptídica Ac-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ após incubação com CRP, HSA e Soro e sua respectiva resposta relativa.	100
Figura 47. Diagrama de Nyquist impedimétrico para a SAM do peptídeo Ac-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ (vermelho) após o aptâmero ser ancorado (azul) e depois do bloqueio com BSA (amarelo).....	101
Figura 48. Resposta Relativa (RR%) do imunossensor formado pelo peptídeo Ac-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ após cada concentração de CRP e diagrama de Nyquist do mesmo.	102
Figura 49. Resposta relativa (RR (%)) do imunossensor em relação ao log das diferentes concentrações de CRP utilizadas.....	102
Figura 50. Espectro de PM-IRRAS para o imunossensor com filme contendo o peptídeo Ac-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂	103
Figura 51. Estrutura química do ferroceno ácido carboxílico.....	104
Figura 52. Voltametria cíclica para o peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ com ferroceno ácido carboxílico (a) e diagrama de Nyquist capacitivo (b).	105
Figura 53. Espectro de PM-IRRAS para o peptídeo com ferroceno ácido carboxílico Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂	105

Lista de Tabelas

Tabela 1. Exemplos de biossensores utilizando EIE faradaica para detecção de diferentes biomarcadores.	33
Tabela 2. Exemplos de biossensores utilizando EIE não-faradaica para detecção de diferentes biomarcadores.	34
Tabela 3. Revisão de Peptídeos Utilizados em Sensores.	40
Tabela 4. Comparação do recobrimento molecular da monocamada peptídica redox do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ obtido por três diferentes métodos.	63
Tabela 5. Comparação de valores de kr para SAM do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ obtidos por diferentes metodologias.	66
Tabela 6. Parâmetros analíticos obtidos em solução tampão PBS (pH 7,4) para detecção da proteína CRP com o imunossensor contendo SAM do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH ₂	74
Tabela 7. Características da síntese em fase sólida dos peptídeos contendo molécula de ferroceno acoplada.	79
Tabela 8. Características eletroquímicas das monocamadas peptídicas investigadas: Cys-Ile-Ile-Lys(Fc)-Ile-Ile-COOH (1); Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH ₂ (2), Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ (3) e Fc-Glu-Ala-Cys-NH ₂ (4).	80
Tabela 9. Parâmetros voltamétricos dos conjugados ferroceno-peptídeos após formação da monocamada auto-organizada sobre eletrodo de ouro: Cys-Ile-Ile-Lys(Fc)-Ile-Ile-COOH (1); Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH ₂ (2), Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ (3) e Fc-Glu-Ala-Cys-NH ₂ (4).	81
Tabela 10. Parâmetros analíticos na detecção eletroquímica de CRP em PBS (pH 7,4) utilizando imunossensores com SAMs constituídas pelos peptídeos eletroativos Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH ₂ (2), Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ (3) e monocamada mista de aciltióis	82
Tabela 11. Performance de diferentes imunossensores eletroquímico para quantificação da CRP.	82
Tabela 12. Comparação de imunossensores para CRP utilizando aptâmero de DNA.	84
Tabela 13. Parâmetros analíticos para o imunossensor, constituído por SAM de Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ , com Aptâmero de DNA e Anti-CRP como receptores respectivamente.	89
Tabela 14. Parâmetros Analíticos para o imunossensor formado por SAM peptídica Ac-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂	102

Lista de Símbolos

α - alfa

β - beta

ε - épsilon

Δ - delta

Z' – impedância real

Z'' - impedância imaginária

C_r – capacitância redox

C^* - capacitância eletroquímica

e - carga elementar

k_B - constante de Boltzman

T - temperatura absoluta

Γ - recobrimento molecular redox da superfície.

f – frequência

ω - frequência angular

i - número complexo

Lista de Abreviaturas e Siglas

Aminoácidos

Ala (A) Alanina

Arg (R) Arginina

Asn (N) Asparagina

Asp (D) Ácido aspártico

Cys (C) Cisteína

Gln (Q) Glutamina

Glu (E) Ácido Glutâmico

Gly (G) Glicina

His (H) Histidina

Ile (I) Isoleucina

Leu (L) Leucina

Lys (K) Lisina

Met (M) Metionina

Phe (F) Fenilalanina

Pro (P) Prolina

Ser (S) Serina

Thr (T) Treonina

Trp (W) Triptofano

Tyr (Y) Tirosina

Val (V) Valina

Outras

AA - Aminoácido

Ac - acetil

ACN - Acetonitrila

AgCl - cloreto de prata

ANTI - CRP – anticorpo proteína C reativa

AFM – microscopia de força atômica

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

CRP - proteína C reativa (“C reactive protein”)

DCM - Diclorometano

DIC - *N,N'*-diisopropilcarbodiimida

DIEA – *N,N,N*-diisopropiletilamina

DMF - *N,N*-dimetilformamida

DPV – Voltametria de Pulso Diferencial

Fmoc - 9-Fluorenilmetiloxycarbonila

ECE – Espectroscopia de capacitância eletroquímica

EDC - *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida

ELISA - “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”

EIE - Espectroscopia de impedância eletroquímica

Fc - Ferroceno

HATU - Hexafluorofosfato de 2-(7-Aza-1*H*-benzotriazo-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio)

HBTU - Hexafluorofosfato de *O*-Benzotriazol-*N,N,N',N'*-tetrametilurônio

HOBt - *N*-Hidroxibenzotriazol

HPLC- “High Performance Liquid Chromatography”

CLAE - Cromatografia líquida de alta performance

LSV – Voltametria de Varredura Linear

LD – Limite de Detecção (LOD – limit of detection)

NHS - *N*-hidroxisuccinimida

NMP- *N*- metilpirrolidona

PBS - Tampão fosfato salino (“phosphate buffered saline”)

QCM - Microbalança de cristal de quartzo

SAM - Monocamada auto-organizada

SEM – Microscopia Eletrônica de Varredura

SPFS - Síntese de peptídeos em fase sólida

TEM – Microscopia Eletrônica de Transmissão

TBAClO₄ - Perclorato de tetrabutílamônio

t-Boc - terc-butíloxicarbonila

TFA - Ácido trifluoracético

VC - Voltametria cíclica

VCA – Voltametria com Corrente Alternada

VOQ – Voltametria de Onda Quadrada

XPS – Espectroscopia fotoelétrons excitado por raio X

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: OBJETIVOS.....	24
1.1 Objetivos.....	24
CAPÍTULO 2: INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 Enunciado do Problema.....	25
2.2 Biomarcadores.....	26
2.3 Técnicas “Label-free x Label-Based”	28
2.4 Biossensores Eletroquímicos	29
2.5 Espectroscopia de impedância eletroquímica	31
2.6 Espectroscopia de capacitância eletroquímica	34
2.7 Monocamadas Auto-Organizadas (SAMs) e os Peptídeos	36
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 Síntese dos Peptídeos.....	41
3.2 Reações de Clivagem	43
3.3 Purificação e Caracterização dos Peptídeos	43
3.4 Medidas Eletroquímicas	43
3.5 Limpeza e caracterização da superfície de ouro.....	44
3.6 Formação e caracterização das monocamadas automontadas (SAM)	45
3.7 Imobilização do material biológico e caracterização da superfície.....	46
3.8 Construção das curvas de calibração.....	46
3.9 Processos de adsorção.....	46
3.10 Estudos de Mecanismos de Adsorção com Espectroscopia de Infravermelho por Reflexão-Adsorção de Luz Polarizada	47
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 Peptídeo: Ac-Cys-Ile-Ile-Lys(fc)-Ile-Ile-COOH	49
4.1.1 Síntese do Peptídeo	49
4.1.2 Caracterização Eletroquímica	52
4.2 Peptídeo: Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂	57
4.2.1 Síntese do Peptídeo	58
4.2.2 Caracterização Eletroquímica	60
4.2.3 Recobrimento Molecular da Monocamada Peptídica	61
4.2.4 Método Laviron para determinação da constante de transferência eletrônica	63
4.2.5 Caracterização do imunossensor	66

4.3 Peptídeo: Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH ₂	70
4.3.1 Síntese do Peptídeo	70
4.3.2 Caracterização Eletroquímica	71
4.3.3 Caracterização do Imunossensor	72
4.4 Peptídeo: Fc-Glu-Ala-Cys-NH ₂	74
4.4.1 Síntese do Peptídeo	75
4.4.2 Caracterização Eletroquímica	76
4.5 Comparação do uso das diferentes monocamadas peptídicas e monocamadas mistas em imunossensores.....	78
4.6 Aplicação do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂ utilizando aptâmero de DNA como bioreceptor	83
4.6.1 Caracterização do Imunossensor	85
4.7 Processos de adsorção e detecção nos imunossensores.....	89
4.7.1 Processos de adsorção.....	89
4.7.2 Mecanismos de Detecção dos Imunossensores	91
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	96
5.1 Conclusões.....	96
APÊNDICE 1: Peptídeo sem Ferroceno.....	98
Peptídeo Ac-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂	98
APÊNDICE 2: Peptídeo com Ferroceno Ácido Carboxílico	104
REFERÊNCIAS	106
ANEXO 1	115
Copyright ACS	115

CAPÍTULO 2: INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enunciado do Problema

A detecção precoce de doenças é importante para diminuir a quantidade de mortes. Fato esse provocado pela falta de diagnóstico, o que demanda uma busca por novos tipos de dispositivos para esse fim (BOHUNICKY; MOUSA, 2010; TOTHILL, 2009). Esses têm sido concebidos com inspiração em sistemas naturais e por meio da manipulação de estruturas nanoscópicas, para o que é necessária a convergência das ciências biológicas, engenharias, físicas e químicas (GRAÇA et al., 2018). A física e a engenharia fornecem ferramentas para fabricar dispositivos capazes de medir características a nível celular ou sub-celular, enquanto na biologia encontra-se uma gama de nanoestruturas funcionais (DUHAN et al., 2017; RODRIGUES et al., 2018). A combinação de tais estruturas com os dispositivos de detecção não é simples, e por isso recorre-se à química para a síntese de moléculas que possam desempenhar funções semelhantes (GRAÇA et al., 2018). Entre essas moléculas merecem destaque os peptídeos, que já são usados em sensores para diagnósticos e promissores na obtenção de dispositivos de custo acessível e de fácil manuseio (LAKSHMANAN; ZHANG; HAUSER, 2012). Um dos desafios encontrados para a obtenção desses dispositivos é a imobilização de biomoléculas com capacidade de reconhecimento molecular do analito de interesse, para obter alta sensibilidade e seletividade. Uma imobilização eficiente pode ser obtida com técnicas de formação de filmes seguido de uma matriz de reconhecimento molecular, enquanto a seletividade e sensibilidade dependem da estruturação eficaz do filme nanoestruturado (SOARES et al., 2015). Por exemplo, a matriz pode ser fabricada com técnicas que permitem controle da arquitetura molecular, tais como Langmuir-Blodgett (LB) (KIM et al., 2001), automontagem por adsorção física (*Layer-by-Layer*, LbL) (RODRIGUES et al., 2018; TANG et al., 2006) e monocamadas auto-organizadas por adsorção química (*self-assembled monolayers*, SAMs) (BOLDUC; CORREIA-LEDO; MASSON, 2012a; NEWTON et al., 2013), sendo que, muitas vezes pode-se usar a combinação de vários materiais em uma mesma unidade sensorial.

As SAMs permitem precisão em nível atômico da superfície, sendo que devem ser suficientemente ordenadas para otimizar a resposta do sensor em termos de repetibilidade, sensibilidade e seletividade (GATTO; VENANZI, 2013a). A combinação de nanomateriais em alguns casos promove alto desempenho, mas a incorporação de muitos componentes pode tornar o processo de fabricação mais complexo e caro (GRAÇA et al., 2018). O desafio atual é

conseguir integrar monocamadas auto-organizadas com dispositivos cada vez mais sensíveis, seletivos e robustos, permitindo a identificação e quantificação de biomarcadores com relevância clínica em testes de rotina (TOMIZAKI; USUI; MIHARA, 2010).

2.2 Biomarcadores

Um biomarcador pode ser definido como uma molécula biológica (DNAs, RNAs, peptídeos, proteínas, etc) encontrada no sangue, soro e urina, mas também pode estar presente em alguns tipos específicos de células ou em outros fluídos biológicos (TOTHILL, 2009). A presença e o nível da concentração dos biomarcadores são essenciais para o diagnóstico precoce de doenças, permitindo aos profissionais da saúde adotarem decisões para o início do tratamento, diminuindo assim, a taxa de mortalidade (ULUDAG; TOTHILL, 2012). A importância do avanço científico na descoberta de biomarcadores está no fato de oferecer novas estratégias para diagnósticos, possibilitando a identificação de determinadas doenças, até o momento não identificadas, ou ainda em estado avançado da doença (TOMIZAKI; USUI; MIHARA, 2010).

Muitas doenças já estão sendo detectadas devido ao desenvolvimento do uso dos biomarcadores, como é o caso da doença de Alzheimer, onde o principal marcador biológico é a proteína beta amiloide, que se acumula nas placas senis, sinais bioquímicos para diagnosticar a doença (HUNTER et al., 2015; VESTERGAARD et al., 2005).

Apesar da evolução que vem ocorrendo nesse campo científico, o diagnóstico do câncer, por exemplo, ainda é bastante dificultado pela natureza dos marcadores biológicos, os quais são matrizes complexas que apresentam diversos interferentes (ULUDAG; TOTHILL, 2012). O plasma tem sido um dos alvos para a identificação de biomarcadores no diagnóstico de vários tipos de câncer. Neste sentido, as proteases liberadas por células tumorais são candidatas à biomarcadores tumorais (LI et al., 2014). Li e colaboradores utilizaram métodos sensíveis como as técnicas eletroquímicas, mais especificamente a espectroscopia de impedância eletroquímica, no desenvolvimento de biossensores para detectar câncer de próstata a partir de sequências peptídicas que são alvo das proteases liberadas por este tipo de célula (LI et al., 2014). Como por exemplo, a proteína PSA (antígeno prostático específico) é destacada como um importante biomarcador do câncer de próstata (SARKAR et al., 2002), também denominada de KLK3, sendo uma glicoproteína de 34 kDa, formada por 261 resíduos de aminoácidos e hidrolisa o peptídeo de sequência SSYSS entre os resíduos YS (LI et al., 2014). A PSA está presente em pequenas quantidades no soro de homens saudáveis, contudo, o câncer

aumenta a sua concentração, sendo utilizada como um biomarcador para a doença. Níveis de PSA maiores que 4 ng mL^{-1} já são considerados altos, levando à necessidade de biópsia (KHAN et al., 2018). Os resultados encontrados por Li e colaboradores sugeriram a viabilidade do uso de proteases no diagnóstico do câncer de próstata. O padrão de detecção foi consistente com o exame patológico tradicional (ELISA), provando que o método utilizado é uma ferramenta promissora para o diagnóstico do câncer de próstata podendo ser aplicado aos demais (LI et al., 2014).

Para o câncer de pâncreas (adenocarcinoma) um biomarcador utilizado é o CA19-9, uma glicoproteína sintetizada pelo pâncreas humano e células do duto biliar (FRIESS et al., 1995; SOARES et al., 2015). O CA19-9 é um epítipo da estrutura de carboidrato sializado Lewis^a, uma proteína de mucina de alto peso molecular, sendo o único biomarcador aprovado pelo FDA (US Food and Drug Administration) para câncer de pâncreas (GRAÇA et al., 2018).

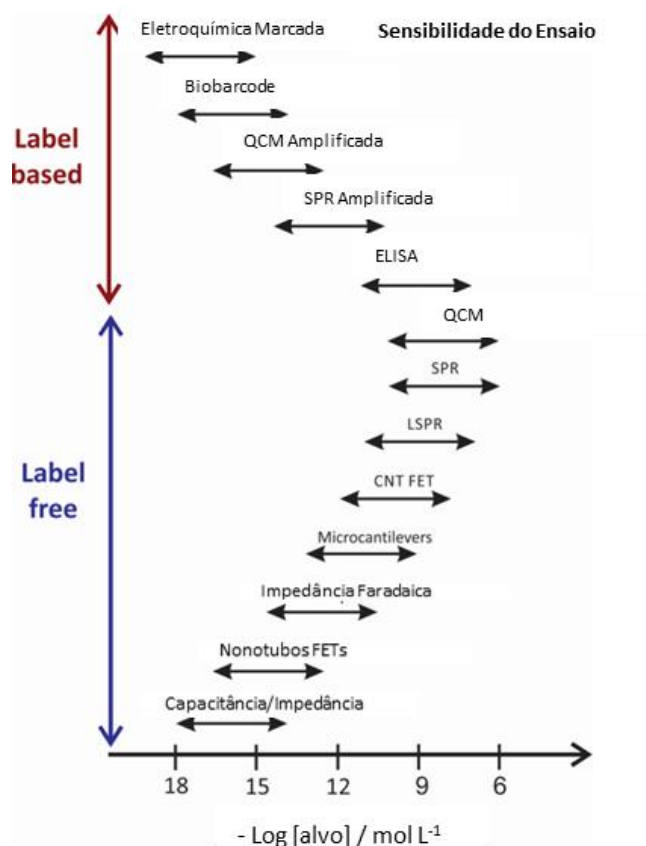
Outro exemplo de biomarcador é a proteína C-Reativa (*C-Reactive Protein*) utilizado na determinação de processos inflamatórios e doenças cardíacas (BRYAN et al., 2013). Além disso, nas últimas décadas, estudos mostraram que a CRP também está associada ao aumento do risco de problemas cardiovasculares e até mesmo indícios de câncer (GUO et al., 2015). Trata-se de uma proteína marcadora de inflamação sistêmica de fase aguda positiva, sendo que sua concentração aumenta em resposta a diversos tipos de lesões (LEITE et al., 2014). A sua produção ocorre no fígado, e, ao contrário de outros marcadores de fase aguda, seus níveis permanecem relativamente estáveis durante o evento, permitindo a sua quantificação (JOHNSON et al., 2012). Valores de CRP entre 3 mg L^{-1} e 10 mg L^{-1} podem ser indicativos de situações de inflamação mínima, acima de 10 mg L^{-1} infecções ou processos inflamatórios mais intensos, e, acima de 40 mg L^{-1} são mais compatíveis com infecção bacteriana (GUO et al., 2015).

Sendo assim, a detecção e a quantificação dos biomarcadores são essenciais para o diagnóstico precoce e/ou emergencial de doenças, permitindo aos médicos adotarem decisões para o tratamento, ou até mesmo durante cirurgias, no intuito de diminuir a taxa de mortalidade (MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017; TOTHILL, 2009). Para que a detecção e quantificação ocorra de maneira eficaz, vários métodos estão sendo utilizados, como por exemplo, técnicas que envolvem ou não marcações de analitos.

2.3 Técnicas “Label-free x Label-Based”

Atualmente os métodos para a detecção e quantificação de biomarcadores estão divididos em dois principais grupos: “label-based” e “label-free”. Ambas as abordagens são capazes de detectar uma ampla faixa de concentrações de proteínas e/ou anticorpos, como pode ser visto na figura 1.

Figura 1. Faixas aproximadas de concentração de proteínas acessíveis para diferentes técnicas analíticas.



Fonte: Adaptada de Tkac e Davis.

As técnicas denominadas “label-based” são aquelas que necessitam de marcação ou funcionalização. Entre elas destaca-se o teste ELISA, baseado em reações antígeno-anticorpo detectáveis por meio de reações enzimáticas (DE CAMARGO et al., 1984). É uma técnica de alta sensibilidade, baixo limite de quantificação, baixa variabilidade, e boa reprodutibilidade (ENGVALL; PERLMANN, 1972). Algumas desvantagens do teste de ELISA incluem falsos positivos, necessidade de grande volume de amostra e reagente, e longo tempo de espera. Além disso, é uma técnica de alto custo e sua miniaturização é dificultosa, muitas vezes não sendo

suficientemente sensível para detectar biomarcadores em níveis traços (ppm/ppb) (BERECIARTUA, 2011).

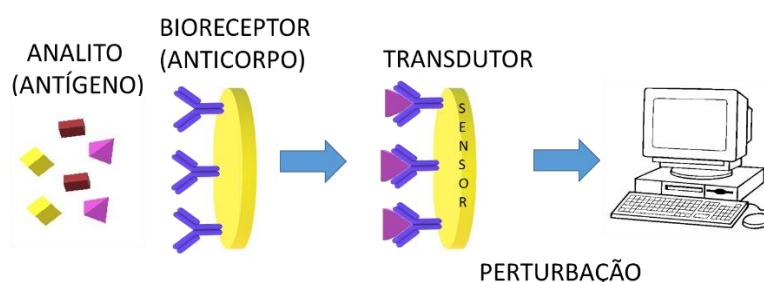
As técnicas denominadas “*label-free*”, que utilizam as propriedades intrínsecas das moléculas para sua detecção e quantificação, têm ganhado espaço, uma vez que, é possível o monitoramento em tempo real, o que possibilita desenvolver dispositivos capazes de detectar uma proteína no momento do ensaio. Dentre elas, destaca-se as técnicas eletroquímicas, as quais permitem que testes do tipo “point-of-care” sejam desenvolvidos e utilizados para diagnósticos precoces e ao lado do paciente (HU et al., 2017; WANG, 2006).

2.4 Biossensores Eletroquímicos

Ambas as abordagens citadas acima têm sido amplamente utilizadas na construção de biossensores, que são dispositivos que utilizam a tecnologia do reconhecimento biomolecular, como uma plataforma de análise seletiva para alvos relevantes (AKIBA; ANZAI, 2016; RODRIGUES et al., 2018). O potencial de aplicação dos biossensores varia desde o monitoramento ambiental, processamento de comida, controle de qualidade, até diagnósticos médicos (BOHUNICKY; MOUSA, 2010; CHEN; DRESKIN, 2016; SPINELLE et al., 2016). Clark e Lyons foram os pioneiros no campo de biossensores, quando em 1962 desenvolveram o primeiro dispositivo para detectar glicose (CLARK JR.; LYONS, 1962).

Os biossensores são dispositivos utilizados principalmente devido a sua alta especificidade, rápida velocidade de análise e baixo custo. Possuem um bioreceptor (como por exemplo um anticorpo) acoplado a um transdutor, responsável por converter o sinal de interação biológica (podendo ser o reconhecimento de um antígeno) em outro mensurável, como, por exemplo, um sinal elétrico (figura 2) (MEHROTRA, 2016).

Figura 2. Representação esquemática de um imunossensor.



Fonte: Própria Autora. Software Power Point, 2013.

Os aptâmeros de oligonucleótidos de DNA ou RNA são uma plataforma receptiva biológica amplamente utilizadas na interface dos biossensores (CITARTAN et al., 2012). Por exemplo, a montagem e a otimização de ensaios de aptâmeros para detecção de lisozima, ricina, trombina, e proteína C-reativa já foram relatadas (CHANG et al., 2014; DANIEL et al., 2017; FÖRSTER et al., 2012). Os aptâmeros têm vantagens sobre os anticorpos, como a alta estabilidade química (resistente a ambientes agressivos).

Além disso, os aptâmeros podem ser selecionados *in vitro*, para uma série de alvos biológicos, evitando abordagens biotecnológicas dispendiosas (algumas vezes usando animais). A síntese química torna o uso de aptâmeros mais simples e controlável, compreendendo técnicas de purificação eficientes, evitando a variação de lote para lote (MARRAZZA, 2017; PICCOLI et al., 2018; WU et al., 2016). Os aptâmeros permitem incorporar uma modificação específica no local da sequência alvo, o que se provou ser difícil quando utiliza-se anticorpos como receptores (KANG et al., 2009). Alguns autores realizaram ensaios com biossensores utilizando aptâmeros nucleicos para detectar PSA, chegando a encontrar valores de limite de detecção de $0,25 \text{ ng mL}^{-1}$ (LIU et al., 2012). Em outro estudo, Souada e colaboradores realizaram, por meio de técnicas eletroquímicas a detecção de PSA a partir de um aptâmero de DNA, de sequência: “ATTAAAGCTCGCCATCAAATAGC”, seletivo e apresentando constante de afinidade aptâmero/PSA em níveis nanomolares (SOUADA et al., 2015). Além disso, Ikebukuro já havia patenteado a mesma sequência, demonstrando sua alta capacidade de reconhecimento ao alvo PSA. Em outro exemplo, Deng e colaboradores demonstraram que um octapeptídeo pode ser utilizado para detectar PSA, através da clivagem proteolítica da sequência, por meio de um sistema de transdução eletroquímica (DENG et al., 2013). Além disso, biossensores baseados em aptâmeros para o diagnóstico de trombina, proteína envolvida em eventos de coagulação, já foram bem estudados e validados (SÁNCHEZ, 2006).

Ressalta-se que entre os biossensores, os denominados imunossensores são dispositivos que exploram especificamente a capacidade de reconhecimento biomolecular das interações anticorpo/antígeno (Ab-Ag) (MAKARAVICIUTE; RAMANAVICIENE, 2013).

A ligação do analito com o bioreceptor induz alteração das propriedades elétricas passível de detecção com diferentes técnicas. Os imunossensores baseados na detecção eletroquímica são apropriados para comercialização, uma vez que, sua performance é atribuída à sua sensibilidade, especificidade, e, seletividade, mesmo quando empregado diretamente em matrizes complexas como soro sanguíneo (AKIBA; ANZAI, 2016; WANG, 2006). As técnicas eletroquímicas incluem: voltametria cíclica, amperometria, voltametria com potencial linear,

espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), entre outras (SANTOS et al., 2015; WANG, 2006).

2.5 Espectroscopia de impedância eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) é uma técnica sensível, onde, a mudança da resistência de transferência de carga que ocorre na interface do sistema é acessada como transdutor do reconhecimento do analito, apresentando algumas vantagens comparada com outras técnicas eletroquímicas. A mais significativa é a alta sensibilidade sem necessidade de marcar o alvo ou utilizar elementos secundários marcados (BOGOMOLOVA et al., 2009; DANIELS; POURMAND, 2007; LISDAT; SCHÄFER, 2008).

A impedância mede a resposta da corrente à aplicação de uma voltagem com corrente alternada (AC) ou polarização de corrente contínua (DC) (normalmente como função de frequência). De acordo com os dados obtidos, termos resistivos e capacitivos são quantificados, os quais respondem com alta sensibilidade às mudanças que ocorrem na interface de um eletrodo (XU; DAVIS, 2014). Análises de EIE estão integradas em dispositivos formados por filmes nanoestruturados e organizados (SAMs), dependendo da presença ou ausência da sonda redox (por exemplo: complexos de ferro) os processos são considerados faradaicos ou não-faradaicos (BUENO; DAVIS, 2014a; XU; DAVIS, 2014). A voltagem senoidal aplicada ao sistema ocorre em torno de 5 – 20 mV de amplitude, para polarização de corrente contínua, e em torno de 0 mV para EIE não faradaica e, em geral < 250 mV para EIE faradaica.

Nos ensaios faradaicos, um circuito equivalente denominado Randles é escolhido para analisar os componentes físicos e eletroquímicos. Três camadas são consideradas na interface: a dupla camada (próxima ao eletrodo), a camada de difusão e a resistência da solução. Na aplicação da voltagem no eletrodo/interface do eletrólito, um alinhamento e solvatação dos íons é iniciado ao longo do eletrodo, onde a dupla camada elétrica é gerada e associada à capacitância (C_{dl}). Para ensaios faradaicos, R_{ct} é a resistência de transferência de carga que ocorre na interface, sendo afetada pelo potencial onde a reação redox ocorre na superfície do eletrodo (figura 3a). Já a barreira de ativação gerada na interface, como resultado de impedimento eletrostático e/ou estérico, R_s , refere-se à resistência gerada na solução. A impedância de Warburg representa a difusão de íons na solução (Z_w) (BUENO; DAVIS, 2014).

Para fins analíticos, utiliza-se a impedância faradaica, por meio do monitoramento de R_{ct} em função da concentração do analito. Dentro desses parâmetros, capacitância e resistência são os que respondem sensitivamente as alterações da interface. A análise da impedância é

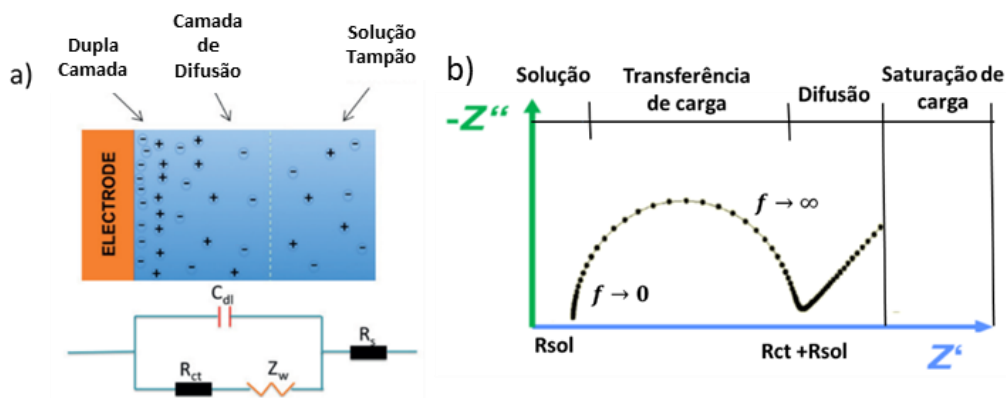
realizada por meio do ajuste dos dados experimentais (gráfico de Nyquist em que a parte imaginária é mostrada em função da parte real $-Z''$ versus Z' , figura 3b) (BUENO; BENITES; DAVIS, 2016; GÓES et al., 2012; XU; DAVIS, 2014).

Os termos de impedância e capacitância são uma relação inversa de acordo com a equação abaixo.

$$Z = [(j\omega)^\alpha C]^{-1}$$

onde Z é a impedância, α é o coeficiente empírico, ω é a frequência angular ($\omega = 2\pi f$), f é a frequência aplicada em Hz, j é a unidade $(-1)^{1/2}$ imaginária, e C é a capacitância total (BUENO; MIZZON; DAVIS, 2012).

Figura 3. Representação Esquemática da interface do eletrodo com seu circuito equivalente (a) e gráfico de Nyquist impedimétrico (b).



Fonte: Xu and Jason, 2014.

Aplicações dessa técnica podem ser vistas na tabela 1, onde Elshafey e colaboradores utilizando o biomarcador MDM 2, de tumor cerebral, construíram um imunossensor com anticorpos, ancorados em monocamadas constituída por cistamina em eletrodos de ouro modificados, alcançando limite de detecção na ordem de pg mL^{-1} (ELSHAFEY et al., 2013).

Outras interfaces modificadas por cistamina e anticorpos geraram imunossensores eficientes para detecção de VEGF, biomarcador de câncer de mama e mioglobina (ELSHAFEY et al., 2013; SEZGINTÜRK, 2011). Além disso, muitos nanomateriais biocompatíveis são utilizados para modificação de eletrodos, como exemplo Lui e colaboradores apresentaram um imunossensor para diabetes utilizando o biomarcador Hb-A1c, imobilizado em nanopartículas sob eletrodo de carbono vítreo (LIU; IYENGAR; GOODING, 2012).

Muitas sequências de DNA estão sendo utilizadas como bioreceptores para biomarcadores com relevância clínica. Recentemente um estudo para biomarcador BRCA1 de câncer de mama reportou limite de detecção de $0,3 \text{ ng mL}^{-1}$ utilizando digestão enzimática de

DNA (XU et al., 2012). Em outro exemplo foi realizada a detecção do gene relacionado a leucemia crônica, em eletrodos modificados por nanopartículas de ouro, com limite de detecção de $0,007 \text{ ng mL}^{-1}$ (ENSAFI et al., 2011).

Tabela 1. Exemplos de biossensores utilizando EIE faradaica para detecção de diferentes biomarcadores.

Biomarcador	Doença	Limite de detecção (ng mL^{-1})	Ref.
Troponina cardíaca T	Insuficiência Cardíaca	0,2	(CHUA et al., 2009)
Alfa-fetoproteína (AFP)	Câncer de Fígado	0,0005	(TANG et al., 2011)
Proteína C-reativa	Inflamação e eventos cardíacos	0,1	(BRYAN et al., 2013)
Hemoglobulina-A1c	Diabetes	N/A	(LIU; IYENGAR; GOODING, 2012)
Receptor do fator de crescimento epidérmico	Tumor epitelial	0,00034	(ELSHAFEY et al., 2013)
Insulina	Diabetes	0,007	(XU; LUO; DAVIS, 2013)
hGH anticorpo monoclonal	Desordem de crescimento	0.00064	(REZAEI et al., 2009)
MDM2	Tumor cerebral	0.00029	(ELSHAFEY et al., 2013)
VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular)	Câncer de mama	N/A	(SEZGINTÜRK, 2011)
Mioglobina	Doenças cardiovasculares	5,2	(RAJESH et al., 2010)
DNA	Leucemia crônica	0,007	(ENSAFI et al., 2011)
BRCA1 (DNA)	Câncer de mama	0,3	(XU et al., 2012)

Fonte: Própria Autora

Em estudos pioneiros, Berggren e colaboradores através da EIE não faradaica, detectaram o hormônio gonadotrofina com limite de detecção de $0,001 \text{ ng mL}^{-1}$, utilizando anticorpo monoclonal em eletrodos de ouro modificados com SAMs (BERGGREN; JOHANSSON, 1997). Em trabalho similar, interferon foi detectado na ordem de 10^{-6} (tabela 2) (DIJKSMA et al., 2001).

Tabela 2. Exemplos de biossensores utilizando EIE não-faradaica para detecção de diferentes biomarcadores.

Biomarcador	Doença	Limite de detecção (ng mL ⁻¹)	Ref.
HCG	Doença trofoblástica gestacional	0,001	(BERGGREN; JOHANSSON, 1997)
Interferon	Auto-inflamação	2×10^{-6}	(DIJKSMA et al., 2001)
Insulina	Diabetes	2×10^{-5}	(XU; LUO; DAVIS, 2013)
Proteína C-Reativa	Inflamação e eventos cardíacos	0,001	(BRYAN et al., 2013)

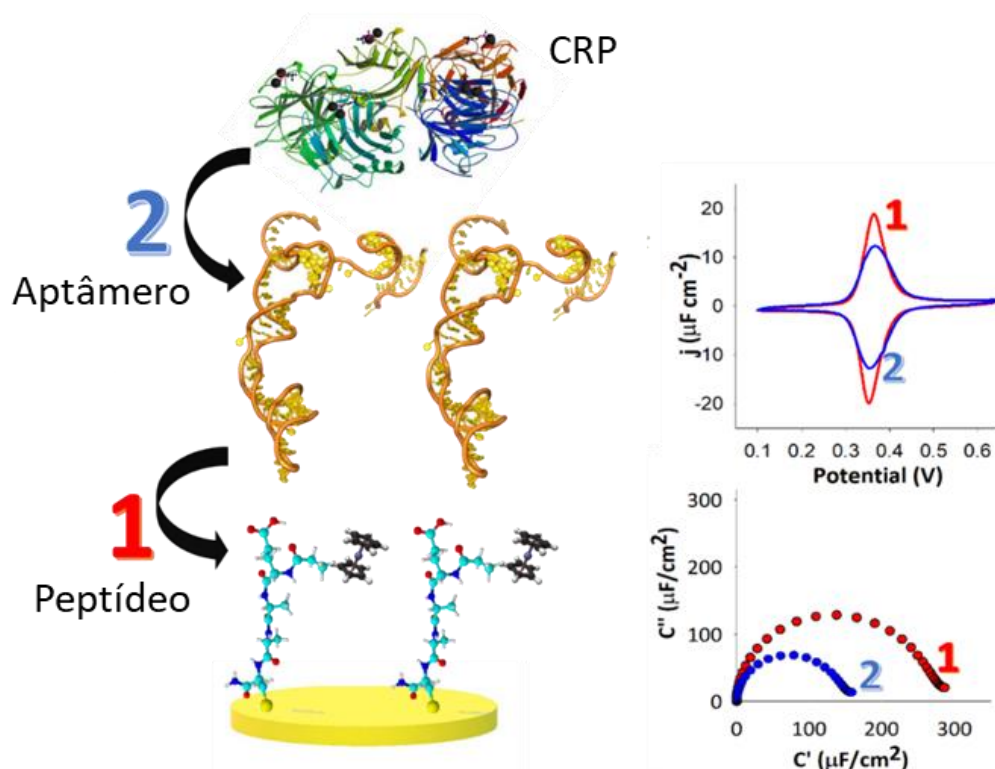
Fonte: Própria Autora

2.6 Espectroscopia de capacitância eletroquímica

Recentemente, Jason e colaboradores introduziram a espectroscopia de capacitância eletroquímica, um método baseado na EIE, o qual mapeia a mudança interfacial da capacitância redox (C_r) como transdutor do evento capacitivo em filmes confinados, como pode ser visto na figura 4 (BUENO; DAVIS, 2014b; BUENO; FABREGAT-SANTIAGO; DAVIS, 2012). O diâmetro do semicírculo nos gráficos de Nyquist capacitivos é o valor correspondente aos eventos de reconhecimento, sendo que, conforme a interface é alterada, pode-se notar diferença nos mesmos, omitindo assim a necessidade da presença de uma sonda redox em solução. Além disso, já foi demonstrado que, esse sinal gerado na superfície é fundamentalmente quântico (BUENO; BEDATTY FERNANDES; DAVIS, 2017; BUENO; DAVIS, 2014b).

Na presença de um filme molecular capaz de se ligar seletivamente a um analito, C_r se torna sensível a função de concentração do alvo de interesse (figura 4). Para datar, tais interfaces vêm sendo criadas por imobilização covalente de bioreceptores em uma SAM mista, sendo um componente redox e outro servindo como âncora para o bioreceptor (FERNANDES et al., 2013b). A camada ativa pode ser obtida recobrando-se eletrodos através de SAMs, cuja interação com o analito fornece um sinal capacitivo mensurável (QURESHI et al., 2010).

Figura 4. Esquema representativo da mudança da capacitância redox em relação às mudanças interfaciais do sistema



Fonte: Piccoli et al, 2018. Software Power Point, 2013.

Neste caso, os dispositivos incorporam o elemento de reconhecimento sobre a superfície de um eletrodo metálico com características condutoras, onde o sinal de transdução está relacionado com a transferência eletrônica de um par redox em solução ou de alguma espécie eletroativa confinada, e as alterações na capacitância do sistema ocorrem devido à interação biológica (antígeno/anticorpo) (BRYAN et al., 2013).

A capacitância redox é sensível a interface e ao ambiente onde os grupos redox estão presentes. Davis, por exemplo, demonstrou que altos valores de constante dielétrica de solventes utilizados causam maior polarização e dispersão energética em filmes formados por ferrocenil, evento esse que também influencia o reconhecimento de antígeno-anticorpo, tornando essa abordagem como potencial ferramenta para transdução de sinal e, consequentemente, para o desenvolvimento de imunossensores (BUENO; FABREGAT-SANTIAGO; DAVIS, 2012).

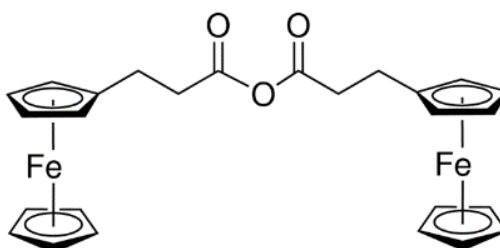
A espectroscopia faradaica de capacitância derivada da impedância foi reportada como alternativa à técnicas não faradaica e como exemplo, Lehr e colaboradores estabeleceram um ensaio sensível para PAP (biomarcador de câncer de próstata) e CRP, encontrando melhorados

limites de detecção na ordem de picomolar, com 11 e 28 pM respectivamente (LEHR et al., 2014, 2017).

Recentemente Piccoli e colaboradores, utilizando a capacitância redox, reportaram ensaio de imunossensor para proteína CRP utilizando aptâmero de DNA ancorada em monocamada peptídica, contendo sonda redox confinada, obtendo limite de detecção na ordem de 7,2 pM (PICCOLI et al., 2018).

A utilização da molécula ferroceno nos imunossensores eletroquímicos atraiu grande interesse, uma vez que, a molécula apresenta um comportamento redox, e, pode ser utilizada como bloco de construção para ser incorporado em diversas monocamadas auto-organizadas, como por exemplo em peptídeos, gerando uma plataforma específica e sensível em ensaios de biosensoriamento eletroquímico (HEINZE; WILD; BECKMANN, 2007; MARTIĆ et al., 2011).

Figura 5. Estrutura da molécula de ferroceno redox ativa utilizada nesse trabalho. Anidrido 3-ferrocenil propiônico.



Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>

2.7 Monocamadas Auto-Organizadas (SAMs) e Peptídeos

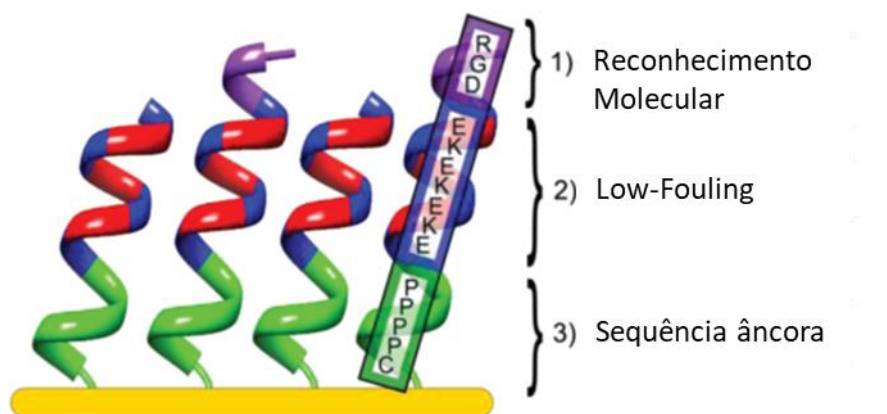
As monocamadas auto-organizadas (SAMs) são de fácil preparação, não requerem equipamentos especializados, podem ser obtidas em diversos tamanhos, permitem o acoplamento do ambiente externo a um eletrônico, e possuem flexibilidade na utilização de grupos funcionais de maneira a formarem superfícies hidrofílicas ou hidrofóbicas (BOLDUC et al., 2009; GOODING et al., 2003). SAMs devem ser química e eletroquimicamente estáveis, organizadas e robustas, com moléculas cujas características sejam facilmente ajustáveis. Os peptídeos apresentam todas essas características, incluindo compatibilidade com biomoléculas (NEWTON et al., 2013), e podem formar SAMs em interfaces metálicas, evitando agregação de moléculas não específicas (*nonfouling*) (CHEN; CAO; JIANG, 2009). Isso é relevante

porque a adsorção não específica limita a aplicação de imunossensores em ambientes biológicos complexos. Com filmes de acilrídeos, utilizados na maioria dos imunossensores, essa adsorção não específica seria um problema. Os filmes com peptídeos apresentam a vantagem da estabilidade de ter propriedades físico-químicas controláveis, importantes para sensoriamento (BOLDUC et al., 2009; BOLDUC; CORREIA-LEDO; MASSON, 2012b; KNICHEL et al., 1995).

Neste contexto, a síntese com o protocolo Fmoc na Síntese Peptídica em Fase Sólida (SPFS) (MERRIFIELD, 1963) possibilita grande flexibilidade para o planejamento (*design*) do peptídeo, que pode possuir características hidrofóbicas, hidrofílicas, zwitteriônicas, com estrutura secundária definida ou não. Além disso, a sequência peptídica pode ser desenhada de maneira a conter aminoácidos que se ligam covalentemente a um eletrodo de ouro, por exemplo através do resíduo de cisteína (CARUSO et al., 2016; CHO; IVANISEVIC, 2005).

Nowinski e colaboradores sintetizaram o peptídeo de sequência EKEKEKE, que evitou adsorção para fibrinogênio e lisozima na ordem de 38,9 e 5,3 ng cm⁻² respectivamente (NOWINSKI et al., 2012). Demonstrou-se também que na presença de resíduos hidrofóbicos, a interação entre as cadeias é favorecida. Para o peptídeo de sequência EKEKEKE-PPPPC foram encontrados valores de 17,9 e 4,5 ng cm⁻² para o fibrinogênio e a lisozima (figura 6) (NOWINSKI et al., 2012).

Figura 6. Peptídeo all-in-one em ouro com três distintas funções incorporadas na sequência: (1) reconhecimento biomolecular via RGD; (2) nonfouling via EK; e (3) superfície de ancoragem através da sequência composta por quatro prolínas (P) e um resíduo de cisteína (C).



Fonte: Figura retirada de Nowinski et al, 2012.

Peptídeos não geram sinais eletrônicos mensuráveis em resposta à ligação ao alvo, portanto é necessário acoplar um marcador para ter um sinal mensurável. Biossensores eletroquímicos têm sido produzidos com peptídeos e marcadores redox, como ferroceno e azul

de metileno (MB), que podem detectar proteínas, proteases, ácidos nucleicos e anticorpos (imunossensores) (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2016). Sensores já foram construídos, por exemplo, com peptídeos helicoidais de aminoácidos não naturais como o carbono alfa tetra-substituído (ácido alfa aminobutírico – conhecido como Aib) e funcionalizados na porção N-terminal por ácido lipóico (GATTO; VENANZI, 2013b). Peptídeos helicoidais apresentam condução eletrônica determinada por dois mecanismos competitivos: tunelamento (supertroca através da ponte peptídica, que predomina para peptídeos menores) e hopping de elétrons através das regiões de amida (GATTO; VENANZI, 2013b; LONGO et al., 2015). O último mecanismo permitiu a transferência eletrônica de longo alcance, com distâncias manométricas. Além disso, peptídeos helicoidais formam filmes nanoestruturados cujo comportamento é definido pela estrutura secundária e agem como mediadores para transferência eletrônica (GATTO; VENANZI, 2013b).

A estratégia se torna completa com a funcionalização na região C-terminal com cisteína ou ácido lipóico (interação Au-S) e uma estrutura secundária helicoidal, como os resíduos de Aib (ácido alfa aminobutírico) (GATTO; VENANZI, 2013b). A funcionalização da porção N-terminal com grupos eletroativos também garante que o mesmo esteja suficientemente longe da superfície do ouro para evitar interações ouro/sonda, e que a solução eletrolítica seja acessível. Outra vantagem é que o peptídeo na SAM seja rígido, minimizando o desordenamento terminal e os efeitos da dinâmica das cadeias. Peptídeos formados por resíduos de Aib e Ala (alanina), funcionalizados por resíduo de *2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl-4-amino-4-carboxylic acid*, conhecido como TOAC, foram investigados por Gatto e colaboradores (GATTO; VENANZI, 2013a), e peptídeos formados por resíduos de Ala e funcionalizados por ferroceno foram utilizados em biossensores eletroquímicos por Piccoli e colaboradores (PICCOLI et al., 2018; SANTOS et al., 2015).

Zaitouna e colaboradores utilizaram peptídeos com azul de metileno para imunossensor de HIV, obtendo resultados adequados com recobrimentos moleculares para filmes densamente empacotados de $3.0 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$ (ZAITOUNA; MABEN; LAI, 2015). Gonzalez-Fernandez et al demonstraram que peptídeos funcionalizados com MB levam a sensores com desempenho superior aos obtidos com peptídeos funcionalizados com molécula de ferroceno. Para o sensor de tripsina, por exemplo, obteve-se um limite de detecção de 250 pM com azul de metileno (ZAITOUNA; MABEN; LAI, 2015) utilizando técnica eletroquímica para detecção (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2016).

Na tabela 3 pode-se notar os numerosos trabalhos datados com peptídeos na fabricação de sensores utilizando diferentes métodos eletroquímicos. Os mesmos podem variar desde sua

utilização em filmes nanoestruturados (formação de SAMs) como as sequências EKEKEKE-PPPPC, SGSGSG, LA-Aib₄-Trp-Aib(OtBu), ou, como moléculas bioreceptores de um alvo de interesse. Por exemplo os autores Etayash e colaboradores identificaram células de câncer de mama através peptídeo de sequência WxEAAYQrFL com limite de detecção de 50-100 células mL⁻¹ (ETAYASH, 2015). Além disso, mais recentemente, Leo e colaboradores utilizando filme de peptídeo com sequência CGSGSGS, e o peptídeo QLGPYELWELSH como receptor, conseguiram identificar anticorpos de Rituximab, resultados esses importantes para o avanço do campo de peptídeos em sensoriamento (LEO et al., 2015).

Tabela 3. Revisão de Peptídeos Utilizados em Sensores.

Ref	Técnicas utilizadas	Peptídeo como SAMs	Peptídeo como Bioreceptor
(ETAYASH, 2015)	Micro cantilever	---	WxEAAYQrFLC
(GATTO; VENANZI, 2013b)	VC	Lipoic Acid-Aib ₄ -Trp-Aib(OtBu)	--
(GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2016)	VOQ	Ahx PEG	Fc-FRR Fc-frr
(CUI et al., 2017)	EIE	<u>EKEKEKE-PPPPC</u>	---
(LEO et al., 2015)	QCM, AFM, EIE, elipsometria	<u>CGSGSGS</u>	WPRWLEN
(CUI et al., 2017)	QCM, AFM, EIE, elipsometria	<u>CGSGSGS</u>	QLGPYELWELSH
(LI et al., 2012)	VOQ	MUA	RGTWEGKWK-Fc
(LI, 2013)	VC	MCH	YHWYGYTPQNV
(PAWLOWSKI et al., 2012)	AFM and VC	(Boc)-Cys-(S-Acm)-(Ala-Leu) _n -NH-(CH ₂) ₂ -SH	---
(VALENCIA et al., 2016)	VC	---	Fc-Ahx-SPINNTKPHEAR
(ZAITOUNA; MABEN; LAI, 2015)	VCA e VC	---	EAAEWDRVH P-K-MB
(ZAITOUNA; MABEN; LAI, 2015)	VCA e VC	<u>SGSGSG</u>	EAAEWDRVH P-K-MB
(ZAITOUNA; MABEN; LAI, 2015)	VCA e VC	<u>EKEKEK</u>	EAAEWDRVHP-K-MB
(JING et al., 2015)	VC, DPV, SEM e TEM	---	biotin-GPLGVRGKGGC
(MANNOOR et al., 2010)	EIE	---	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS
(HE et al., 2015)	VC, LSV e SEM	---	CHSSKLQK
(SHANG et al., 2011)	QCM, VC, EIE e AFM	<u>CGSGSGS</u>	QLGPYELWELSH
(YANG et al., 2017)	VC e XPS	---	PGGSTPVSANMKYYYYYY

Fonte: Própria Autora

Nesse trabalho, buscou-se a construção de imunossensores eletroquímicos, utilizando filmes peptídeos nanoestruturadas para imobilizar o anticorpo e aptâmero (DNA) de CRP

CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

5.1 Conclusões

A síntese de peptídeos em fase sólida possibilitou a obtenção de peptídeos marcados com uma sonda redox. Os peptídeos foram sintetizados contendo uma molécula de ferroceno, possibilitando assim, uma abordagem eletroanalítica.

Os peptídeos desenhados nesse trabalho possibilitaram a formação de monocamadas auto-organizadas. Essas foram confirmadas por meio da voltametria cíclica realizada após imobilização do peptídeo ao eletrodo (presença dos picos anódicos e catódicos). As interfaces formadas, após a ligação do anticorpo ou do aptâmero, foram adequadas para detectar e quantificar a proteína CRP com baixo limite de detecção ($0,24 \text{ nmol L}^{-1}$), por meio do biosensoriamento capacitivo redox. A capacidade de detectar o alvo está relacionada com a resposta capacitiva da sonda redox ligada aos peptídeos, a qual se mostrou sensível a alterações no seu ambiente (interação anticorpo-antígeno) e da transmissão dessa perturbação para o ouro.

Ressalta-se que, além de apresentar sensibilidade similares ou superiores aos alciltíois, os imunossensores formados pelos peptídeos possuem outra vantagem, que é a propriedade não-incrustantes.

Os resultados aqui apresentados destacam a utilidade e o promissor potencial de peptídeos eletroativos para o desenvolvimento de técnicas “label-free” sensíveis e seletivas para diferentes biomarcadores relacionados a outros tipos de doenças, utilizando biosensoriamento capacitivo redox.

Em resumo, este trabalho introduziu peptídeos que ao se ligarem a superfície de ouro formam monocamadas auto-organizadas e com boas características físico-químicas e bioquímicas. Estas novas interfaces podem servir como uma alternativa para as monocamadas tradicionais, como os alciltíois. Somado a isto, a estrutura da monocamada peptídica é homogênea e possui como componente único o peptídeo redox, isto é, já contendo o ferroceno e o sítio de ancoragem de receptor. As SAMs de alciltíois são mistas, cadeias contendo sonda redox misturadas com cadeias sem a sonda, podendo apresentar regiões não homogêneas.

As monocamadas peptídicas podem desempenhar um importante papel como filmes nanoestruturados para utilização em biossensores. Os peptídeos permitem minimizar os efeitos de agregação de outras moléculas não específicas e diminuir etapas na construção do imunossensor, facilitando o controle das propriedades do filme. Assim, espera-se gerar sensores mais sensíveis, seletivos e estáveis. A validação de sensores utilizando SAM peptídicas foram realizadas nesse trabalho, permitindo que diferentes biomarcadores possam agora ser avaliados.

Desta forma, acredita-se que, os sensores com peptídeos possam se tornar uma ferramenta relevante na medicina.

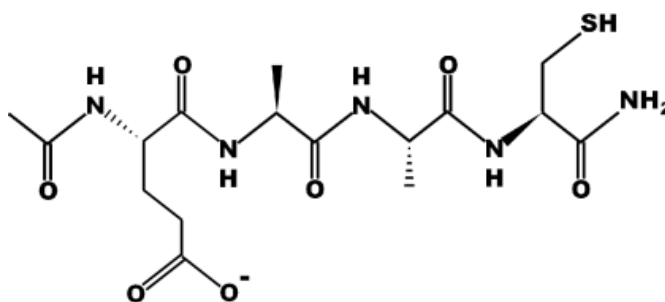
APÊNDICE 1: Peptídeo sem Ferroceno

Peptídeo Ac-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂

O trabalho utilizou peptídeos contendo a sonda redox ferroceno confinada na monocamada, principalmente para que não houvesse necessidade da mesma em solução. Porém alguns testes também foram realizados com o peptídeo contendo duas alaninas e sem a presença do ferroceno, e os resultados encontram-se abaixo.

Como o ferroceno era colocado na extremidade N-terminal, eliminando a carga do grupo amino, para esse peptídeo foi necessário o processo de acetilação, assim a extremidade amino não ficaria carregada positivamente, atrapalhando a imobilização do receptor ao grupo carboxila do ácido glutâmico.

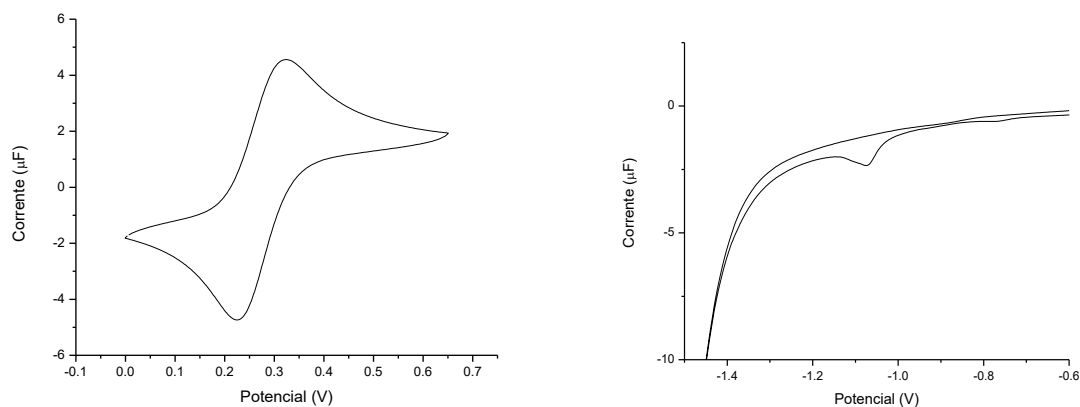
Figura 42. Estrutura química do peptídeo sem ferroceno Ac-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂.



Fonte: Própria Autora. Software PepDraw online.

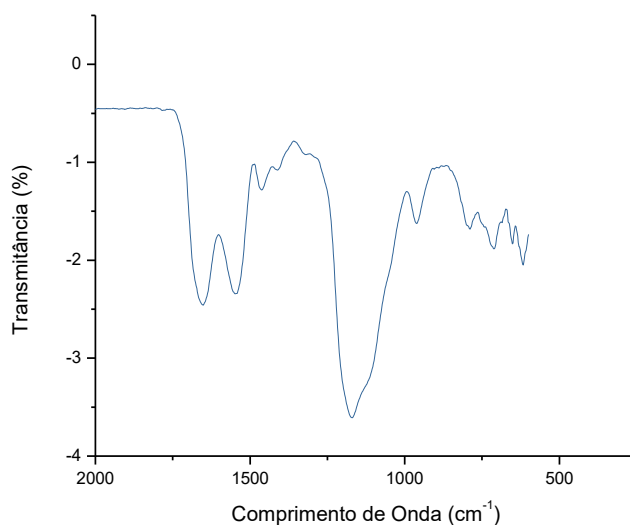
As medidas eletroquímicas foram realizadas na presença de ferroceno metanol 1 mM em PBS. Após imobilização do peptídeo no ouro o voltamograma demonstrou o bloqueio do sistema como pode ser visto na figura 43. As medidas de EIE foram realizadas em potencial de circuito aberto. O recobrimento molecular encontrado foi de 1.4×10^{-10} mol cm⁻². O espectro de FTIR do peptídeo apresentou uma banda em torno de 1654 cm⁻¹ de amida I em concordância com o peptídeo com ferroceno (figura 44).

Figura 43. Voltametria cíclica do peptídeo Ac-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ após formação da SAM (velocidade de varredura de 100 mv s⁻¹ e voltametria de dessorção do tiol em KOH para cálculo de recobrimento molecular.



Fonte: Própria Autora. Software Origin Pro 8.0.

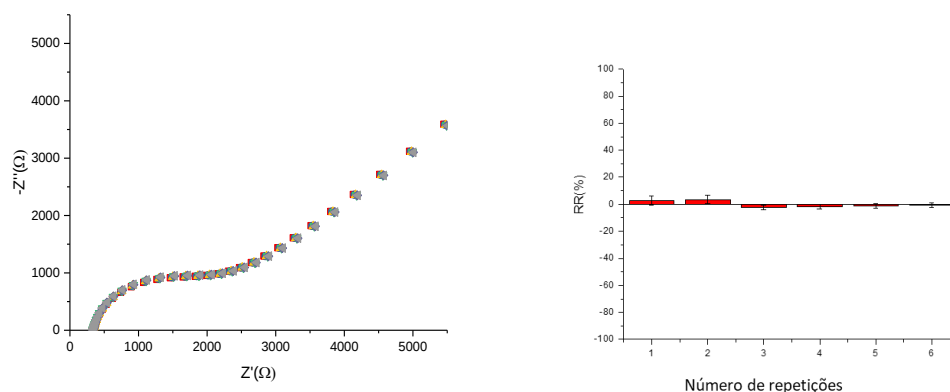
Figura 44. Espectro de FTIR do peptídeo Ac-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂.



Fonte: Própria Autora. Software Origin Pro 8.0.

Estudos de estabilidade foram realizados com o eletrodo imerso em PBS durante 30 min e medidas consecutivas de EIE de uma em uma hora, durante 6 h (figura 45). A SAM peptídica demonstrou ser estável com mínima alteração no sinal de resistência de transferência de carga (R_{ct}). Os erros da figura 46 b estão relativamente altos devido a grande diferença nos valores de R_{ct} entre os 3 eletrodos testados.

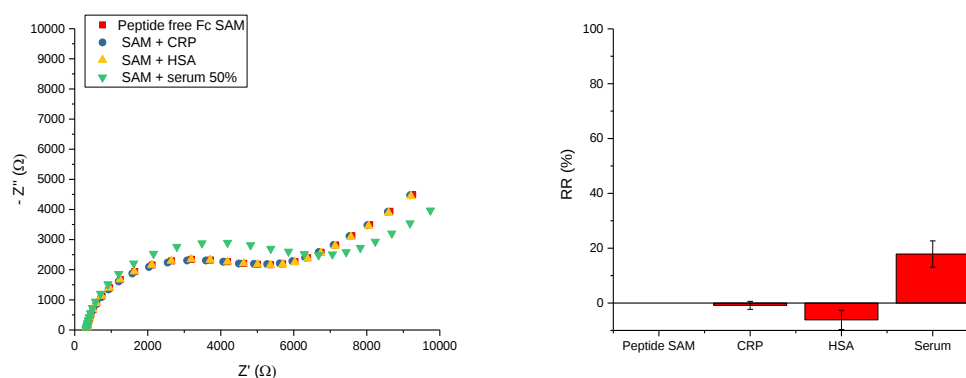
Figura 45. Estabilidade da SAM peptídica Ac-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂. Diagrama de Nyquist após cada incubação em PBS e sua respectiva mudança relativa nos valores de R_{ct} .



Fonte: Própria Autora. Software Origin Pro 8.0.

Após o peptídeo ter sido imobilizado sobre eletrodo de ouro, e sua estabilidade testada, ensaios de seletividade foram realizados incubando-se o eletrodo com CRP, HSA (soro albumina humana) e soro diluído (50%), nesse experimento o eletrodo continha apenas o peptídeo e não o bioreceptor. Os resultados encontram-se na figura 46.

Figura 46. Resposta de impedância da monocamada peptídica Ac-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ após incubação com CRP, HSA e Soro e sua respectiva resposta relativa.

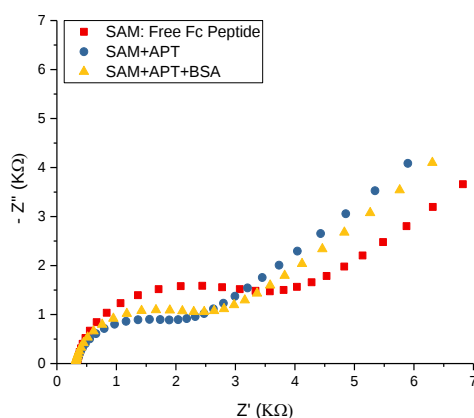


Fonte: Própria Autora. Software Origin Pro 8.0.

A monocamada constituída pelo peptídeo então foi ativada com EDC/NHS e o aptâmero de DNA foi ancorado, mudanças de R_{ct} podem ser vistas na figura 47, demonstrando que o imunossensor poderia ser construído com sucesso a partir de um filme com peptídeo e sonda redox em solução.

A diferença aqui encontrada é que, o valor da transferência de resistência de carga diminui quando o aptâmero está presente, bem como após bloqueio com BSA, em concordância com os resultados dos espectros de PM-IRRAS mostrados na figura 50.

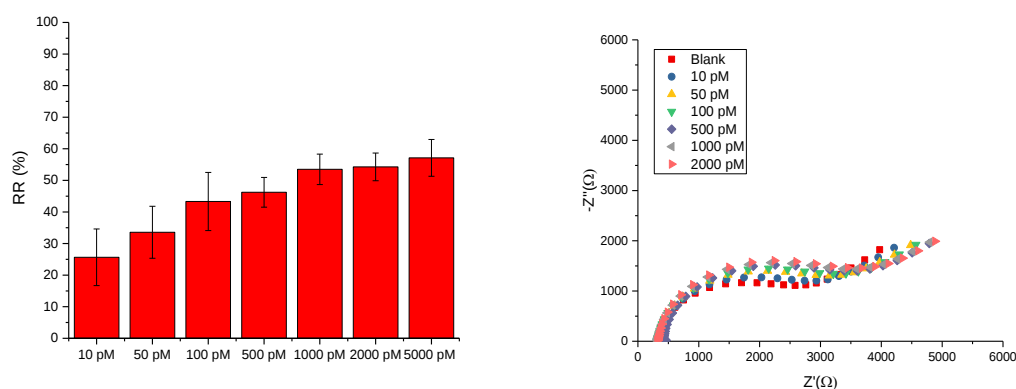
Figura 47. Diagrama de Nyquist impedimétrico para a SAM do peptídeo Ac-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ (vermelho) após o aptâmero ser ancorado (azul) e depois do bloqueio com BSA (amarelo).



Fonte: Própria Autora. Software Origin Pro 8.0.

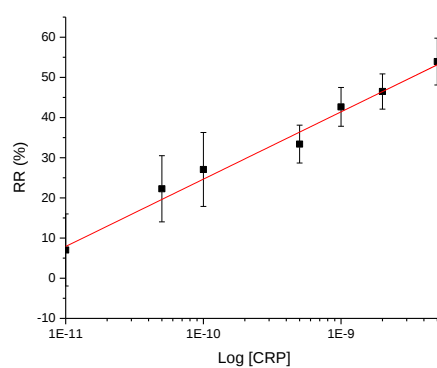
O imunossensor foi então submetido as diferentes concentrações de CRP e uma curva de calibração foi obtida (figuras 48 e 49). Os parâmetros analíticos encontram-se na tabela 14. Os resultados mostraram que o peptídeo sem ferroceno é satisfatório para uso em sensores e ensaios de impedância puderam ser realizados.

Figura 48. Resposta Relativa (RR%) do imunossensor formado pelo peptídeo Ac-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ após cada concentração de CRP e diagrama de Nyquist do mesmo.



Fonte: Própria Autora. Software Origin Pro 8.0.

Figura 49. Resposta relativa (RR (%)) do imunossensor em relação ao log das diferentes concentrações de CRP utilizadas.



Fonte: Própria Autora. Software Origin Pro 8.0.

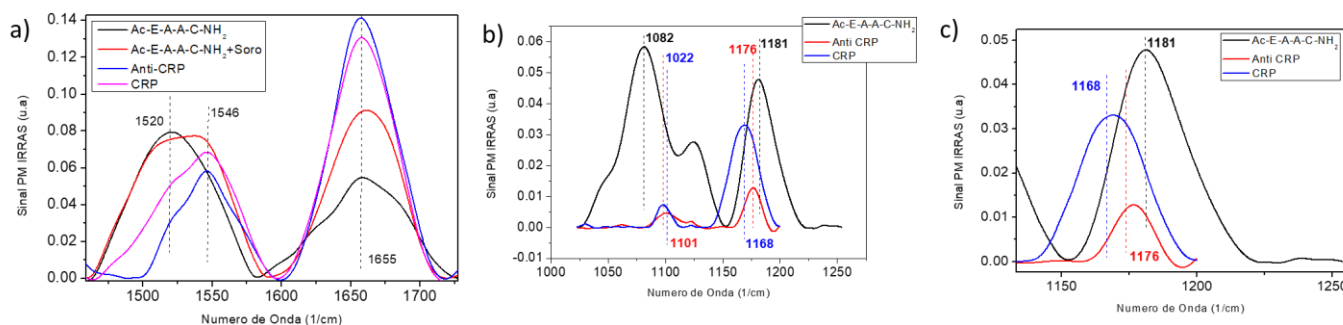
Tabela 14. Parâmetros Analíticos para o imunossensor formado por SAM peptídica Ac-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂.

Intervalo Linear (pM)	10 - 5000
Sensibilidade por década (%)	16,7 ± 1.13
R ²	0,97
LDD (nM)	0,4

Fonte: Própria Autora.

Para o peptídeo que não possui ferroceno em sua extremidade N-terminal as bandas de amida II não aumentam linearmente com a adsorção dos anticorpos e antígenos, elucidando que o mecanismo de detecção está relacionado tanto com a interação específica quanto à orientação molecular dos dipolos, que muda com a adsorção do CRP nos filmes nanoestruturados (figura 50). Este comportamento deve-se, provavelmente, à ausência do grupo ferroceno na molécula do peptídeo, que torna a monocamada peptídica menos organizada. Em concordância as medidas de impedância eletroquímica demonstraram que a formação da monocamada de peptídeos nos eletrodos de Au gera uma resistência de transferência de carga de aproximadamente 7500Ω , que abaixa para 3800Ω após a imobilização do anticorpo anti-CRP, seguido de um novo aumento da resistência para 4400Ω após a interação Ab-Ag, corroborando os resultados de PM-IRRAS.

Figura 50. Espectro de PM-IRRAS para o imunossensor com filme contendo o peptídeo Ac-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂.



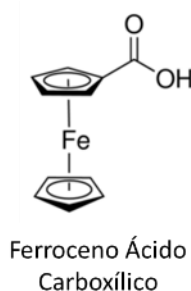
Fonte: Própria Autora. Software Origin Pro 8.0.

APÊNDICE 2: Peptídeo com Ferroceno Ácido Carboxílico

Além dos peptídeos sintetizados durante o doutorado outras moléculas foram testadas. No intuito de diminuir o custo e aumentar o rendimento de síntese foi testado um outro tipo de ferroceno para acoplamento na região N-terminal dos peptídeos, a molécula de ferroceno ácido carboxílico.

A mesma foi acoplada utilizando os ativadores HCTU/DIEA durante 2 h, conforme procedimento para acoplamento de aminoácidos, uma vez que esse ferroceno possui um ácido carboxílico não ativo no anel (figura 51). Esse ferroceno, em comparação com o anidrido de ferroceno utilizado nos peptídeos já explicados, possui dois grupos CH_2 a menos.

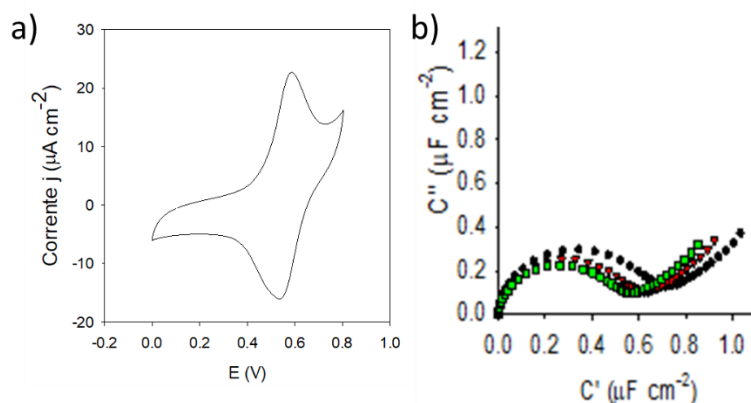
Figura 51. Estrutura química do ferroceno ácido carboxílico.



Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>

Quando o peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ foi sintetizado com essa molécula, o resultado eletroquímico não foi satisfatório, e demonstrou um comportamento diferente do que já havia sido obtido em relação ao outro (com molécula de anidrido de 3-ferrocenopropiônico). Como pode-se ver na figura 52, o voltamograma já não possui picos definidos como esperado, e o potencial formal agora ocorreu em torno de 0,55 V, o que acabou gerando diagramas de Nyquist capacitivos com valores de C_r menores que os anteriores, e além do que, o sistema exibiu completa instabilidade frente aos ensaios. A monocamada variou de sinal em torno de 50% em 24 h, o que inviabiliza a construção do imunossensor. É importante ressaltar que a presença de dois grupos CH_2 podem afetar a capacidade eletrônica da sonda redox e a cristalinidade da SAM, o que poderia estar afetando sua eficácia como componente do biossensor. Este dado mostra a importância da escolha da sonda redox para a formação do biossensor eletroquímico.

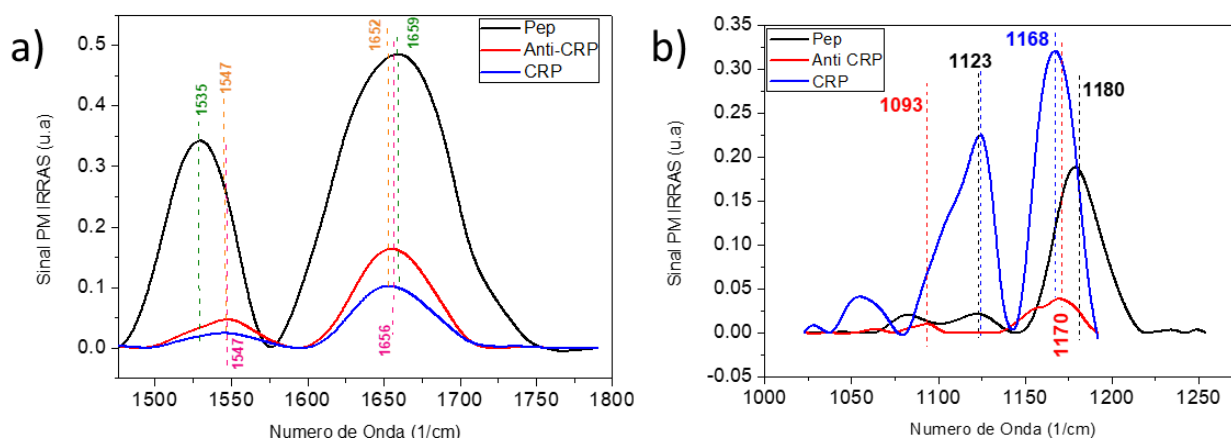
Figura 52. Voltametria cíclica para o peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ com ferroceno ácido carboxílico (a) e diagrama de Nyquist capacitivo (b).



Própria Autora. Software Origin Pro 8.0.

O espectro de PM-IRRAS para esse peptídeo se distingue dos anteriores apenas na diminuição da área/intensidade das bandas quando em contato com Anti-CRP e CRP como pode ser visto na figura 53, e o mesmo deslocamento em 1180 cm⁻¹ ocorre para esse sistema. O que demonstra uma mudança da posição dos grupos amida I e II, deduzindo que não há formação de uma monocamada compacta desejável.

Figura 53. Espectro de PM-IRRAS para o peptídeo com ferroceno ácido carboxílico Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂.



Fonte: Própria Autora. Software Origin Pro 8.0.

REFERÊNCIAS

- AKIBA, U.; ANZAI, J. I. Recent progress in electrochemical biosensors for glycoproteins. **Sensors (Switzerland)**, v. 16, n. 12, p. 1–18, 2016.
- BERECIARTUA, E. Trace Technology for Assays of Novel Biomarkers. **EJIFCC**, v. 21, n. 4, p. 118–121, 3 jan. 2011.
- BERGGREN, C.; JOHANSSON, G. Capacitance measurements of antibody– antigen interactions in a flow system. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 18, p. 3651– 3657 %@ 0003–2700, 1997.
- BOGOMOLOVA, A. et al. Challenges of electrochemical impedance spectroscopy in protein biosensing. **Analytical chemistry**, v. 81, n. 10, p. 3944– 3949 %@ 0003–2700, 2009.
- BOHUNICKY, B.; MOUSA, S. A. Biosensors: the new wave in cancer diagnosis. **Nanotechnol Sci Appl**, v. 4, p. 1–10, 2010.
- BOLDUC, O. R. et al. Peptide self-assembled monolayers for label-free and unamplified surface plasmon resonance biosensing in crude cell lysate. **Anal Chem**, v. 81, n. 16, p. 6779–88, ago. 2009.
- BOLDUC, O. R.; CORREIA-LEDO, D.; MASSON, J. F. Electroformation of peptide self-assembled monolayers on gold. **Langmuir**, v. 28, n. 1, p. 22–6, jan. 2012a.
- BOLDUC, O. R.; CORREIA-LEDO, D.; MASSON, J. F. Electroformation of peptide self-assembled monolayers on gold. **Langmuir**, v. 28, n. 1, p. 22–6, jan. 2012b.
- BRYAN, T. et al. An optimised electrochemical biosensor for the label-free detection of C-reactive protein in blood. **Biosens Bioelectron**, v. 39, n. 1, p. 94–8, jan. 2013.
- BUENO, P. R.; BEDATTY FERNANDES, F. C.; DAVIS, J. J. Quantum capacitance as a reagentless molecular sensing element. **Nanoscale**, v. 9, n. 40, p. 15362–15370, out. 2017.
- BUENO, P. R.; BENITES, T. A.; DAVIS, J. J. The Mesoscopic Electrochemistry of Molecular Junctions. **Sci Rep**, v. 6, p. 18400, jan. 2016.
- BUENO, P. R.; DAVIS, J. J. Elucidating redox level dispersion and local dielectric effects within electroactive molecular films. **Anal. Chem.**, v. 86, n. 4, p. 1977–2004, 2014a.
- BUENO, P. R.; DAVIS, J. J. Measuring quantum capacitance in energetically addressable molecular layers. **Anal Chem**, v. 86, n. 3, p. 1337–41, fev. 2014b.
- BUENO, P. R.; FABREGAT-SANTIAGO, F.; DAVIS, J. J. Elucidating capacitance and resistance terms in confined electroactive molecular layers. **Analytical chemistry**, v. 85, n. 1, p. 411–417, 2012.
- BUENO, P. R.; MIZZON, G.; DAVIS, J. J. Capacitance Spectroscopy : A Versatile Approach To Resolving the Redox Density of States and Kinetics in Redox-Active Self-Assembled Monolayers. 2012.
- CARUSO, M. et al. Are two better than one? A new approach for multidentate grafting of peptides to a gold substrate. **Zeitschrift fur Physikalische Chemie**, v. 230, n. 9, p. 1351–1371, 2016.

- CHANG, A. L. et al. Kinetic and equilibrium binding characterization of aptamers to small molecules using a label-free, sensitive, and scalable platform. **Analytical chemistry**, v. 86, n. 7, p. 3273- 3278 %@ 0003-2700, 2014.
- CHEN, S.; CAO, Z.; JIANG, S. Ultra-low fouling peptide surfaces derived from natural amino acids. **Biomaterials**, v. 30, n. 29, p. 5892-6, out. 2009.
- CHEN, X.; DRESKIN, S. C. Application of phage peptide display technology for the study of food allergen epitopes. **Mol Nutr Food Res**, dez. 2016.
- CHO, Y.; IVANISEVIC, A. TAT peptide immobilization on gold surfaces: A comparison study with a thiolated peptide and alkylthiols using AFM, XPS, and FT-IRRAS. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 13, p. 6225-6232, 2005.
- CHUA, J. H. et al. Label-Free Electrical Detection of Cardiac Biomarker with Complementary Metal-Oxide Semiconductor-Compatible Silicon Nanowire Sensor Arrays. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 15, p. 6266-6271, 1 ago. 2009.
- CITARTAN, M. et al. Assays for aptamer-based platforms. **Biosens Bioelectron**, v. 34, n. 1, p. 1-11, abr. 2012.
- CLARK JR., L. C.; LYONS, C. ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, n. 1, p. 29-45, 1 out. 1962.
- COLTHUP, N. B.; DALY, L. H.; WIBERLEY, S. E. **Introduction to infrared and Raman spectroscopy**. 3rd ed ed. Boston: Academic Press, 1990.
- CUI, L. et al. An ultrasensitive electrochemical biosensor for polynucleotide kinase assay based on gold nanoparticle-mediated lambda exonuclease cleavage-induced signal amplification. **Biosens Bioelectron**, v. 99, p. 1-7, jul. 2017.
- DANIEL, J. et al. Electrochemical Aptamer Scaffold Biosensors for Detection of Botulism and Ricin Proteins. **Methods Mol Biol**, v. 1600, p. 9-23, 2017.
- DANIELS, J. S.; POURMAND, N. Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges. **Electroanalysis**, v. 19, n. 12, p. 1239-1257, maio 2007.
- DAUPHIN-DUCHARME, P.; PLAXCO, K. W. Maximizing the Signal Gain of Electrochemical-DNA Sensors. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 23, p. 11654-11662, 2016.
- DAVIS, K. L. et al. Electron-Transfer Kinetics of Covalently Attached Cytochrome c/SAM/Au Electrode Assemblies. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 16, p. 6571-6576, 1 abr. 2008.
- DENG, D. et al. Label-free electrochemical sensing platform for the detection of protease. **Int. J. Electrochem. Sci**, v. 8, p. 6933-6940, 2013.
- DIJKSMA, M. et al. Development of an Electrochemical Immunosensor for Direct Detection of Interferon- γ at the Attomolar Level. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 5, p. 901-907, 1 mar. 2001.
- DUHAN, J. S. et al. Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. **Biotechnology Reports**, v. 15, n. December 2016, p. 11-23, 2017.

ECKERMANN, A. L. et al. Electrochemistry of redox-active self-assembled monolayers. **Coord Chem Rev**, v. 254, n. 15–16, p. 1769–1802, ago. 2010.

LI. Electrochemical biosensor for epidermal growth factor receptor detection with peptide ligand. **Electrochimica Acta**, v. 109, p. 233–237, 2013.

ELGRISHI, N. et al. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 95, n. 2, p. 197–206, 13 fev. 2018.

ELSHAFEY, R. et al. Electrochemical impedance immunosensor based on gold nanoparticles–protein G for the detection of cancer marker epidermal growth factor receptor in human plasma and brain tissue. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 50, p. 143–149, 2013.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Elisa. **The Journal of Immunology**, v. 109, n. 1, p. 129, 1 jul. 1972.

ENSAFI, A. A. et al. Sensitive DNA impedance biosensor for detection of cancer, chronic lymphocytic leukemia, based on gold nanoparticles/gold modified electrode. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 24, p. 8176–8183, 1 out. 2011.

ETAYASH, H. **Real-time Detection of Breast Cancer Cells Using Peptide functionalized Microcantilever Arrays**. [s.l.] Scientific Reports, 2015.

FERNANDES, F. C. et al. Label free redox capacitive biosensing. **Biosens Bioelectron**, v. 50, p. 437–40, dez. 2013a.

FERNANDES, F. C. et al. Comparing label free electrochemical impedimetric and capacitive biosensing architectures. **Biosens Bioelectron**, v. 57, p. 96–102, jul. 2014.

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

FISCHER, M. J. Amine coupling through EDC/NHS: a practical approach. **Methods Mol Biol**, v. 627, p. 55–73, 2010.

FONTANIVE, G. Libraries of short receptors peptides and antibodies for the recognition of small organic molecules. 2010.

FÖRSTER, C. et al. Properties of an LNA-modified ricin RNA aptamer. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 419, n. 1, p. 60–5, mar. 2012.

FREY, B. L.; CORN, R. M. Covalent Attachment and Derivatization of Poly(L-lysine) Monolayers on Gold Surfaces As Characterized by Polarization–Modulation FT-IR Spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 18, p. 3187–3193, jan. 1996.

FRIESS, H. et al. Enhanced erbB-3 expression in human pancreatic cancer correlates with tumor progression. **Clin Cancer Res**, v. 1, n. 11, p. 1413–20, nov. 1995.

GATTO, E.; VENANZI, M. Self-assembled monolayers formed by helical peptide building blocks: A new tool for bioinspired nanotechnology. **Polymer Journal**, v. 45, n. 5, p. 468–480, 2013a.

GATTO, E.; VENANZI, M. Self-assembled monolayers formed by helical peptide building blocks: a new tool for bioinspired nanotechnology. **Polymer journal**, v. 45, n. 5, p. 468–480, 2013b.

GÓES, M. S. et al. A dielectric model of self-assembled monolayer interfaces by capacitive spectroscopy. **Langmuir**, v. 28, n. 25, p. 9689–99, jun. 2012.

GOES, M. S. et al. A Dielectric Model of Self-Assembled Monolayer Interfaces by Capacitive Spectroscopy. **Langmuir**, v. 28, n. 25, p. 9689–9699, 26 jun. 2012.

GOLDEN, W. G.; DUNN, D. S.; OVEREND, J. A method for measuring infrared reflection—Absorption spectra of molecules adsorbed on low-area surfaces at monolayer and submonolayer concentrations. **Journal of Catalysis**, v. 71, n. 2, p. 395–404, 1 out. 1981.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, E. et al. Methylene blue not ferrocene: Optimal reporters for electrochemical detection of protease activity. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 84, p. 82–88, 2016.

GOODING, J. J. et al. Self-assembled monolayers into the 21st century: recent advances and applications. **Electroanalysis**, v. 15, n. 2, p. 81–96, 2003.

GRAÇA, J. S. et al. On the importance of controlling film architecture in detecting prostate specific antigen. **Applied Surface Science**, v. 434, p. 1175–1182, 2018.

GREENLER, R. G. Infrared Study of Adsorbed Molecules on Metal Surfaces by Reflection Techniques. **The Journal of Chemical Physics**, v. 44, n. 1, p. 310–315, 1 jan. 1966.

GUO, L. et al. C-reactive protein and risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. **Sci Rep**, v. 5, p. 10508, maio 2015.

HE, Y. et al. Electrochemical Peptide Biosensor Based on in Situ Silver Deposition for Detection of Prostate Specific Antigen. **ACS Appl Mater Interfaces**, v. 7, n. 24, p. 13360–6, jun. 2015.

HEINZE, K.; WILD, U.; BECKMANN, M. Solid-Phase Synthesis of Chiral Modular Ferrocene-Based Peptides. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2007, n. 4, p. 617–623, fev. 2007.

HU, J. et al. Paper-based capacitive sensors for identification and quantification of chemicals at the point of care. **Talanta**, v. 165, n. September 2016, p. 419–428, 2017.

HUANG, C. J. et al. Integrated microfluidic system for rapid screening of CRP aptamers utilizing systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). **Biosens Bioelectron**, v. 25, n. 7, p. 1761–6, mar. 2010.

HUNTER, C. A. et al. Medical costs of Alzheimer’s disease misdiagnosis among US Medicare beneficiaries. **Alzheimers Dement**, v. 11, n. 8, p. 887–95, ago. 2015.

JEPPU, G. P.; CLEMENT, T. P. A modified Langmuir-Freundlich isotherm model for simulating pH-dependent adsorption effects. **Sorption and Transport Processes Affecting the Fate of Environmental Pollutants in the Subsurface**, v. 129–130, p. 46–53, 15 mar. 2012.

JING, P. et al. A “signal on-off” electrochemical peptide biosensor for matrix metalloproteinase 2 based on target induced cleavage of a peptide. **RSC Advances**, v. 5, n. 81, p. 65725–65730, 2015.

JOHNSON, A. et al. Sensitive affimer and antibody based impedimetric label-free assays for C-reactive protein. **Analytical chemistry**, v. 84, n. 15, p. 6553–60, 7 ago. 2012.

JUBILUT, G. N. et al. Comparative investigation of the cleavage step in the synthesis of model peptide resins: implications for Nalpha-9-fluorenylmethyloxycarbonyl-solid phase peptide synthesis. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 55, n. 3, p. 468–70, mar. 2007.

- KAISER, E. et al. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Anal Biochem**, v. 34, n. 2, p. 595–8, abr. 1970.
- KAKIUCHI, T. et al. Voltammetric Properties of the Reductive Desorption of Alkanethiol Self-Assembled Monolayers from a Metal Surface. **Langmuir**, v. 18, n. 13, p. 5231–5238, 1 jun. 2002.
- KANG, D. et al. Comparing the properties of electrochemical-based DNA sensors employing different redox tags. **Anal Chem**, v. 81, n. 21, p. 9109–13, nov. 2009.
- KHAN, M. S. et al. Detection of prostate specific antigen (PSA) in human saliva using an ultra-sensitive nanocomposite of graphene nanoplatelets with diblock-co-polymers and Au electrodes. **Analyst**, v. 143, n. 5, p. 1094–1103, 2018.
- KIM, F. et al. Langmuir-Blodgett nanorod assembly [13]. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 18, p. 4360–4361, 2001.
- KNICHEL, M. et al. Utilization of a self-assembled peptide monolayer for an impedimetric immunosensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 28, n. 2, p. 85–94 %@ 0925-4005, 1995.
- LAKSHMANAN, A.; ZHANG, S.; HAUSER, C. A. Short self-assembling peptides as building blocks for modern nanodevices. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 155–165, 2012.
- LAVIRON, E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 101, n. 1, p. 19–28, 1979a.
- LAVIRON, E. A.C. polarography and faradaic impedance of strongly adsorbed electroactive species. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 97, n. 2, p. 135–149, 1979b.
- LEHR, J. et al. Label-free capacitive diagnostics: exploiting local redox probe state occupancy. **Anal Chem**, v. 86, n. 5, p. 2559–64, mar. 2014.
- LEHR, J. et al. Mapping the ionic fingerprints of molecular monolayers. **Phys Chem Chem Phys**, v. 19, n. 23, p. 15098–15109, jun. 2017.
- LEITE, W. F. et al. Correlation between C-Reactive Protein in Peripheral Vein and Coronary Sinus in Stable and Unstable Angina. **Arq Bras Cardiol**, v. 0, p. 0, dez. 2014.
- LEO, N. et al. Characterization of Self-Assembled Monolayers of Peptide Mimotopes of CD20 Antigen and Their Binding with Rituximab. **Langmuir**, v. 31, n. 51, p. 13764–72, dez. 2015.
- LI, H. et al. Peptide-based electrochemical biosensor for amyloid β 1-42 soluble oligomer assay. **Talanta**, v. 93, p. 358–63, maio 2012.
- LI, H. et al. A new method to assay protease based on amyloid misfolding: Application to prostate cancer diagnosis using a panel of proteases biomarkers. **Theranostics**, v. 4, n. 7, p. 701, 2014.
- LISDAT, F.; SCHÄFER, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 391, n. 5, p. 1555–1567, 2008.
- LIU, G.; IYENGAR, S. G.; GOODING, J. J. An Electrochemical Impedance Immunosensor Based on Gold Nanoparticle-Modified Electrodes for the Detection of HbA1c in Human Blood. **Electroanalysis**, v. 24, n. 7, p. 1509–1516, 1 jul. 2012.

LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 712A-724A %@ 0003-2700, 1983.

LONGO, E. et al. Peptide flatlandia: a new-concept peptide for positioning of electroactive probes in proximity to a metal surface. **Nanoscale**, v. 7, n. 37, p. 15495–506, set. 2015.

LÓPEZ-PÉREZ, D. E. et al. Intermolecular interactions in electron transfer through stretched helical peptides. **Phys Chem Chem Phys**, v. 14, n. 29, p. 10332–44, ago. 2012.

MAKARAVICIUTE, A.; RAMANAVICIENE, A. Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors. **Biosens Bioelectron**, v. 50, p. 460–71, dez. 2013.

MANNOOR, M. S. et al. Electrical detection of pathogenic bacteria via immobilized antimicrobial peptides. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 45, p. 19207–12, nov. 2010.

MARRAZZA, G. Aptamer Sensors. **Biosensors**, v. 7, n. 1, p. 5–7, 2017.

MARTIĆ, S. et al. Ferrocene-peptido conjugates: from synthesis to sensory applications. **Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)**, v. 40, n. 28, p. 7264–90, 28 jul. 2011.

MEHROTRA, P. Biosensors and their applications - A review. **Journal of oral biology and craniofacial research**, v. 6, n. 2, p. 153–159, 2016.

MENDELSON, R.; MAO, G.; FLACH, C. R. Infrared reflection–absorption spectroscopy: Principles and applications to lipid–protein interaction in Langmuir films. **A Surface View on Membrane Structure, Dynamics and Applications**, v. 1798, n. 4, p. 788–800, 1 abr. 2010.

MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 85, n. 14, p. 2149–2154, 1963.

MULLER, D. A.; DEPELSENAIRE, A. C.; YOUNG, P. R. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. **J Infect Dis**, v. 215, n. suppl_2, p. S89–S95, mar. 2017.

NEWTON, L. et al. Self assembled monolayers (SAMs) on metallic surfaces (gold and graphene) for electronic applications. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 1, n. 3, p. 376–393, 2013.

NOWINSKI, A. K. et al. Sequence, structure, and function of peptide self-assembled monolayers. **J Am Chem Soc**, v. 134, n. 13, p. 6000–5, abr. 2012.

OESCH, U.; JANATA, J. Electrochemical study of gold electrodes with anodic oxide films—I. Formation and reduction behaviour of anodic oxides on gold. [s.l.] **Electrochimica Acta**, 1983. v. 28

ORLOWSKI, G. A.; CHOWDHURY, S.; KRAATZ, H. B. Reorganization energies of ferrocene-peptide monolayers. **Langmuir**, v. 23, n. 25, p. 12765–70, dez. 2007.

PATIL, A. V. et al. Immittance electroanalysis in diagnostics. **Anal Chem**, v. 87, n. 2, p. 944–50, jan. 2015.

PAWLOWSKI, J. et al. Electron transfer across α -helical peptide monolayers: importance of interchain coupling. **Langmuir**, v. 28, n. 50, p. 17287–94, dez. 2012.

PEPYS, M. B.; HIRSCHFELD, G. M. C-reactive protein: a critical update. **J Clin Invest**, v. 111, n. 12, p. 1805–12, jun. 2003.

PICCOLI, J. et al. Redox Capacitive Assaying of C-Reactive Protein at a Peptide Supported Aptamer Interface. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 5, 2018.

PICCOLI, J. P. et al. The self-assembly of redox active peptides: Synthesis and electrochemical capacitive behavior. **Biopolymers**, 2016.

PICCOLI, J.P. Desenvolvimento de Biossensores Capacitivos Constituídos de Monocamadas Peptídicas Nanometricamente Estruturadas. 2015. 71 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - **Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista**, Araraquara, 2000.

PULTAR, J. et al. Aptamer-antibody on-chip sandwich immunoassay for detection of CRP in spiked serum. **Biosens Bioelectron**, v. 24, n. 5, p. 1456–61, jan. 2009.

QURESHI, A. et al. Label-free capacitive biosensor for sensitive detection of multiple biomarkers using gold interdigitated capacitor arrays. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 10, p. 2318–2323, 2010.

RAJESH et al. Electrochemical impedance immunosensor for the detection of cardiac biomarker Myoglobin (Mb) in aqueous solution. **Biomolecular Electronics and Organic Nanotechnology for Environmental Preservation**, v. 519, n. 3, p. 1167–1170, 30 nov. 2010.

RAMIN, M. A. AND L. B. G. AND D. N. AND B. B. AND V. L. AND B. T. PM-IRRAS Investigation of Self-Assembled Monolayers Grafted onto SiO₂/Au Substrates. **Langmuir**, v. 27, n. 10, p. 6076–6084, 2011.

REZAEI, B. et al. Immobilization of specific monoclonal antibody on Au nanoparticles for hGH detection by electrochemical impedance spectroscopy. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 2, p. 395–399, 15 out. 2009.

RIDKER, P. M. et al. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. **N Engl J Med**, v. 342, n. 12, p. 836–43, mar. 2000.

RODRIGUES, V. C. et al. Immunosensors Made with Layer-by-Layer Films on Chitosan/Gold Nanoparticle Matrices to Detect D-Dimer as Biomarker for Venous Thromboembolism. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 91, n. 6, p. 891–896, 2018.

SÁNCHEZ, J. L. A. AND B. E. AND R. A. E.-G. AND D. S. AND S. P. L. AND K. I. AND O. C. K. Electronic 'Off-On' Molecular Switch for Rapid Detection of Thrombin. **Electroanalysis**, v. 18, n. 19–20, p. 1957–1962, 2006.

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

SANTOS, A. et al. Redox-tagged peptide for capacitive diagnostic assays. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 68, 2015.

SARKAR, P. et al. Amperometric biosensors for detection of the prostate cancer marker (PSA). **Int J Pharm**, v. 238, n. 1–2, p. 1–9, maio 2002.

SEZGINTÜRK, M. K. A new impedimetric biosensor utilizing VEGF receptor-1 (Flt-1): Early diagnosis of vascular endothelial growth factor in breast cancer. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 10, p. 4032–4039, 15 jun. 2011.

SHANG, Y. et al. Immobilization of a human epidermal growth factor receptor 2 mimotope-derived synthetic peptide on Au and its potential application for detection of herceptin in human serum by quartz crystal microbalance. **Anal Chem**, v. 83, n. 23, p. 8928–36, dez. 2011.

- SOARES, A. C. et al. Controlled Film Architectures to Detect a Biomarker for Pancreatic Cancer Using Impedance Spectroscopy. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 46, p. 25930–25937, 25 nov. 2015.
- SOARES, J. C. et al. Adsorption according to the Langmuir–Freundlich model is the detection mechanism of the antigen p53 for early diagnosis of cancer. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 12, p. 8412–8418, 2016.
- SOUADA, M. et al. Label-free electrochemical detection of prostate-specific antigen based on nucleic acid aptamer. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 68, p. 49–54, 15 jun. 2015.
- SPINELLE, L. et al. Evaluation of metal oxides sensors for the monitoring of O_3 in ambient air at Ppb level. **Chemical Engineering Transactions**, v. 54, p. 319–324, 2016.
- TANG, J. et al. Specific immunoreaction-induced controlled release strategy for sensitive impedance immunoassay of a cancer marker. **Analyst**, v. 136, n. 19, p. 3869–3871, 2011.
- TANG, Z. et al. Biomedical applications of layer-by-layer assembly: From biomimetics to tissue engineering. **Advanced Materials**, v. 18, n. 24, p. 3203–3224, 2006.
- TOMIZAKI, K. Y.; USUI, K.; MIHARA, H. Protein-protein interactions and selection: array-based techniques for screening disease-associated biomarkers in predictive/early diagnosis. **FEBS J**, v. 277, n. 9, p. 1996–2005, maio 2010.
- TOTHILL, I. E. Biosensors for cancer markers diagnosis. **Semin Cell Dev Biol**, v. 20, n. 1, p. 55–62, fev. 2009.
- ULUDAG, Y.; TOTHILL, I. E. Cancer biomarker detection in serum samples using surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance sensors with nanoparticle signal amplification. **Anal Chem**, v. 84, n. 14, p. 5898–904, jul. 2012.
- VALENCIA, D. P. et al. Development of a bio-electrochemical immunosensor based on the immobilization of SPINNTKPHEAR peptide derived from HPV-L1 protein on a gold electrode surface. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 770, p. 50–55, 2016.
- VESTERGAARD, M. et al. A rapid label-free electrochemical detection and kinetic study of Alzheimer's amyloid beta aggregation. **J Am Chem Soc**, v. 127, n. 34, p. 11892–3, ago. 2005.
- WANG, J. Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics. **Biosens Bioelectron**, v. 21, n. 10, p. 1887–92, abr. 2006.
- WANG, J. et al. RNA aptamer-based electrochemical aptasensor for C-reactive protein detection using functionalized silica microspheres as immunoprobes. **Biosens Bioelectron**, v. 95, p. 100–105, set. 2017.
- WIĘCKOWSKI, A.; KORZENIEWSKI, C.; BRAUNSCHWEIG, B. (EDS.). **Vibrational spectroscopy at electrified interfaces**. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2013.
- WU, B. et al. Detection of C-reactive protein using nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance using an aptamer-antibody sandwich assay. **Chem Commun**, v. 52, n. 17, p. 3568–71, fev. 2016.
- XU, H. et al. An ultrasensitive electrochemical impedance sensor for a special BRCA1 breast cancer gene sequence based on lambda exonuclease assisted target recycling amplification. **Chem. Commun.**, v. 48, n. 51, p. 6390–6392, 2012.

XU, M.; LUO, X.; DAVIS, J. J. The label free picomolar detection of insulin in blood serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 39, n. 1, p. 21–25, 15 jan. 2013.

XU, Q.; DAVIS, J. J. The Diagnostic Utility of Electrochemical Impedance. **Electroanalysis**, v. 26, n. 6, p. 1249–1258, 2014.

YANG, Y. et al. Label-free electrochemical biosensing of small-molecule inhibition on O-GlcNAc glycosylation. **Biosens Bioelectron**, v. 95, p. 94–99, set. 2017.

YANG, Z. et al. Analytical application of self assembled monolayers on gold electrodes: critical importance of surface pretreatment. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 10, n. 9, p. 789–795, 1995.

YU, H.-Z. et al. Voltammetric Procedure for Examining DNA-Modified Surfaces: Quantitation, Cationic Binding Activity, and Electron-Transfer Kinetics. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 15, p. 3902–3907, 1 ago. 2003.

ZAITOUNA, A. J.; MABEN, A. J.; LAI, R. Y. Incorporation of extra amino acids in peptide recognition probe to improve specificity and selectivity of an electrochemical peptide-based sensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 886, p. 157–164, 2015.

SUPORTE FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.