

UNESP – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”

Instituto de Química de Araraquara

Biossensor capacitivo ultrassensível para diagnóstico de dengue

Verónica Neshmi Salgues Mendoza

**Dissertação de Mestrado
2018**

Verónica Neshmi Salaues Mendoza

Biossensor capacitivo ultrassensível para diagnóstico de dengue

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno
Co-Orientador: Dr. Flavio César Bedatty Fernandes

Araraquara
2018

S161b Salaues Mendoza, Verónica Neshmi
 Biossensor capacitivo ultrasensível para diagnóstico de
 dengue / Verónica Neshmi Salaues Mendoza. –
 Araraquara: [s.n.], 2018
 65 f.: il.

 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
 Instituto de Química
 Orientador: Paulo Roberto Bueno
 Coorientador: Flávio César Bedatty Fernandes

 1. Biossensores. 2. Peptídeos. 3. Ferroceno. 4. Dengue.
 5. Espectroscopia de impedância. I. Título



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Biossensor capacitivo ultrasensível para diagnóstico de dengue"

AUTORA: VERONICA NESHMI SALAUES MENDOZA

ORIENTADOR: PAULO ROBERTO BUENO

COORDENADOR: FLÁVIO CESAR BEDATTY FERNANDES

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

Prof. Dr. PAULO ROBERTO BUENO
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof.ª Dr.ª MARIA DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. PAULO INÁCIO DA COSTA
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 13 de março de 2018

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Verónica Neshmi Salaues Mendoza

Nome em citações bibliográficas: Salaues M., V.N.; Salaues, V.N.

Endereço profissional: Rua Dr. Francisco Degni, 55. Bairro: Jd. Quitandinha, Araraquara-SP.

FORMAÇÃO ACADÊMICA E TITULAÇÃO:

2016-2018 Mestrado em Biotecnologia. Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (IQ-UNESP), Araraquara, São Paulo, Brasil.

2005-2010 Licenciatura em Biologia. Universidad Mayor de San Simón (UMSS), Cochabamba Bolivia.

Idiomas

Espanhol: Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Inglês: Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Português: Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Razoavelmente, Lê Bem

Prêmios

2009 Menção Honrosa por excelência no desempenho acadêmico, outorgada pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidad Mayor de San Simón (FCyT-UMSS)

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

1. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

2016-Atual Vínculo: Bolsista PEC-PG, Enquadramento funcional: Aluna de Pós-graduação, Régime: Dedicção exclusiva.

2. Universidad “Casimiro Huanca” (Unibol), Bolivia

2015 Vínculo: Empregatício, Enquadramento funcional: Professora de Microbiologia de Alimentos

3. Gobierno Autonomo Municipal de Cochabamba, Bolivia

2013-2014 Vínculo: Empregatício, Enquadramento funcional: Consultora para análises físico-químicos.

4. Fundación para la Promoción e Investigación de Productos Andinos (PROINPA), Bolivia

2009-2010 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Estágio no projeto: “Metagenómica de suelos como herramienta para hallar indicadores de fertilidad en suelos degradados y fértiles en la cuenca del Río Jatun Mayu, Tiraque”.

5. Institut de recherche pour le développement (IRD), Bolivia

2011 Vínculo: Empregatício, Enquadramento funcional: Auxiliar de pesquisa.

6. Universidad Mayor de San Simón (UMSS), Bolivia

2007-2010 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Auxiliar de pesquisa em Plancton para a “Unidad de Limnología y Recursos Acuáticos” (ULRA).

2008-2009 Vínculo: Representante Discente, Enquadramento funcional: Conselho da Carreira de Biologia.

2006-2007 Vínculo: Colaboradora, Enquadramento funcional: Auxiliar de pesquisa em Plancton para a “Unidad de Limnología y Recursos Acuáticos” (ULRA).

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalhos publicados em anais de eventos

1. ACOSTA C., F.; CORONEL, J; SALAUES, V.N.; AGUILERA, X. Diversidad de Microcrustáceos (Cladóceros y Copépodos) en Lagunas de la Cordillera Oriental Altoandina (Bolivia) In: III Congreso Boliviano de Ecología, 2011, Sucre, Bolivia.
2. SALAUES M., V.N.; ACOSTA C., F.; LAZZARO, X. Dinámica Temporal del Zooplancton en 4 Lagunas Altoandinas de la Cordillera del Tunari (Cochabamba, Bolivia) In: III Congreso Boliviano de Ecología, 2011, Sucre, Bolivia.

Apresentação de trabalho

1. ACOSTA C., F.; CORONEL, J; SALAUES, V.N.; AGUILERA, X. Diversidad de Microcrustáceos (Cladóceros y Copépodos) en Lagunas de la Cordillera Oriental Altoandina (Bolivia) In: III Congreso Boliviano de Ecología, 2011, Sucre, Bolivia.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

1. III Congreso Boliviano de Ecología, Sucre, Bolivia, 2011.
2. VI Reunión Nacional de Biotecnología, Cochabamba, Bolivia. 2009.

OUTRAS INFORMAÇÕES

Estágio no exterior

Kansas State University
Department of Plant Pathology
4024 Throckmorton Plant
Sciences Center
Manhattan, KS 66506-5502, USA
Supervisores: Profs. Drs. Karen A. Garrett e Ari Jumponen
Período: 27/06/2010-27/07/2010

Dedicatória

Aos meus pais...Emilio, você me levou da mão pelo caminho da vida, acreditou em mim e me deu amor incondicional. Incentivou a minha curiosidade pela natureza e o desejo de entendimento das coisas além da minha compreensão.

Victoria, você sempre foi um exemplo de fortaleza e coragem. Me ensinou que para vencer e aprender não importam nem a idade, nem as limitações, mas a decisão de superar os obstáculos e também me ensinou a importância de agir em lugar de ficar imóvel diante a dúvida, pois se errar é possível endireitar os erros, mas se ficar quieto a vida passa frente aos nossos olhos.

Os dois foram sempre os pilares da minha vida...

Agradecimentos

Agradeço à minha família por todo o amor incondicional e o imenso apoio demonstrado durante a minha vida inteira. Emilio, Vicky, Pancho, Sandra, Betza, Claudia, Sussy, Marcia, Amilcar, Cesar, Fabi, Sergio, Ramiro, Brian, Cindy, David, Salim, Ale, Nico, Ber, Nicolette, Isa, Carlos, Mabel, Taddy, Alberto, Don Huguito. Agradeço e me sinto honrada por fazer parte das suas vidas e por fazerem parte da minha.

Aos meus queridos, Care (você parece meu anjo guardião), Andrea, Bernard, Betus, Charito S., Charito M., Ceci, Daniel, Damian, Dino, Darlen, Ev, Jhoana, Lourdes, Luchita, Margot, Mirtha, Olguita, Paul, Peter e Vane cujo carinho, apoio e exemplo me ajudaram a ficar em pé tantas vezes.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno pela oportunidade de me permitir realizar este trabalho, abrindo as portas do seu grupo de pesquisa, e por tudo o aprendizado adquirido durante a realização do mesmo.

Aos Drs. Flávio César Bedatty e Adriano Dos Santos, cujas sugestões e colaboração com o planejamento do projeto, desenvolvimento do projeto, assim como o tratamento de dados foram essenciais para a realização do trabalho.

A Júlia por toda a ajuda, apoio e paciência com a síntese do peptídeo e interpretação dos dados relacionados, que foram parte essencial do trabalho.

A Bea, Elielma, Ju Andrade, Ju Cecchetto, Melany, Raphael, Rute, Sandra, Tiago e Welder por todos os conhecimentos que generosamente compartilharam comigo, pelo companheirismo demonstrado e por todos os bons momentos dentro e fora do lab.

Aos Professores Drs. Eduardo Maffud e Paulo Inácio Costa por permitir a realização de parte do trabalho e análises prévios nos seus laboratórios e pelo espírito de cooperação. Também aos seus alunos e os pesquisadores que se amostraram sempre colaborativos.

Ao Prof. Dr. Gustavo Troiano por se brindar a melhorar a nossa compreensão e os nossos conhecimentos da física e do cálculo.

A Ana Paula (Aninha), Alexandra, Camila, Carla, Gregorio, Iatã, João, Longinus, Rajabo, Tháila, Thayná, Vinícius e York pelos momentos compartilhados.

A Rose Portásio, Wennia, Cintia, Robson, Ana Paula, Vinicius L., Neyde, assim como os funcionários da Biblioteca, da Portaria, da STAEPE e os outros funcionários que trabalham no Instituto de Química por serem sempre solícitos e compreensivos no atendimento dos requerimentos cotidianos, facilitando o trabalho do dia a dia.

Ao pessoal do LIEC pela simpatia e cooperação.

Ao CNPq e o programa PEC-PG pela concessão da bolsa durante o período de realização deste mestrado.

A todos os nomeados e os não nomeados que foram e/ou são parte da minha vida, pelas lições de vida.

“Remembering that I'll be dead soon is the most important tool I've ever encountered to help me make the big choices in life. Because almost everything - all external expectations, all pride, all fear of embarrassment or failure - these things just fall away in the face of death, leaving only what is truly important” (Steve Jobs).

“Ever tried. Ever failed. No matter. Try again. Fail again. Fail better” (Samuel Beckett).

RESUMO

O sucesso no tratamento de muitos tipos de doenças passa pela detecção seletiva e sensível de biomarcadores proteicos que permitam um diagnóstico precoce. A dengue é uma doença infecciosa de diagnóstico clínico impreciso e diagnóstico laboratorial demorado e custoso, a qual não possui tratamento ou vacina efetivos. Portanto se requer de ferramentas diagnósticas precisas, baratas e portáteis que permitam o diagnóstico rápido para realizar um tratamento adequado de sintomas e identificar os focos infecciosos para prevenir o espalhamento da doença. Um biomarcador útil na detecção da dengue, é a proteína NS1 que vem sendo utilizada com sucesso em diferentes plataformas de diagnóstico. Porém, nenhuma das plataformas oferecidas a nível comercial, consegue combinar a precisão, portabilidade, baixo custo e facilidade de manuseio. Portanto, o melhoramento de ditas ferramentas é o foco de bastantes pesquisas. Neste trabalho se apresenta uma plataforma que se amostra útil para a detecção de diferentes biomarcadores, incluindo a proteína NS1. Esta plataforma combina o uso de uma técnica eletroquímica como é a Espectroscopia de Capacitância Eletroquímica (ECE), com o uso de peptídeos redox e está baseada na funcionalização de eletrodos de ouro mediante formação de monocamadas auto-organizadas (SAM) confeccionadas com um peptídeo redox (Fc-Glu-Gli-Ser-Gli-Ser-Cys) desenhado para ser ancorado em superfícies metálicas, ao mesmo tempo que tem capacidade de ancorar uma sonda redox e um bioreceptor na mesma estrutura/molécula, com a vantagem adicional que a SAM obtida tem propriedades anti-incrustantes desejáveis em biossensoriamento. Ensaios realizados com a proteína NS1 permitiram a detecção de esta proteína em concentrações de 2 µg/ml.

Palavras-chave: Peptídeo redox; Monocamadas auto-organizadas; Anti-incrustante; Espectroscopia de Capacitância Eletroquímica; NS1.

ABSTRACT

Success in the treatment of many kinds of illnesses depends on the selective and sensitive detection of protein biomarkers that allow an early diagnosis. Dengue is an infectious disease of imprecise clinical diagnostic and delayed and expensive laboratorial diagnostic. This disease does not have an effective vaccine or treatment. Therefore, precise, cheap and portable diagnostic tools are necessary to allow a fast diagnostic in order to treat the symptoms, identify focuses of infection, and thus prevent the spreading of the disease. A useful biomarker in the detection of dengue is the protein NS1, which has been successfully used in different diagnostic platforms. However, none of the commercially available platforms combines precision, portability, low cost and user friendliness. Consequently, the improvement of such tools is object of ample research. This work, introduces a platform, which is useful for the detection of various biomarkers, including the protein NS1. This platform combines the usage of an electrochemical technique such as Electrochemical Capacitance Spectroscopy (ECS) and the use of redox peptides. It is based in the functionalization of gold electrodes through formation of Self Assembled Monolayers (SAM) formed by a redox peptide (Fc-Glu-Gli-Ser-Gli-Ser-Cys) designed to bind to metallic surfaces as well as to anchor a redox probe and a bioreceptor in the same structure/molecule. It presents the additional advantage of forming anti-fouling SAMs, which is a highly desirable property for biosensing. Tests made with NS1 protein allowed the detection of this protein in concentrations as low as 2 µg/ml.

Key words: Redox peptide; Self Assembled Monolayers; Anti-fouling; Electrochemical Capacitance Spectroscopy; NS1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do vírus da dengue e representação do genoma viral	17
Figura 2: Variação na distribuição dos sorotipos da dengue nas Américas entre os anos 1990 a 2014.....	18
Figura 3: Media de casos de dengue reportados anualmente à Organização Mundial da Saúde entre 1955-2007, e o número de casos reportados em anos recentes, 2008-2010	19
Figura 4: A estrutura da NS1.....	22
Figura 5: Biomarcadores e métodos de diagnóstico da dengue apropriados de acordo ao tempo de progressão da doença	23
Figura 6: Representação elétrica de uma monocamada auto-organizada (SAM), com um anticorpo imobilizado para detecção.....	26
Figura 7: a) Espectro típico de Nyquist de impedância faradaica b) Representação da variação da capacitância redox (Cr) quando ocorre ligação de um alvo.....	27
Figura 8: Estrutura do peptídeo..	30
Figura 9: Esquema de síntese do peptídeo.....	32
Figura 10: Reação que ocorre durante o teste de ninidrina..	32
Figura 11: Esquema do sistema electroquímico	35
Figura 12: Perfil de limpeza eletroquímica do ouro polido realizada em solução de H ₂ SO ₄ 0.5 mol L ⁻¹ esquentado a 80°C.	36
Figura 13: Esquema do desenvolvimento do biossensor.....	37
Figura 14: Voltamogramas de SAM em diferentes ensaios	37
Figura 15: a) e c) Curvas de Nyquist: Capacitância e Impedância (acima), para o anticorpo CRP (Ab-CRP) em "a" e para o anticorpo NS1 (Ab-NS1) em "c"; b) e d) Gráficos de Bode. Monocamada Automontada (SAM) no potencial redox (in) (círculos verdes); SAM com anticorpo imobilizado no potencial redox (triângulos vermelhos); e SAM, com anticorpo imobilizado, depois de bloquear com Etanolamina 1M, também no potencial redox (quadrados prettos)	39
Figura 16: Peptídeo com terminação α-carboxamida, como consequência da SPFS utilizando a resina Rink-amida	42
Figura 17: Perfil cromatográfico do peptídeo redox Fc-Glu-Gly-Ser-Gly-Ser-Cys: (a) bruto (b) puro, com grau de pureza >98%.	43

Figura 18: Espectro de massas referente ao peptídeo de massa molar de 777.0 g mol ⁻¹	43
Figura 19: a) Voltamogramas da monocamada do peptídeo redox a diferentes velocidades de varredura. b) Distribuição das alturas dos picos de corrente anódicos (pontos pretos), respeito às velocidades de varredura, comparados com uma curva de ajustamento linear ($R^2=0.996$) dos dados (reta vermelha).	45
Figura 20: Voltametria Cíclica para SAM do peptídeo redox.....	45
Figura 21: Diagramas de Nyquist: a) Impedância e b) dados de capacitância derivados das medidas em a) para a monocamada no potencial redox (círculos pretos), da monocamada fora do potencial redox (triângulos verde) e do ouro puro (triângulo vermelho).	46
Figura 22: Variação da capacitância em função da frequência. a) Variação da capacitância real e b) Variação da capacitância imaginaria. SAM no potencial redox (Pontos pretos. $\tau_r = \sim 6$ Hz). SAM potencial redox out (Triângulos verdes. Frequência: ~ 35 Hz). Ouro puro (Triângulos vermelhos. Frequência: ~ 300 Hz).	47
Figura 23: Curva Gaussiana representando a dispersão da Densidade de Estados Redox (RDOS) para SAM de peptídeo ancorado com ferroceno.....	48
Figura 24: Ensaio de ELISA dos pares antígeno-anticorpo para NS1 e CRP: a) Dados de absorbância e fotografia amostrando a reação colorimétrica de diferentes concentrações de antígeno-NS1 vs. o anticorpo-NS1, b) Curva analítica das 5 menores concentrações de antígeno (NS1) testadas no ensaio, demonstrando uma boa interação do par ($R^2 = 0.99$), c) Dados de absorbância e fotografia amostrando a reação colorimétrica de diferentes concentrações de antígeno-CRP vs. o anticorpo-CRP, d) Curva analítica das 4 menores concentrações de antígeno (CRP) testadas no ensaio, demonstrando uma boa interação do par ($R^2 = 0.99$).....	50
Figura 25: a) Curvas de Nyquist: Capacitância e Impedância (acima), e b) Gráficos de Bode. Incubação em PBS pH 7.4 por 11 vezes, simulando a incubação com target.	51
Figura 26: Gráfico de barras, representando a variação de sinal relativo entre as medidas realizadas com PBS.....	52
Figura 27: Gráfico de barras, estabelecendo a diferença de $\Delta RR_{(\%)}$ do sensor para a interação específica do par antígeno/anticorpo CRP, a uma concentração 0.5nM de alvo (antígeno CRP) comparada com $\Delta RR_{(\%)}$ do sensor para a interação antígeno CRP-controle negativo, a uma concentração 1.5 nM do controle negativo (triplo da concentração de alvo). O controle negativo foi realizado com a proteína HSA.....	53

Figura 28: Gráfico de barras, estabelecendo a diferença de $\Delta RR_{(\%)}$ do sensor para a interação específica do par antígeno-anticorpo NS1, a uma concentração $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ de alvo (antígeno NS1) comparada com $\Delta RR_{(\%)}$ do sensor para a interação antígeno NS1-controle negativo na mesma concentração $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ do alvo. O controle negativo foi realizado com a proteína HSA	54
Figura 29: Curvas de Nyquist: Capacitância e Impedância (acima). Incubação em 5 diluições de proteína C-reativa, diluída em PBS pH 7.4.....	55
Figura 30: Curva de regressão linear simples, amostrando a relação entre o logaritmo da concentração de analito (antígeno CRP), e a $\Delta RR_{(\%)}$ do sensor.	56
Figura 31: Curva analítica obtida a partir da curva de Nyquist para dados de capacitância para a proteína C-reativa.....	57
Figura 32: Curvas de Nyquist: Capacitância e Impedância (acima). Incubação em 7 diluições de proteína NS1, diluída em PBS pH 7.4..	58
Figura 33: Curva analítica obtida a partir da curva de Nyquist para dados de capacitância da proteína NS1..	59
Figura 34: Curva de regressão linear simples, amostrando a relação entre o logaritmo da concentração de analito (antígeno NS1), e a $\Delta RR_{(\%)}$ do sensor.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos Biossensores para detecção de dengue. Fonte: Adaptado de Darwish et al, 2015.....	24
Tabela 2: Reagentes utilizados.	29
Tabela 3: Características da síntese do peptídeo.	33
Tabela 4: Condições cromatográficas empregadas na análise e purificação do peptídeo redox. .	34
Tabela 5: Rendimentos: Da peptidil-resina e do peptídeo bruto.	42
Tabela 6: Comparação Superfície de recobrimento molecular em diferentes tipos de SAM.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aminoácidos

Cys	Cisteína
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glicina
Ser	Serina

Outras

ACN	Acetonitrila
CRP	C Reactive Protein (proteína C reativa)
VC	Voltametria Cíclica
DCM	Diclorometano
DIC	N,N'-diisopropilcarbodiimida
DMF	N,N-dimetilformamida
ECE	Espectroscopia de Capacitancia Eletroquímica
EDT	1,2-Etanoditiol
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ensaio de imunoabsorção enzimática)
Fmoc	9-Fluorenilmetiloxycarbonila
HOBt	N-Hidroxibenzotriazol
Mtt	Metiltritila
PBS	Phosphate Buffered Saline (tampão fosfato salino)
RT-PCR	Real Time- Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase em tempo real)
SAM	Self Assembled Monolayer (monocamada auto-organizada)
SPFS	Síntese de Peptídeos em Fase Sólida
TFA	Ácido trifluoracético
TIS	Triisopropilsilano

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. O QUÉ É A DENGUE?	17
1.2. INCIDENCIA E CONTROLE DA DENGUE	18
1.3. CARACTERIZAÇÃO E METODOS DE DIAGNOSTICO.....	20
1.2.1. DIFICULDADE NO DIAGNOSTICO CLINICO	20
1.3.2. BIOMARCADORES PARA DENGUE.....	21
1.3.3. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	22
1.3.4. BIOSSENSORES	24
1.3.4.1. BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS	25
1.3.4.2. BIOSSENSORES IMPEDIMÉTRICOS VS CAPACITIVOS	25
1.3.5. SAM TIOLADAS VS SAM PEPTIDICAS	27
2. OBJETIVOS.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1. OBTENÇÃO DO PEPTÍDEO REDOX COM CARACTERÍSTICAS ANTI- INCRUSTANTES.....	30
3.1.1. SÍNTESE DO PEPTÍDEO REDOX.....	30
3.1.2. REAÇÃO DE CLIVAGEM.....	33
3.1.3. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS.....	33
3.2. AVALIAÇÃO DAS MONOCAMADAS AUTOMONTADAS (SAM) PEPTÍDICAS E DO BIOSSENSOR RESULTANTE POR TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS	34
3.2.1. MEDIDAS ELETROQUÍMICAS PARA CARACTERIZACAO DA SAM E DO BIOSSENSOR.....	35
3.2.2. PREPARAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO ELETRODO	35
3.2.3. FUNCIONALIZAÇÃO DO ELETRODO	36
3.2.2.1. FORMAÇÃO DA SAM	36
3.2.2.2. ENSAIO DE ESTABILIDADE DA SAM.....	40
3.2.2.3. CONTROLE NEGATIVO	40
3.2.2.4. ENSAIOS DE RESPOSTA DA SAM DIANTE INTERAÇÕES ANTÍGENO- ANTICORPO.....	40
3.2.2.4.1. PAR CRP	40
3.2.2.4.2. PAR NS1.....	41
3.3. ENSAIO DE ELISA.....	41

4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1.	SÍNTESE DO PEPTÍDEO.....	42
4.2.	CARACTERIZAÇÃO DA SAM POR TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS	44
4.3.	ENSAIO DE ELISA	50
4.4.	ENSAIOS DE RESPOSTA DA SAM COMO SUPERFÍCIE DE BIOSENSORIAMENTO	51
4.4.1.	ENSAIO DE ESTABILIDADE DA SAM	51
4.4.2.	CONTROLE NEGATIVO.....	53
4.4.3.	ENSAIOS DE RESPOSTA DA SAM DIANTE INTERAÇÕES ANTÍGENO- ANTICORPO	54
4.4.3.1.	PAR CRP.....	54
4.4.3.2.	PAR NS1	57
5.	CONCLUSÃO.....	60
6.	REFERÊNCIAS	61

1. INTRODUÇÃO

1.1. O QUÊ É A DENGUE?

A dengue é uma doença viral sistêmica, não contagiosa, causada pelos flavivirus dos sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 e DENV-5 (o último, reportado em 2013, ainda não foi caracterizado), e transmitida a humanos pelos mosquitos *Aedes aegypti* (vector primário) e *Aedes albopictus* (vector secundário) (Bhatt, et al., 2013; Mustafa et al., 2015).

O vírus da dengue é um vírus envelopado e esférico, com um diâmetro aproximado de 50 nm (**Figura 1 A**), consistindo de um genoma de RNA de fita simples e sentido positivo de aproximadamente 11000 nucleotídeos (Darwish et al., 2015), codificando uma poli-proteína com o seguinte arranjo de genes: NH₂-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-COOH (**Figura 1 B**) (Shu e Huang, 2004). Onde: C, prM e E são proteínas estruturais e NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 são proteínas não estruturais (Lindenbach e Rice, 2003 apud Muller e Young, 2013), expressas em células infectadas, responsáveis pela replicação do vírus, montagem do vírion (partícula viral morfológicamente completa e infecciosa) e por evitar a resposta imune do hospedeiro (Darwish et al., 2015).

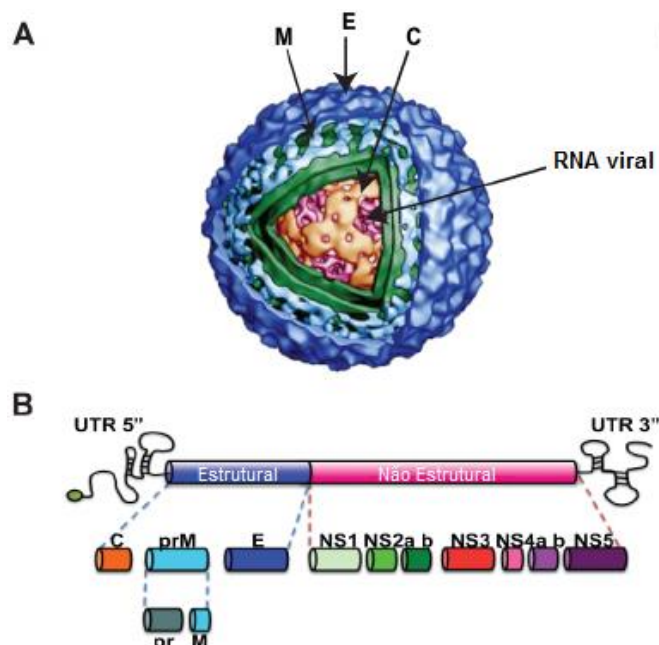


Figura 1: Estrutura do vírus da dengue e representação do genoma. A) Vírion em corte: RNA (rosa escuro), proteínas do capsídeo (C) (laranja). Membrana (verde) e proteínas: M (azul claro) e E, (azul escuro). B) Genoma. Região estrutural: Proteínas: (C) Capsídeo, (prM) membrana, (E) envelope. Não estrutural: proteínas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. Modificado de: Angel e Valle, 2013.

1.2. INCIDENCIA E CONTROLE DA DENGUE

Um mapeamento dos focos de Dengue evidencia que a doença é ubíqua nos trópicos e também de grande incidência nas regiões subtropicais, com as zonas de maior risco no continente americano e Ásia (Bhatt et al., 2013). Porém, as mudanças climáticas, sociais e demográficas, assim como o deslocamento aéreo de pessoas, entre outros, devem aumentar as regiões do planeta sujeitas à transmissão do vírus (Peeling et al., 2010; Bhatt et al., 2013), como é o caso das Américas (**Figura 2**) devido a que tais mudanças possuem efeitos sobre diferentes variáveis, entre elas as populações dos vetores. Por exemplo, o vetor primário, a espécie *A. aegypti*, está muito domesticado e a sua população cresce à medida que a urbanização se expande. Por outro lado, o vetor secundário, *A. albopictus*, pode sobreviver em regiões temperadas, sendo capaz de introduzir a doença em regiões não endêmicas (Gubler, 1998 apud Deimantavičiūtė, 2017).

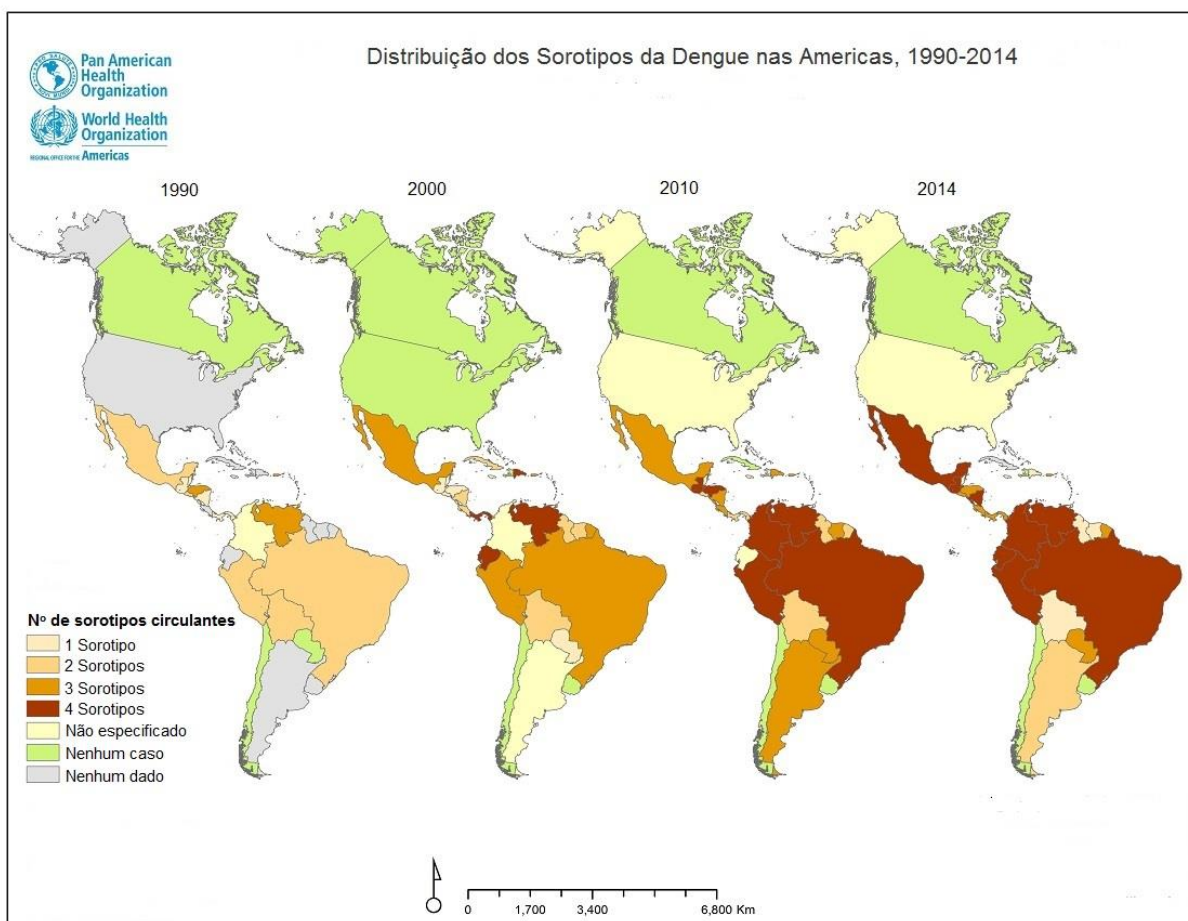


Figura 2: Variação na distribuição dos sorotipos da dengue nas Américas entre os anos 1990 a 2014.
Fonte: PAHO-WHO, 2015

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2012) (WHO, das suas siglas em *inglês para World Health Organization*), nas últimas 5 décadas, a expansão da doença e das populações dos mosquitos vetores aumentaram 30 vezes a nível global (**Figura 3**). Porém, de acordo a Bhatt et al. (2013), estes números representam só uma estimativa que subestima a quantidade real de casos existentes no mundo. Assim as estimativas da incidência da dengue são discrepantes, em que o número estimado de casos vão de 100 até 390 milhões de pessoas infetadas a cada ano no mundo (Bhatt et al., 2013; WHO, 2012 B).

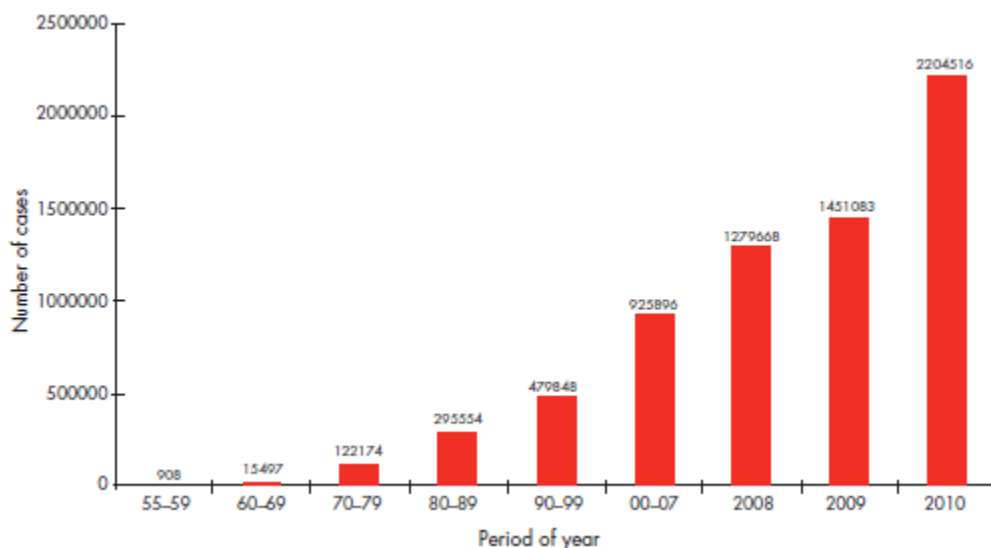


Figura 3: Media de casos de dengue reportados anualmente à Organização Mundial da Saúde entre 1955-2007, e o número de casos reportados em anos recentes, 2008-2010. Porém o número de casos reportados é menor que o número de casos estimados. Fonte: WHO, 2012 B.

No entanto, a importância da doença ao nível individual nos países não deve ser menosprezada, tais são os casos do Brasil e do Paquistão, os quais sofreram surtos de dengue, com custos que chegaram a mais de 1 bilhão de dólares americanos para o Brasil nas tentativas de prevenção e controle. Em 2008, só no estado de Rio de Janeiro, o surto provocou mais de 158000 casos reportados, mais de 9000 internações hospitalares e 230 mortes, entre os meses de janeiro e abril. Apesar dos esforços no controle, em 2010, foram reportados mais de 1,2 milhões de casos de dengue no Brasil, que é só um exemplo de uma situação global que vai se agravando (WHO, 2012 A).

Atualmente não existe cura para a dengue, só tratamento dos sintomas. Portanto, os métodos de prevenção e controle da dengue estão principalmente relacionados ao controle das

populações dos vetores e à prevenção de picadas, através da redução de ambientes aquáticos disponíveis e uso de inseticidas (WHO, 2012 B); Como também pela introdução de mosquitos machos geneticamente modificados, em populações naturais para se reproduzir com fêmeas selvagens e introduzir genes letais na progênie, causando a sua mortalidade e reduzindo desta forma a população de vetores (Harris et al., 2012). No entanto, os esforços no controle populacional só apresentam um sucesso parcial, devido a fatores como produção insuficiente de organismos geneticamente modificados (Harris et al., 2012) e dificuldade no controle de ambientes de reprodução em superfícies extensas.

Por outro lado, recentemente foi desenvolvida uma vacina proveniente de flavivírus quiméricos, contendo os genes estruturais do DENV e os genes não estruturais de uma variedade do vírus da febre amarela. No entanto, esta vacina só pode ser utilizada em crianças maiores de 9 anos de idade, deixando um grande segmento da população sob risco (Halstead e Russell, 2016). Portanto, é importante a continuidade da pesquisa para os ensaios clínicos de outras vacinas em desenvolvimento (Deimantavičiūtė, 2017).

Assim, tanto o efetivo controle das populações de vetores, através da modificação genética, quanto a obtenção de vacinas efetivas para a prevenção da doença, só tem sucesso parcial na atualidade, se precisando do desenvolvimento de mais pesquisas, o que as tornam medidas a longo prazo. Desta forma, a redução da morbidade por dengue, a curto e médio prazo, passa pelo melhoramento na predição e detecção de surtos através de vigilâncias epidemiológica e entomológica (WHO, 2012). Assim, o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas para a pesquisa, vigilância e controle da dengue é importante, já que um diagnóstico rápido e confiável pode melhorar o manejo clínico e as medidas de controle dos vectores, bem como prover dados a respeito da epidemiologia da doença (Deimantavičiūtė, 2017).

1.3. CARACTERIZAÇÃO E METODOS DE DIAGNOSTICO

1.2.1. DIFICULDADE NO DIAGNOSTICO CLINICO

Um agravante relacionado à dengue é a dificuldade do diagnóstico, através dos sintomas clínicos, já que esta infecção produz uma grande variedade de sintomas, podendo ser assintomática até produzir sintomas inespecíficos como febre, dor abdominal, dor muscular, dor de cabeça e fadiga ou sintomas graves (Muller e Young, 2013; Darwish et al., 2015), observados nas formas mais severas como a Febre Hemorrágica (FHD) e a Síndrome de Choque por Dengue (SCD)

(Gubler, 1998). A FHD, geralmente segue a uma infecção secundária e geralmente afeta as crianças. O índice de mortalidade da SCD chega a 5% (Ashley, 2011 apud Darwish et al., 2015), no entanto, com um diagnóstico precoce, terapia de substituição de fluidos e bom manejo clínico, o índice pode diminuir até 1% (Deimantavičiūtė, 2017). O período de incubação da doença desde a picada do mosquito, usualmente demora entre 4 a 7 dias, podendo variar de 3 a 14 dias; iniciando usualmente com febre alta que pode alcançar os 39 °C ou mais (Darwish et al., 2015).

1.3.2. BIOMARCADORES PARA DENGUE

Os biomarcadores são moléculas biológicas, encontradas no sangue, em outros fluidos biológicos ou em alguns tipos específicos de células, que podem indicar um processo normal ou anormal e quando quantificadas podem ser utilizadas para diagnosticar patologias ou outros tipos de doenças em um organismo (Wulfkühle, Liotta e Petricoin, 2003 apud Piccoli, 2015). As classes de biomarcadores podem variar desde DNA, RNA, expressão de marcadores de genes, mutações genéticas e proteínas (Wulfkühle, Liotta e Petricoin, 2003 apud Piccoli, 2015).

Estas moléculas são importantes no diagnóstico de doenças. No caso da dengue, diferentes moléculas são utilizadas como biomarcadores para a sua detecção. Estas moléculas incluem:

Imunoglobulina M (IgM): Um anticorpo que começa a ser produzido entre 3 a 5 dias após a infecção, durante uma infecção primária, mas que só tem um nível quantificável após os 7 dias (Darwish et al, 2015).

Imunoglobulina G (IgG): Um anticorpo que começa a ser detectado entre 5 a 7 dias após a infecção, durante uma infecção primária, podendo ser detectado antes de 7 dias durante uma infecção secundária, mas os seus níveis elevados podem permanecer por anos e ainda mostrar reatividade cruzada com outros flavivírus (Darwish et al, 2015).

Proteína NS1: Alvo deste trabalho, é uma das proteínas não estruturais do vírus da dengue, de 352 aminoácidos, a qual normalmente forma dímeros e cujos monômeros tem uma massa molecular de 46 a 55 kDa (**Figura 4**). Na sua forma extracelular esta proteína se encontra formando hexâmeros em forma de barril (Muller e Young, 2013). A sua presença pode ser detectada em níveis elevados na fase aguda da doença, entre 1 a 9 dias da infecção, tanto durante infecções primárias quanto em infecções secundárias.

Assim, a proteína NS1 é útil no diagnóstico precoce da dengue, tanto em infecções primárias quanto em infecções secundárias, pois dos três biomarcadores citados é o único que pode

ser detectado sempre na fase aguda e sem risco de reatividade cruzada diante de infecções por outros flavivírus.

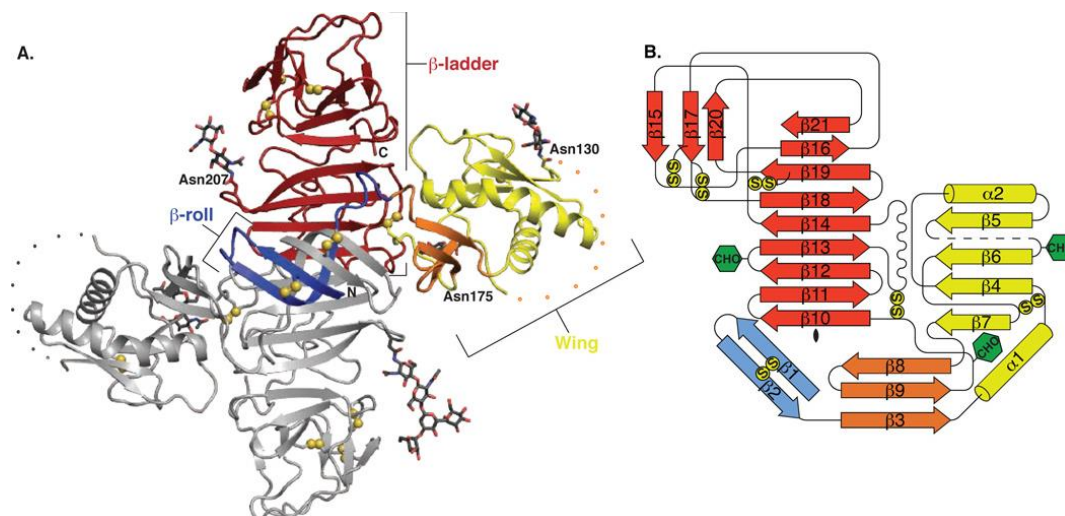


Figura 4: A estrutura da NS1. A - Dímero NS1 com um monômero em cinza e um outro colorido por domínio: Azul para barril β ; amarelo para aba; laranja para subdomínio conector; vermelho para alça β . Uma região desorganizada é indicada com linha pontuada. B - Um diagrama para o monômero NS1 onde os sítios de glicosilação estão indicados em hexágonos verdes e dissulfetos em círculos amarelos. Fonte: Akey et al., 2014.

1.3.3. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A dengue é diagnosticada por meio de análises laboratoriais, através da detecção direta dos biomarcadores de origem viral ou de forma indireta mediante anticorpos. Os métodos diretos incluem a detecção do vírus por cultura em células, isolamento e detecção do RNA viral por amplificação através da reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa em tempo real (RT-PCR, do inglês *real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction*) (Darwish et al, 2015). Estes métodos permitem detectar o vírus e sorotipá-lo na fase aguda da doença com um alto grau de precisão e especificidade. No entanto, eles dificilmente estão disponíveis para diagnósticos descentralizados nos países endêmicos da dengue (Kao et al., 2005); devido ao seu alto custo e necessitarem de pessoal e equipamentos especializados, limitando seu uso em países em desenvolvimento (Castro et al, 2010; Fry et al., 2011; Kittigul e Suankeow, 2002; Cavalcanti et al., 2012; Parkash e Hanim Shueb, 2015). Portanto, as metodologias mais utilizadas são as do tipo sorológico que incluem a detecção dos biomarcadores indiretos como a IgG e IgM e o marcador direto que é a NS1. Estes ensaios podem ser realizados por meio da imunocromatografia, ou através do ensaio de ELISA (Sigla em inglês para *enzyme-linked immunosorbent assay*), que é a

técnica padrão ouro. Porém os ensaios imunocromatográficos, apesar de serem rápidos e portáteis, tem baixa sensibilidade (Darwish et al., 2015). Enquanto que o ELISA mostra maior sensibilidade, mas não apresenta possibilidade de miniaturização (não sendo portátil), demanda alta quantidade de amostra e alta quantidade de reagente comparado com as técnicas eletroquímicas, o tempo de análise é longo, o trabalho é intenso, o custo é elevado, e requer a marcação (*labeling*) do analito, utilizando-se substratos carcinogênicos (como a orto-fenilenodiamina, ODP) (Peeling, et al., 2010; Piccoli, 2015). A **Figura 5** compara os métodos padrão de diagnóstico, os biomarcadores detectados e o tempo de detecção apropriado para cada biomarcador.

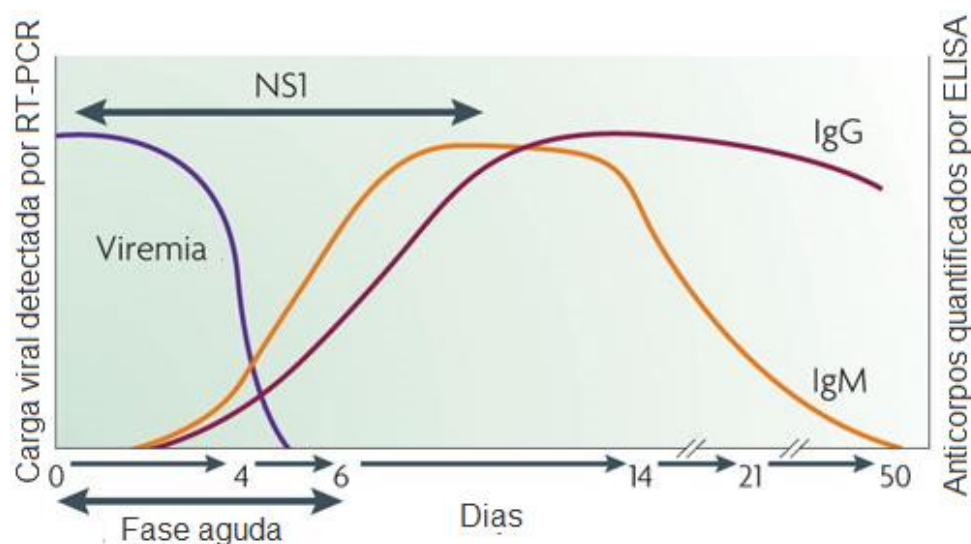


Figura 5: Biomarcadores e métodos de diagnóstico da dengue apropriados de acordo com o tempo de progressão da doença. O vírus pode ser detectado entre 0 a 6 dias após a infecção e a carga viral pode ser detectada por RT-PCR. A NS1 pode ser detectada entre 1 a 9 dias posteriores à infecção através do ensaio de ELISA. As imunoglobulinas M e G podem ser detectadas a partir de 3 a 5 dias através do ensaio de ELISA. Os níveis de IgM decaem até deixar de ser detectáveis perto dos 50 dias após o início da infecção, enquanto que os níveis de IgG se mantêm estáveis por longo tempo após o término da infecção. Fonte: Adaptado de Deimantavičiūtė, 2017

Em resumo, a NS1 mostra vantagens como biomarcador uma vez que permite a detecção da doença em estágios iniciais e pode ser quantificada por métodos mais simples que os outros componentes virais. No entanto, as metodologias de detecção deste biomarcador podem ser melhoradas para evoluir em formatos de diagnóstico que combinem portabilidade, sensibilidade e facilidade de manuseio, sem a necessidade de marcação do analito nem requerimento da utilização de grandes quantidades de amostra. Assim, vêm sendo desenvolvidas pesquisas para a construção de biossensores baseados em diferentes técnicas.

1.3.4. BIOSENSORES

Um biossensor esta geralmente definido como um dispositivo analítico o qual converte uma resposta biológica em um sinal quantificável e processável (Lowe, 1984; Grieshaber *et al*, 2008). O seu uso varia desde o monitoramento ambiental, o processamento de alimentos e controle de qualidade até o diagnóstico clínico-laboratorial (Piccoli, 2015; Santos *et al.*, 2015).

Alguns dos tipos de biossensores desenvolvidos para o diagnóstico da dengue, com as vantagens e limitações de cada um são mostrados na **Tabela 1**.

Tabela 1: Classificação dos Biossensores para detecção de dengue. Fonte: Adaptado de Darwish *et al*, 2015

Tipo de Biossensor	Vantagens	Desvantagens	Limitações	Desafios	Referencia
Piezelétrico	Sensitivo devido a seu módulo de elasticidade, Boa relação custo benefício para polímeros impressos, já que não se usam anticorpos monoclonais	Propriedades de reconhecimento inadequadas em polímeros impressos	Elevado limite de detecção do analito	Incremento do limite de oscilação	Chen, et al. 2009 Tai et al., 2006
Óptico	Potencial em baixos limites de detecção e útil para analisar um grande número de amostras ao mesmo tempo	Precisa de um microscópio caro, equipado com filtros de fluorescência, assim como outros eletrônicos	Requer muito tempo para a marcação do analito	Detecção do analito sem marcação	Baeumner et al., 2006 Chen et al., 2013
Eletroquímico	Alta sensibilidade, simplicidade e baixo custo	Marcação do analito requer mais tempo	Limitado tamanho de área eletroativa	Melhorar a interface do elemento de bioreconhecimento com a superfície do eletrodo	Oliveira et al., 2009 Wang et al., 2007

Como pode se ver na **Tabela 1**, um tipo de biossensor que apresenta interessantes vantagens é o sensor eletroquímico. Podendo ser: potenciométrico (voltagem), amperométrico (corrente), impedimétrico (impedância), condutimétrico (condutância) ou transistor de efeito de campo (voltagem) (Darwish *et al.*, 2015)

1.3.4.1. BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

Em biossensoriamento, as medições de propriedades elétricas para extrair informação de sistemas biológicos, são normalmente eletroquímicas em natureza, onde um componente bioeletroquímico serve como principal elemento de transdução (Grieshaber *et al.*, 2008). Os biossensores baseados em técnicas de transdução de sinal como a eletroquímica apresentam a possibilidade de construção de dispositivos miniaturizados, permitindo análises em frações reduzidas de amostras (Cecchetto, 2015).

Em geral, os biossensores eletroquímicos são fabricados mediante a funcionalização da superfície de eletrodos com biomoléculas como enzimas, anticorpos e DNA (Le *et al.*, 2015; Khalil *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017). A funcionalização pode se conseguir através do ancoramento direto das biomoléculas receptoras modificadas na superfície do eletrodo, ou mediante a formação de monocamadas auto-organizadas (SAM – do inglês *self-assembled monolayers*), que ancorem o bioreceptor. Uma SAM consiste de uma camada ordenada e organizada de moléculas, formada espontaneamente sobre uma superfície sólida, através de um processo dirigido pela interação de ligações e forças intermoleculares (Ulman, 1996).

Estes biossensores podem ser utilizados para a detecção de moléculas alvo em soluções, sem necessidade de pré-tratamento da amostra, devido a eventos de ligação específica ou interações entre os biomateriais e as moléculas alvo (Grieshaber *et al.*, 2008).

Os biossensores eletroquímicos monitoram os sinais de corrente ou potencial mensuráveis, gerados por reações de oxidação e redução (Perumal e Hashim, 2014). Estes sinais são registrados durante a ligação do alvo com os receptores, devido a que o evento produz uma alteração local das propriedades elétricas (Luo e Davis, 2013). A medição de sinais é proporcional à concentração do alvo (Perumal e Hashim, 2014; Parkash e Hanim Shueb, 2015).

1.3.4.2. BIOSSENSORES IMPEDIMÉTRICOS VS CAPACITIVOS

De acordo com o citado por Santos *et al.*, 2014 entre os métodos eletroanalíticos livres de marcação que são desejáveis e potencialmente comerciais, se encontram a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) e a Espectroscopia de Capacitância Eletroquímica (ECE). Ambas as metodologias estão baseadas na funcionalização de eletrodos metálicos (por exemplo de ouro) através de SAMs e dependem da resposta de frequência, onde as funções complexas tanto de impedância como de capacitância, são dependentes da medição da resposta sinusoidal da corrente diante de uma

perturbação sinusoidal do potencial no estado estacionário de um eletrodo de trabalho (Santos *et al.*, 2015). Na EIE (**Figura 6a**), o monitoramento do evento de bioreconhecimento pela superfície bioreceptiva (SAM) é realizado através da sonda redox em solução, enquanto que na ECE, a sonda redox está incorporada na superfície bioreceptiva (SAM) (**Figura 6b**) (Bedatty *et al.*, 2015), tornando a superfície bioreceptiva (SAM) uma superfície eletroativa.

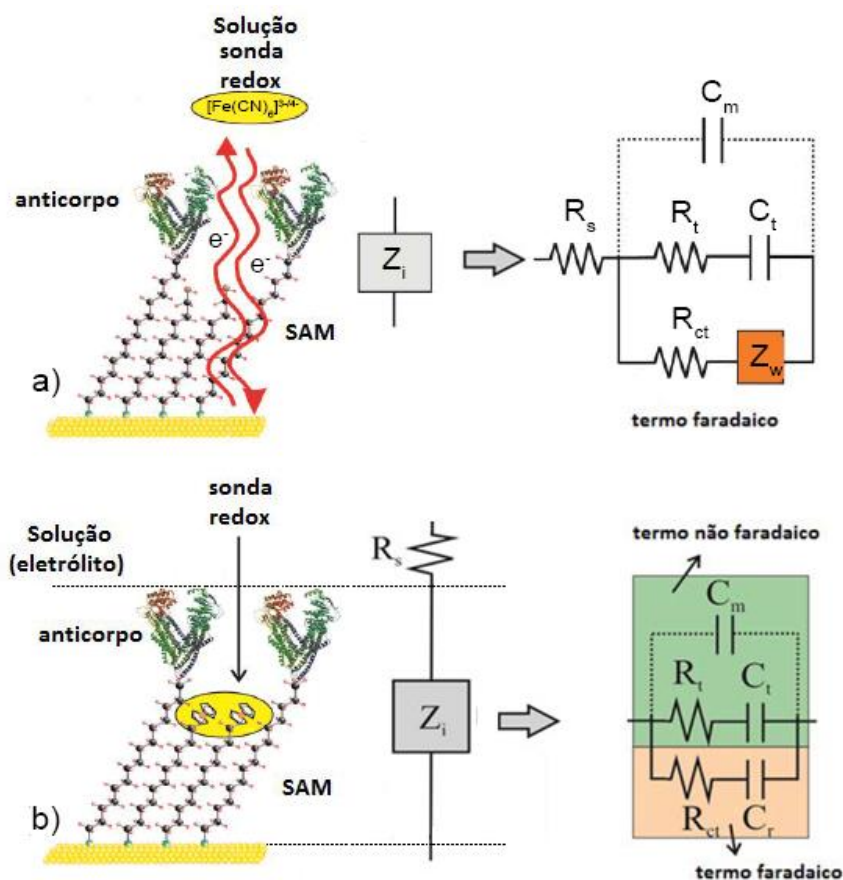


Figura 6: Representação elétrica de uma monocamada auto-organizada (SAM), com um anticorpo imobilizado para detecção. a) Contendo sonda redox em solução: Circuito equivalente capaz de modelar dados do biossensor impedimétrico onde sonda redox está presente na solução. O elemento Warburg (Z_w) representa as características de difusão em massa da sonda redox e R_{ct} é a resistência de transferência de carga redox. A resistência (s) de eletrólito é modelado em série com a impedância interfacial total superior e, geralmente, não é importante na análise, uma vez que não varia. b) Contendo a sonda redox imobilizada: A impedância interfacial de uma superfície receptiva utilizada para biossensoriamento é representada por Z_i e a resistência da solução por R_s . Ao lado, o circuito elétrico equivalente capaz de modelar o biossensor redox capacitivo. Fonte: Adaptado de Fernandes *et al.*, 2014 e Santos *et al.*, 2014.

A diferença principal, portanto, é em relação ao tipo de sinal transdutor, que na EIE faz uso da resistência de transferência de carga como sinal transdutor (**Figura 7a**), enquanto que na ECE o sinal transdutor é capacitivo (**Figura 7b**). Bedatty *et al.*, 2015 propuseram que na ECE, o evento de ligação

da molécula alvo (biomarcador), provoca uma perturbação no sinal da capacitância redox, o que permite a construção de curvas analíticas altamente sensíveis.

Estudos aplicando tanto EIS quanto ECE foram conduzidos utilizando SAM compostas de alcanotiois. Recentemente, Cecchetto *et al.*, (2015) publicaram os resultados de um método de detecção de NS1 por EIS. Neste trabalho foi construído um biossensor impedimétrico a base de SAM com imobilização covalente do anticorpo para NS1, como espécie receptora, para detecção da glicoproteína NS1. No trabalho se reportou o sucesso na detecção desta proteína em PBS e em soro sanguíneo em que ambos: o limite de detecção (L.D.) e a faixa linear obtidos no método são úteis para o diagnóstico da dengue. Ainda em 2016, o mesmo grupo apresentou um novo trabalho para detectar a dengue utilizando a técnica de ECE, onde se reportou um L.D. em soro sanguíneo 60 vezes menor, ou seja, mais sensível, em comparação à técnica de impedância (Cecchetto *et al.*, 2017).

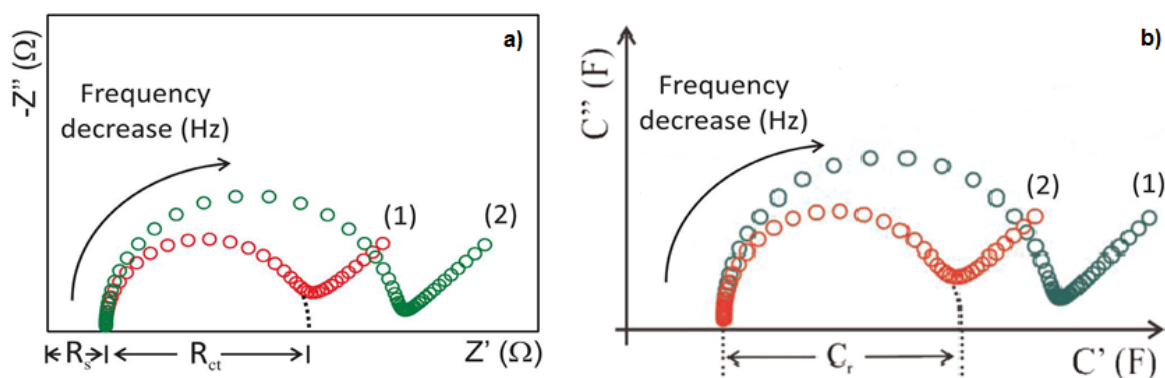


Figura 7: a) Espectro típico de Nyquist de impedância faradaica, R_{ct} (o diâmetro do semi-círculo no espectro de impedância) representa a resistência de transferência eletrônica que controla a cinética de elétrons de transferência da sonda redox na interface do eletrodo. Z' é a impedância real associada aos valores de resistência à transferência de carga, enquanto que Z'' é a impedância imaginária que se correlaciona a capacitância da dupla camada elétrica. b) Representação da variação da capacitância redox (C_r) quando ocorre ligação de um alvo. Esta variação pode ser facilmente determinada a partir do menor valor de capacitância imaginária após a obtenção do semicírculo. C' é a capacitância real associada aos valores de armazenamento de carga, enquanto que C'' é a capacitância imaginária. Fonte: Adaptado de Santos *et al.*, 2014 e Santos *et al.*, 2015.

1.3.5. SAM TIOLADAS VS SAM PEPTIDICAS

Os primeiros trabalhos usando ECE para a detecção de biomarcadores usaram SAMs, compostas de alceno tióis (âncoras) e ferroceno tióis (probe redox), como plataforma para imobilização das espécies receptoras. Esta abordagem analítica possibilita a obtenção de métodos livres de marcação (*label free*), no entanto, tal configuração tem influência de interações

inespecíficas, ainda que pequenas, sobre a resposta do biossensor, especialmente em análises realizadas em meio sanguíneo. Adicionalmente, a proporção de tiol/ferroceno influencia na sensibilidade das análises, assim afetando a reprodutibilidade das medidas (informação de investigações internas no grupo ainda não publicadas). Portanto, mesmo que os alcanotiois sejam úteis para este tipo de ensaios, é importante a pesquisa em outros tipos de moléculas que possam ser úteis no desenvolvimento de plataformas de biossensoriamento capacitivas. Assim, se começou a utilizar peptídeos para a formação de superfícies receptivas, principalmente por três razões: (1) São capazes de formar SAMs em superfícies metálicas através da adição de um resíduo de cisteína (Cys) na cadeia (Li *et al.*, 2011); (2) também podem ser marcados com sondas redox e (3) permitem a ligação de anticorpos (Piccoli, 2015), que são características essenciais para o desenvolvimento deste tipo de plataforma de biossensoriamento.

Além do mais, este tipo de moléculas apresenta outras vantagens como por exemplo, maior compatibilidade com moléculas biológicas, podem ser manipulados e alterados para aplicações específicas (Piccoli, 2015) a maneira de blocos de construção e podem ser aplicados diretamente em ambientes biológicos complexos, evitando efeitos de incrustação de outros materiais na superfície da matriz (Brault *et al.*, 2010); é dizer que podem ser desenhados com características anti-incrustantes.

Uma outra característica importante dos peptídeos é que permitem a obtenção de aptâmeros, que são moléculas artificiais de reconhecimento que consistem de uma região peptídica variável inserida num andaime proteico constante, ou seja que funcionam como bioreceptores que se ligam a um alvo específico (Baines e Colas, 2006; Colas 2008), com afinidade e especificidade iguais ou superiores aos anticorpos, quando ocorre ligação das proteínas alvo, tornando os peptídeos desejáveis para micro ensaios de proteínas biomarcadoras (Li *et al.*, 2011; Piccoli, 2015). Algumas vantagens dos aptâmeros de peptídeos, em relação aos anticorpos são seu pequeno tamanho, estrutura simples, e o enovelamento dissulfeto- independente (Colas, 2008).

Este trabalho visou desenvolver um biossensor capacitivo baseado no uso de camadas automontadas de peptídeos contendo grupos ferroceno e propriedades anti-incrustantes (*low fouling*) como plataforma eletroquímica para obtenção de superfícies receptivas, via imobilização do anticorpo, para detecção do antígeno NS1.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver um biossensor capacitivo para diagnóstico de dengue, utilizando como biomarcador a proteína NS1. Existindo diversos objetivos específicos intermediários:

- Sínteses e purificação de um peptídeo anti-incrustante, automontável em superfícies de ouro, com características redox e capaz de ancorar um bioreceptor (anticorpo).
- Caracterização eletroquímica por voltametria cíclica e espectroscopia de capacitância derivada da impedância eletroquímica de uma monocamada formada por peptídeo redox.
- Ensaios de estabilidade da SAM peptídica (SAM-pep).
- Ensaios de especificidade da SAM-pep como superfície sensora.
- Ensaios de resposta da SAM-pep como superfície sensora utilizando o par antígeno-anticorpo da proteína C-reativa como modelo.
- Ensaios de resposta da SAM-pep como superfície sensora para o par antígeno-anticorpo da proteína NS1.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os reagentes e solventes utilizados durante a realização deste trabalho, assim como a procedência de cada um deles, se detalha na seguinte tabela:

Tabela 2: Reagentes utilizados.

REAGENTE	FORMULA MOLECULAR	PROCEDENCIA
Água ultrapura (18.2 MΩ cm a 25 °C)	H ₂ O	Millipore
Acetonitrila (ACN) (≥99%)	CH ₃ CN	Sigma-Aldrich Co. (USA) ou Novabiochem (USA)
Anhidrido 3-ferrocenilpropionico (≥98%)	C ₂₆ H ₂₆ Fe ₂ O ₃	Sigma-Aldrich Co. (USA)
N,N'-diisopropilcarbodiimida (≥98%)	(CH ₃) ₂ CHN=C=NCH(CH ₃) ₂	
Etanolamina	C ₂ H ₇ NO	
Fmoc aminoácidos (≥95%)	---	
N-Hidroxibenzotriazol (≥97%)	C ₆ H ₅ N ₃ O	
Hidróxido de potássio (≥90%)	KOH	
Hidróxido de sódio (≥98%)	NaOH	
Perclorato de tetrabutilamônio (≥99%)	TBAClO ₄	
Tampão Fosfato Salino (PBS)	---	
Proteína C-reativa (CRP)	---	
Anticorpo anti-CRP	---	
Glicoproteína não estrutural 1 (NS1)	---	AbCam (USA)
Anticorpo anti-NS1	---	

Diclorometano (DCM) (>99%)	CH ₂ Cl ₂	Hexis Científica (Brasil) Vetec Química Fina Ltda. (Brasil)
Dimetilformamida (DMF) (>99%)	C ₃ H ₇ NO	
Ácido trifluoracético (TFA) (>99%)	C ₂ HF ₃ O ₂	Merck®
1,2-Etanoditiol (EDT) (≥94%)	C ₂ H ₆ S ₃	Acros Organics®
Triisopropilsilano (TIS) (98%)	C ₉ H ₂₂ Si	
Ácido sulfúrico (98%)	H ₂ SO ₄	QHEMIS (Brasil)

3.1. OBTENÇÃO DO PEPTÍDEO REDOX COM CARACTERÍSTICAS ANTI-INCRUSTANTES

3.1.1. SÍNTESE DO PEPTÍDEO REDOX

O peptídeo de sequência: Fc-Glu-Gly-Ser-Gly-Ser-Cys, foi projetado com três regiões-chaves para aplicações em biosensoriamento capacitivo redox (**Figura 8**). Em primeiro lugar, o grupo tiol (SH) presente na cadeia lateral da cisteína (Cys), para ligação covalente à superfície de ouro. Segundo, grupo ferroceno acoplado a região N-terminal da cadeia peptídica, no grupamento alfa-amino do glutamato (Glu), o qual irá lhe conferir as propriedades redox necessárias. Terceiro, grupo carboxílico livre para imobilização de um anticorpo, na cadeia lateral do glutamato. O peptídeo também tem propriedades não-incrustantes devido as cadeias laterais da serina (Ser) serem polares e, portanto, há capacidade de formar uma camada de solvatação, restringindo o acesso de proteínas e outras moléculas na formação da monocamada auto-organizada (SAM) (Santos *et al.*, 2015; Piccoli *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017)

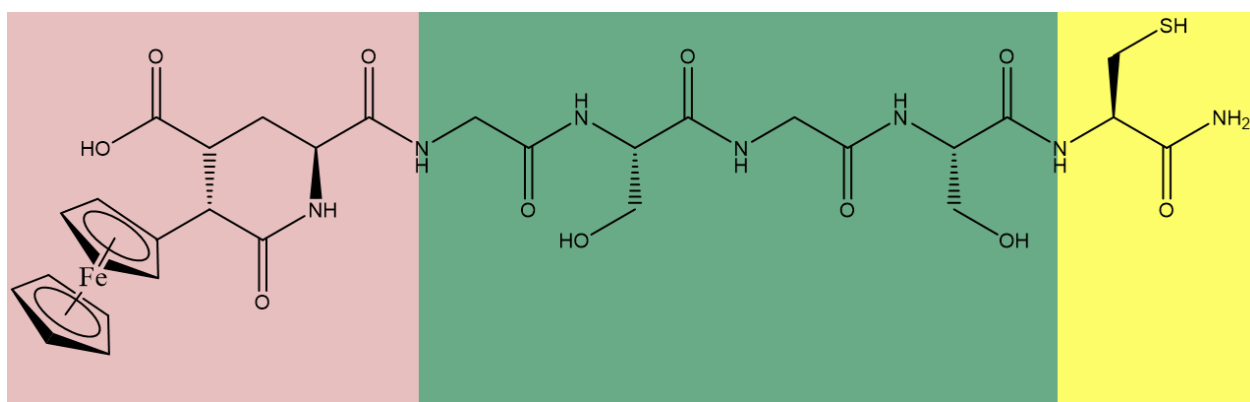


Figura 8: Estrutura do peptídeo. Em amarelo, a região de ancoramento no ouro. Em verde, a região que lhe confere polaridade (propriedade anti-incrustante). Em rosa, a região de ancoramento da sonda redox e de imobilização do anticorpo (molécula bio-receptora). Fonte: Modificado de Júlia Piccoli.

A síntese do peptídeo foi realizada por meio do protocolo de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS), descrito por Merrifield, 1964 apud Piccoli, 2015. Para a síntese foi utilizada a resina (suporte sólido) Rink-amida, a qual permite a ligação do primeiro resíduo de aminoácido da cadeia peptídica através de uma ligação covalente de tipo amida entre o grupo amino (NH_2) da resina e o grupo carboxilato da cadeia principal do aminoácido (Cilli *et al*, 2017; Piccoli, 2015). A SPFS, está baseada no crescimento resíduo a resíduo da cadeia peptídica, presa no suporte (resina) pelo seu aminoácido carboxiterminal e consiste de várias etapas de desproteção e acoplamento, intercaladas com lavagens para eliminação dos reagentes utilizados e subprodutos obtidos (Lorenzón, 2015).

As etapas de desproteção foram realizadas para retirar o grupamento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil) dos resíduos de aminoácidos antes de cada acoplamento. Para isto se realizaram incubações de 20 minutos sob agitação constante em solução de metil-piperidina 20% em DMF (Dimetilformamida) (Piccoli, 2015).

Entre as etapas de desproteção e acoplamento se procederam com as etapas de enxágue para retirar o excesso de reagentes e/ou subprodutos, mediante o uso intercalado de DMF (dimetilformamida), e DCM (diclorometano). Posterior ao enxague se realizou o teste de ninidrina (Kaiser *et al.*, 1970; Piccoli, 2015), para verificar o sucesso na desproteção (**Figura 9**).

Uma vez verificado o sucesso na desproteção (presença de grupamentos amino livres, detectados pela presença de uma coloração azul) se procedeu ao acoplamento dos resíduos de aminoácido mediante ativação dos grupos carboxilas dos resíduos por adição de N,N-diisopropilcarbodiimida (Dic)/N-hidroxibenzotriazol (HOBt) e os solventes DCM/DMF (1:1, v/v), por meio da incubação sob agitação constante por duas horas. Na etapa de acoplamento, todos os reagentes (resíduos de aminoácido e ativadores) foram colocados em excesso, numa quantidade que excedia em dobro ao número de sítios ativos (grupos amino) presentes na resina. Posteriormente foram repetidos os procedimentos de enxágue e ensaio de ninidrina, conforme procedimento anteriormente descrito, mas esperando que a resposta for negativa (coloração amarela), indicativa da ausência de grupos amino livres, comprovando a eficiência nos passos de acoplamento.

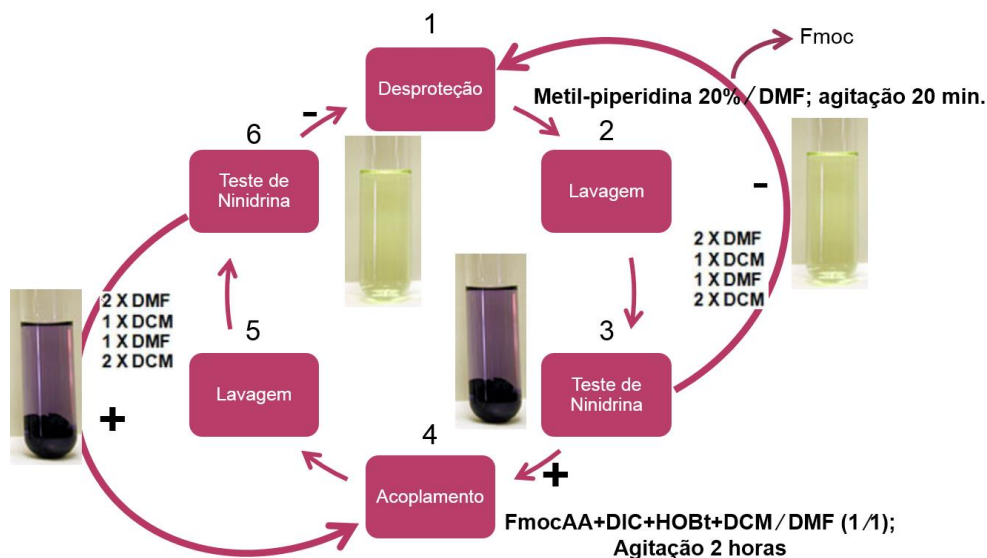


Figura 9: Esquema de síntese do peptídeo

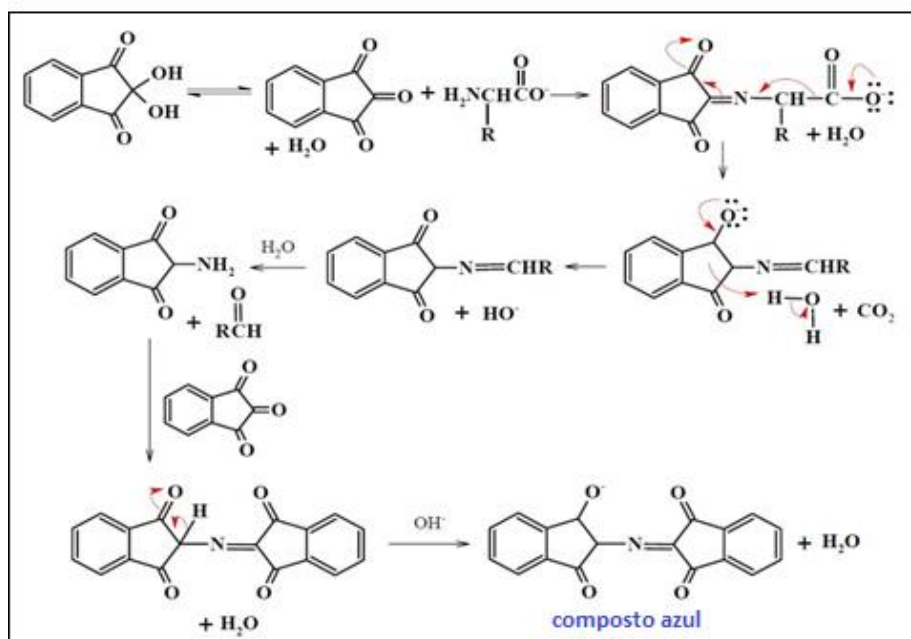


Figura 10: Reação que ocorre durante o teste de ninidrina. Extraído de: Pinto Picoli, 2015.

Após a síntese da cadeia peptídica, o protetor Fmoc foi retirado como já foi descrito anteriormente, liberando o grupo alfa amino do Glutamato para poder ancorar a molécula de ferroceno. Para fazer o conjugado, um equivalente de anidrido de 3 ferroceno ácido propiônico e um equivalente de peptidil resina foram colocados em presença de DCM e DMF durante 24 h. O grupo carboxila do 3 ferroceno ácido propiônico é reativo, acoplando ao grupo alfa amino do Glu

através da formação de uma ligação amida. O produto do conjugado foi o peptídeo redox, aderido à resina Rink-amida.

3.1.2. REAÇÃO DE CLIVAGEM

A clivagem do peptídeo ao final da síntese foi realizada em frasco de cintilação sob agitação, com a solução de clivagem contendo 94% de ácido TFA, o responsável pela clivagem, e os supressores de reações colaterais: 2.5% de água Milli-Q®, 2.5% de EDT e 1% de TIS. O volume utilizado foi na proporção de 10 mL de solução para cada 1 g de resina. Depois foi executada a precipitação do peptídeo e da resina com éter etílico gelado e o sobrenadante foi descartado. Ao final, o peptídeo foi dissolvido com uma solução contendo 0.045% de TFA em água ultrapura e centrifugado para separar a resina. O sobrenadante resultante contendo o peptídeo foi liofilizado.

As características de síntese do peptídeo se encontram na **Tabela 3**.

Tabela 3: Características da síntese do peptídeo.

Resina	Rink amida
Grau de Substituicao	0.52 mmol g ⁻¹
Escala	0.1
Excesso	2
Massa Inicial	192 mg
Massa final	233 mg
Massa de Fc anidrido	45 mg
Massa peptídeo bruto	66 mg
Peptídeo puro (>98%)	5 mg

3.1.3. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

Os produtos de síntese foram purificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em modo semi-preparativo, utilizando uma coluna C₁₈ da marca Phenomenex (tamanho 250 mm x 10 mm, 300 Å, tamanho da partícula de 5 µm).

Após a purificação e liofilização dos materiais obtidos, a análise de pureza de cada fração foi realizada por meio de CLAE em um aparelho analítico Shimadzu®, com coluna 4.6 mm x 150 mm, de fase reversa C₁₈ Ultrasphere Phenomenex, 300 Å, tamanho da partícula de 5 µm.

Os parâmetros cromatográficos estão amostrados na **Tabela 4**.

Tabela 4: Condições cromatográficas empregadas na análise e purificação do peptídeo redox.

Modo	Semi-preparativo	Analítico
Solventes	A (0.045% de TFA em H ₂ O)	A (0.045% de TFA em H ₂ O)
	B (0.036% de TFA em ACN)	B (0.036% de TFA em ACN)
Gradiente	20-50% de solvente B em 90 min	5 a 95% de solvente B em 30 min
Fluxo	5 mL min ⁻¹	1 mL min ⁻¹
Comprimento de onda	220 nm	220 nm

A análise do peso molecular do peptídeo para confirmar a obtenção do material desejado foi realizada por Espectrometria de Massas (EM) com aparelho Bruker mediante infusão direta, em modo de detecção por ionização positiva (MS⁺) faixa de 200/2000 g mol⁻¹.

3.2. AVALIAÇÃO DAS MONOCAMADAS AUTOMONTADAS (SAM) PEPTÍDICAS E DO BIOSENSOR RESULTANTE POR TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS

Estes ensaios consistiram na realização de experimentos de caracterização da SAM formada na superfície de um eletrodo de ouro e posterior avaliação da resposta da plataforma resultante ante a interação dos pares antígeno-anticorpo para a glicoproteína não estrutural da dengue (NS1), que é o foco deste trabalho; e o par antígeno-anticorpo para a proteína C-reativa (CRP), já que a dita proteína é um importante biomarcador para doenças cardíacas e processos inflamatórios e que à sua vez que já foi utilizada com sucesso em outros trabalhos empregando plataformas capacitivas (Fernandes et al., 2014; Santos et al., 2014).

Também se testou resposta da plataforma funcionalizada com o anticorpo anti-CRP diluído em solução eletrolítica (PBS) na ausência de alvo (antígeno), e a resposta de ambos os anticorpos (Ab-CRP e Ab-NS1) contra diferentes concentrações de Albumina do Soro Humano (HSA, da sigla em inglês para Human Serum Albumin) que foi utilizada como controle de superfície, já que é a proteína mais abundante no sangue (Sugio et al., 1999), sendo importante considerar os seus efeitos na resposta da plataforma em desenvolvimento, que tem como propósito ser utilizada em ensaios clínicos com amostras de soro.

Previamente à realização de cada um dos ensaios, se preparou a superfície do eletrodo, conforme se descreve nas Seção 3.2.2. Os fatores de rugosidade (FR) obtidos variaram entre 1.26 e 1.56, com superfícies de área eletroativa (A_e) variando entre 0.040 cm² a 0.049 cm².

3.2.1. MEDIDAS ELETROQUÍMICAS PARA CARACTERIZACAO DA SAM E DO BIOSENSOR

Todas as medidas eletroquímicas, foram realizadas num potenciostato AUTOLAB modelo PGSTAT30 com módulo de análise de resposta em frequência (FRA, sigla em inglês para *Frequency Response Analysis*). O sistema (**Figura 11**) utilizado consistiu de uma célula eletroquímica de 20 mL com arranjo de 3 eletrodos: Eletrodo de trabalho de Au (METROHM de 2 mm de diâmetro), eletrodo de referência de Ag|AgCl em KCl_{sat} e eletrodo auxiliar de Pt.

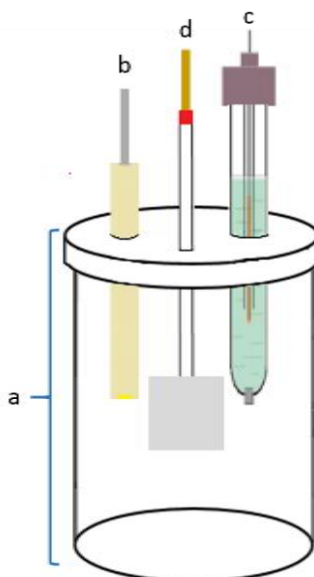


Figura 11: Esquema do sistema electroquímico composto de: a) Célula eletroquímica, b) Eletrodo de trabalho, c) Eletrodo de referência de Ag|AgCl em KCl_{sat} e d) eletrodo auxiliar (contra- eletrodo) de Pt. Fonte: Próprio autor.

As medidas eletroquímicas de Voltametria Cíclica (VC) e ECE (Espectroscopia de Capacitância Eletroquímica derivada da Impedância) foram realizadas em solução 20 mmol L⁻¹ de TBAClO₄ dissolvido em ACN e água deionizada (Milli-Q) (20:80 v/v) como eletrólito de suporte.

3.2.2. PREPARAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO ELETRODO

A preparação da superfície do eletrodo de ouro foi realizada por polimento mecânico com partículas de aluminas de diferentes diâmetros (1 µm; 0.3 µm e 0.05 µm), partindo-se da alumina de 1 µm de diâmetro para a de 0.05 µm. Entre cada etapa de polimento os eletrodos foram sonicados por 2 minutos em água Milli-Q para remover as partículas aderidas. Em seguida as superfícies dos eletrodos foram tratadas eletroquimicamente com NaOH 0.5 mol L⁻¹ (potencial de

-1.5 V a -0.5 V com uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}) e subsequentemente com H_2SO_4 0.5 mol L^{-1} (intervalo de potencial de -0.2 V a 1.5 V com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1}) até a estabilização do pico de redução do ouro na medida de voltametria cíclica (em torno de 50 ciclos). Após os passos de polimento eletroquímico, a área real da superfície do eletrodo foi calculada com base na área eletroativa obtida por meio da integração do pico catódico para medida em H_2SO_4 0.5 mol L^{-1} , utilizando-se o fator de conversão de $410 \mu\text{C cm}^{-2}$ (Fernandes *et al.*, 2014 apud Trassati e Petrii, 1991)

Na **Figura 12** é possível observar alguns perfis de limpezas característicos obtidos durante a realização dos ensaios:

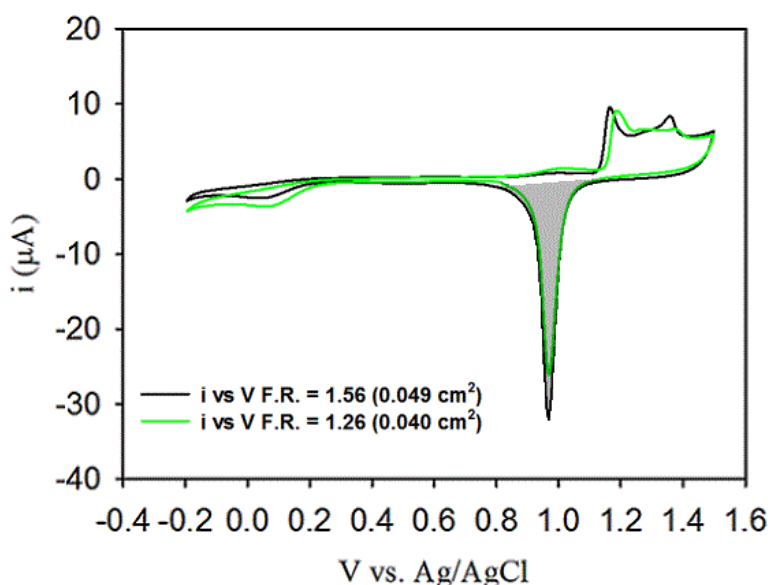


Figura 12: Perfil de limpeza eletroquímica do ouro polido realizada em solução de H_2SO_4 0.5 mol L^{-1} aquecido a 80°C . Velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , numa janela de potencial de -0.2 V a 1.5 V. O pico catódico utilizado para o cálculo da área real do eletrodo se encontra destacado em cinza.

3.2.3. FUNCIONALIZAÇÃO DO ELETRODO

3.2.2.1. FORMAÇÃO DA SAM

A funcionalização do eletrodo de Au através da formação da SAM peptídica (**Figura 13**) se conseguiu através da incubação a temperatura ambiente (25°C) do eletrodo polido e limpo por 16 h. em 150 μL ou 200 μL de solução de peptídeo redox dissolvido em uma mistura 50:50 de água Milli-Q e acetonitrila (ACN) a uma concentração que variou entre 2.0 mmol L^{-1} a 2.6 mmol L^{-1} , para a obtenção de uma SAM mais empacotada e portanto estável.

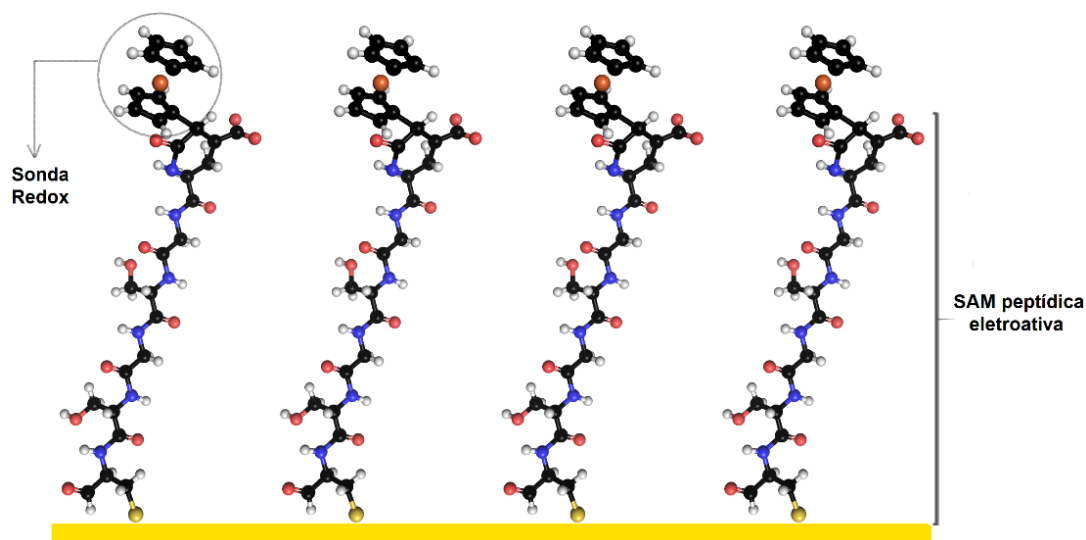


Figura 13: Esquema do desenvolvimento do biossensor formado por: eletrodo de ouro funcionalizado, monocamada auto-organizada peptídica contendo a sonda redox. Fonte: Cedido por Sequeiros, 2018.

Em cada experimento, a formação da SAM foi confirmada por VC. Na **Figura 14** se mostram VCs de alguns dos experimentos realizados. As VCs foram utilizadas para definir os potenciais de meia onda, a serem utilizados para realizar as medidas de ECE.

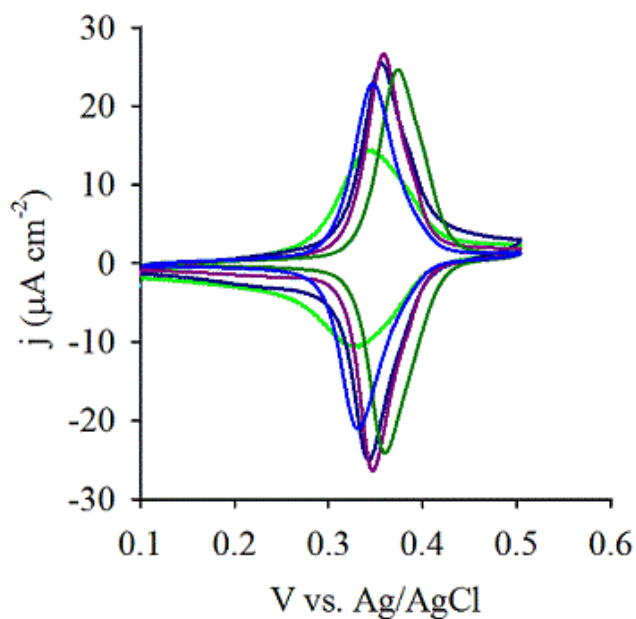


Figura 14: Voltamogramas de SAM em alguns ensaios

Posteriormente à caracterização das SAM por VC e ECE, em cada experimento se procedeu com a ativação das SAMs e imobilização do anticorpo de interesse, seja para o Ab-CRP, ou o Ab-NS1. Para isto, procedeu-se à retirada do eletrodo da célula eletroquímica de medição, enxague com água deionizada (Milli-Q), secagem com gás nitrogênio e incubação por 30 minutos em 150 μL a 200 μL de solução aquosa de EDC/NHS (0.1/0.4 mol L^{-1}). Este último procedimento teve por objetivo a efetiva ativação dos grupos carboxilas presentes na SAM que permite a incorporação do anticorpo. Em seguida, o eletrodo foi enxaguado com água deionizada (Milli-Q) e secado com gás nitrogênio. Posteriormente foi incubado por 1 hora em 50 μL de solução 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de anticorpo para proteína C-reativa dissolvida em tampão PBS pH 7.4, ou em 50 μL de solução 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (0.25 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de anticorpo anti-NS1 dissolvido em tampão PBS pH 7.4, dependendo do experimento. Finalizado o período de incubação, se procedeu ao enxague do eletrodo com PBS, secagem com gás nitrogênio e posteriormente se procedeu a realizar as medidas de VC e ECE. A isto seguiu uma etapa de bloqueio, mediante a incubação por 5 minutos em 50 μL de solução aquosa de Etanolamina 1 M, com posterior enxague com água deionizada (Milli-Q) e secagem com gás nitrogênio, para posterior caracterização por VC (dados não mostrados) e ECE.

Na **Figura 15**, pode se observar exemplos de curvas de Nyquist e gráficos de Bode representando a caracterização por ECE da SAM, antes e depois de imobilizar o anticorpo, assim como também posteriormente ao bloqueio, descrevendo tanto para a imobilização do anticorpo anti-CRP e bloqueio com etanolamina (**Figura 15**“a” e “b”) como a do anticorpo anti-NS1 e bloqueio com etanolamina (**Figura 15**“c” e “d”).

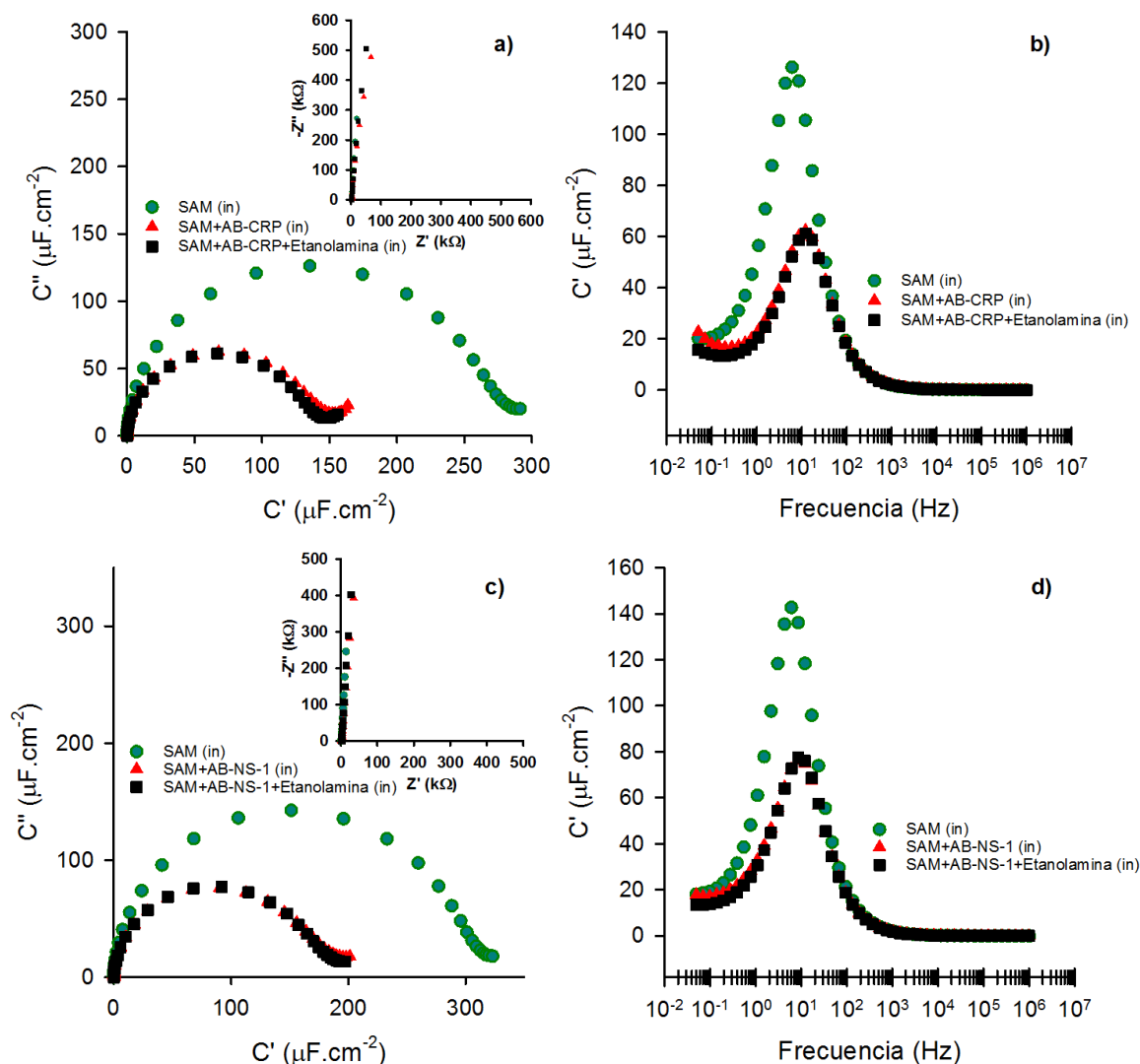


Figura 15: a) e c) Curvas de Nyquist: Capacitância e Impedância (acima), para o anticorpo anti-CRP (Ab-CRP) em "a" e para o anticorpo anti-NS1 (Ab-NS1) em "c"; b) e d) Gráficos de Bode. Monocamada Automontada (SAM) no potencial redox ou (redox in) (círculos verdes); SAM com anticorpo imobilizado no potencial redox (triângulos vermelhos); e SAM, com anticorpo imobilizado, depois de bloquear com Etanolamina 1M, também no potencial redox (quadrados pretos). A diminuição da Capacitância redox desde $\sim 290 \mu\text{F cm}^{-2}$ na SAM para $\sim 150 \mu\text{F cm}^{-2}$ depois de incubação em Ab-CRP, assim como o decaimento da mesma desde $\sim 325 \mu\text{F cm}^{-2}$ na SAM para $\sim 190 \mu\text{F cm}^{-2}$ depois de incubação em Ab-NS1 se considera como prova do sucesso na imobilização do anticorpo. Medidas realizadas em 20 mM de TBAClO₄ dissolvido em acetonitrila e água deionizada (Milli-Q) (20:80 v/v) como eletrólito de suporte, entre as faixas de frequência de 0.05 Hz a 1.0 MHz.

Os resultados das medidas de ECE demonstram o decaimento das capacitâncias redox observados nas curvas de Nyquist posterior à ativação da SAM e a incubação com anticorpo, o que se considera

como demonstração do sucesso da imobilização do anticorpo na SAM, devido a uma perturbação ao redor dos grupos ferrocenil (Santos e Bueno, 2016).

3.2.2.2. ENSAIO DE ESTABILIDADE DA SAM

O controle de estabilidade do sistema se realizou imobilizando anti-CRP na SAM. Para isto, uma vez confirmada a imobilização do anticorpo e seguindo a esta etapa de bloqueio, se realizou a incubação do eletrodo por 30 minutos em tampão PBS pH 7.4, com posterior enxague em PBS e água, e seco com gás nitrogênio. Depois se procedeu à caracterização por VC e ECE. Este procedimento se repetiu 11 vezes.

3.2.2.3. CONTROLE DE SUPERFÍCIE

Seguindo a etapa de imobilização do anticorpo anti-CRP ou anti-NS1 e a etapa de bloqueio, foi realizada a incubação do eletrodo por 30 minutos em solução de proteína HSA a uma concentração $0.005 \mu\text{g mL}^{-1}$, equivalente a $0.075 \text{ nmol L}^{-1}$ (nM), diluída em tampão PBS pH 7.4, com posterior enxague em tampão PBS pH 7.4, e seco com gás nitrogênio. Depois se procedeu a caracterização por VC e ECE. Procedimento que foi repetido, com as seguintes concentrações de proteína HSA: $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ (0.15nM), $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$ (0.75nM), $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (1.5nM), durante o ensaio com anti-CRP. Durante o experimento com anti-NS1 se foram ensaiadas as seguintes concentrações adicionais de HSA: $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (7.5nM), $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (15 nM) e $2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (30nM)

3.2.2.4. ENSAIOS DE RESPOSTA DA SAM FRENTE ÀS INTERAÇÕES ANTÍGENO-ANTICORPO

3.2.2.4.1. PAR CRP

Para este ensaio se imobilizou o anticorpo CRP na SAM e, seguindo a etapa de bloqueio, se realizou a incubação do eletrodo por 30 minutos em solução de proteína C-reativa a uma concentração 0.5 nmol L^{-1} (nM), diluída em tampão PBS pH 7.4, com posterior enxague em tampão PBS pH 7.4, e seco com gás nitrogênio. Depois se procedeu à caracterização por VC e ECE. Este procedimento foi repetido por 4 vezes, com as seguintes concentrações de proteína C-reativa: 1.0nM, 5.0nM, 20.0nM e 50.0nM.

3.2.2.4.2. PAR NS1

Para este ensaio se imobilizou o anticorpo NS1 na SAM e, posterior à etapa de bloqueio, se realizou a incubação do eletrodo por 30 minutos em solução de proteína NS1 a uma concentração $0.005 \mu\text{g mL}^{-1}$ (0.1nM), diluída em tampão PBS pH 7.4, com posterior enxague em tampão PBS pH 7.4 e água, e seco com gás nitrogênio. Depois se procedeu à caracterização por CV e ECE. Este procedimento se repetiu, com as seguintes concentrações de proteína NS1: $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ (0.2nM), $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$ (1nM), $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (2nM), $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (10nM), $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (21nM), $2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (42nM).

3.3. ENSAIO DE ELISA

Foram realizados ensaios de ELISA para testar a atividade das proteínas e a interação entre os pares antígeno e anticorpo a serem utilizados. Tanto o par NS1, que é o foco deste trabalho, quanto o par CRP.

Para realizar estes ensaios, se utilizou o protocolo proposto pela Thermo Fisher Scientific Inc., 2010 para ensaio de ELISA indireto, utilizando como anticorpo secundário, o anti-rato marcado com *Horse Raddish Peroxidase* (HRP) (1:10000 em PBS+BSA 0.1%). O conjugado empregado para revelação foi O-fenilendiamina (OPD, das suas siglas em inglês para O-phenylenediamine), e se utilizou ácido sulfúrico como solução *Stop*, para deter a reação de revelação. A intensidade da cor da reação foi determinada por absorbância em leitor de microplacas com comprimento de onda de 492nm. Foram preparadas diluições tanto dos antígenos, quanto dos anticorpos em tampão PBS pH 7.4, que é o mesmo tampão utilizado para realizar os ensaios na plataforma capacitiva. Os anticorpos foram preparados na diluição 1:500. As faixas de concentrações de antígenos ensaiadas tanto para NS1 ($0.005 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$), quanto para CRP (0.05nmol L^{-1} a 100nmol L^{-1}), incluíram várias concentrações a serem ensaiadas na plataforma capacitiva, assim como concentrações ainda maiores para poder confirmar com maior certeza o funcionamento de ambos os pares antígeno-anticorpo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. SÍNTESE DO PEPTÍDEO

O peptídeo redox, foi sintetizado de acordo com o protocolo de SPFS, descrito na secção experimental, utilizando a resina Rink-amida de 0.52 mmol g^{-1} , que permite a obtenção de uma cadeia peptídica com uma extremidade α -carboxiamida (**Figura 16**), evitando a existência de cargas indesejadas que pudessem interferir na imobilização do peptídeo no eletrodo de ouro. Os rendimentos de síntese estão resumidos na **Tabela 5**.

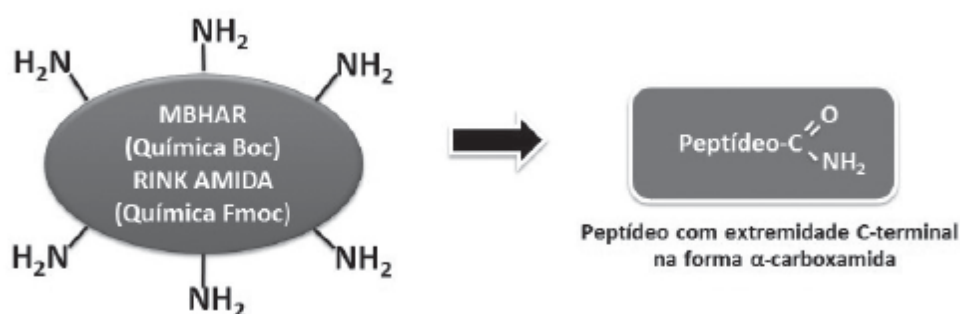


Figura 16: Peptídeo com terminação α -carboxamida, como consequência da SPFS utilizando a resina Rink-amida. Fonte: Cilli et al., 2017.

Tabela 5: Rendimento do peptídeo bruto.

Produto	Ganho de massa ou massa teórica (mg)	Ganho de massa ou massa experimental (mg)	Rendimento (%)
Peptídeo redox: Fc-Glu-Gly-Ser-Gly-Ser-Cys	77.7	66	85

Como resultado da síntese e purificação por CLAE, foram obtidos 5 mg de peptídeo redox, com uma alta porcentagem de pureza ($>98\%$), muito similar ao reportado no trabalho de Santos, et al. (2015), que obtiveram conjugados de peptídeo redox com uma porcentagem de pureza $>99\%$. Nas **Figuras 17 e 18** pode ser visto os cromatogramas dos peptídeos bruto e puro.

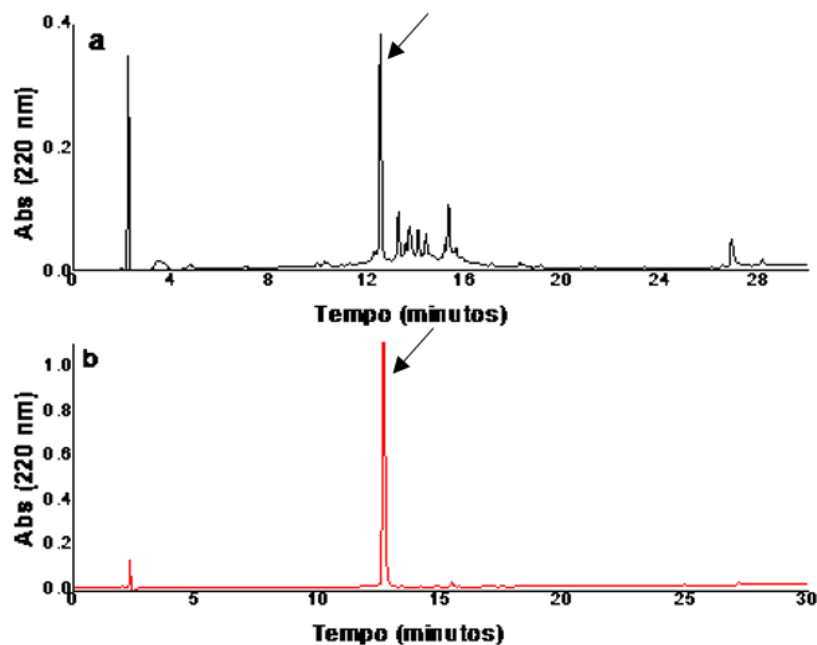


Figura 17: Perfil cromatográfico do peptídeo redox Fc-Glu-Gly-Ser-Gly-Ser-Cys: (a) bruto (b) puro, com grau de pureza >98%

O produto desejado teve um tempo de retenção de 12.6 minutos, como pode se ver pelo maior pico observado na **Figura 17a**. O cromatograma de análise de pureza mostra um perfil puro onde pode se observar apenas o pico do peptídeo redox em 12.6 minutos. (**Figura 17b**).

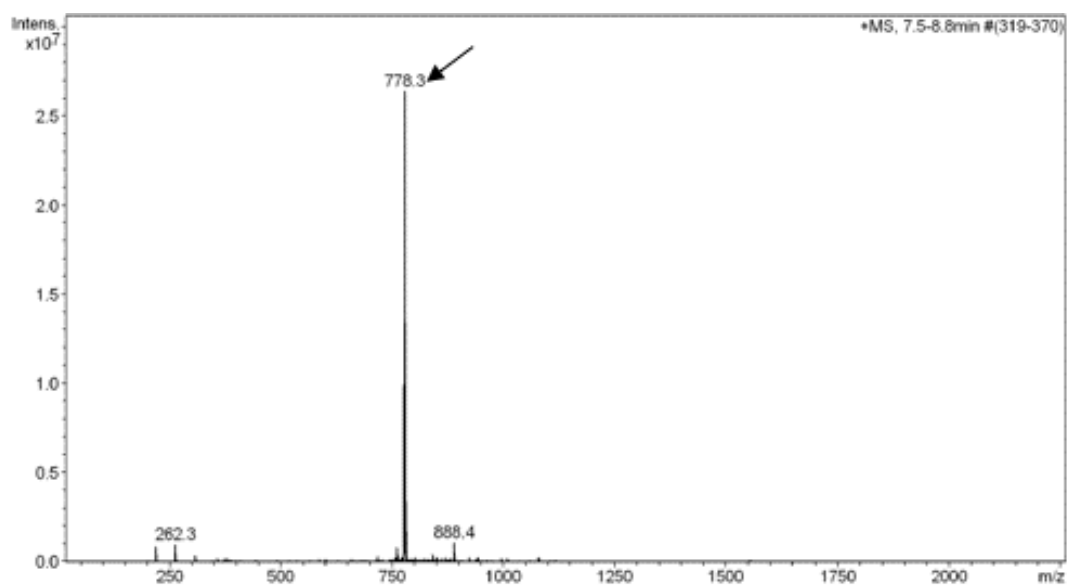


Figura 18: Espectro de massas referente ao peptídeo de massa molar de 777.0 g mol⁻¹

O perfil obtido por MS mostrou um pico com massa molar de 778.3 g mol⁻¹ confirmando a obtenção do peptídeo desejado de massa molar teórica 777.0 g mol⁻¹. A variação entre a massa obtida por espectrometria e a massa teórica se deve à protonação da amostra pelo equipamento que faz parte do requerimento de ionização das substâncias para análise por técnica espectrométrica. Assim, a obtenção do peptídeo redox esperado com um alto grau de pureza foi confirmada por CLAE e MS.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DA SAM POR TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS

As propriedades cinéticas e termodinâmicas da SAM de peptídeo (SAM-pep) foram determinadas por VC e ECE, assim como a reversibilidade e, portanto, estabilidade do sistema formado pelo eletrodo funcionalizado com SAM-pep. Assim, a resposta da densidade de corrente (J) em função do potencial (V) foi monitorada em diferentes velocidades de varredura de 0.01 V s⁻¹ até 1.0 V s⁻¹ (em passos de 0.05 V s⁻¹) na faixa de potencial entre 0.1 V até 0.5 V em relação a uma referência eletroquímica Ag|AgCl.

Com base na relação entre a corrente de pico anódico (I_{pa}) contra a velocidade de varredura (V s⁻¹) se obteve uma reta de regressão linear ($r^2 = 0.996$) (**Figura 19b**), mostrando uma correlação eminentemente linear. Usando o coeficiente angular desta reta, calculou-se a densidade de estados redox ocupados (RDOS, Sigla em inglês para Redox Density of State Occupied) imobilizada sobre o eletrodo sendo que o valor encontrado foi de 1.13×10^{-10} mol cm⁻², correspondente ao número de centros redox. Ainda analisando os dados obtidos por CV, foi calculado o potencial formal do sistema (ou potencial de meia onda, $E_{(1/2)}$, em torno de 0.34 V) (**Figura 20**). A variação de potencial entre os picos anódico e catódico a uma velocidade de varredura de 0.1 V s⁻¹ foi de ~0.014 V, muito próxima do valor teórico para oxi-redução envolvendo a troca de 1e que deveria ser de 0 V (Eckerman et al., 2010). Se observou também que razão de picos anódico e catódico (J_{pa}/J_{pc}) foi próxima de 1 a diferentes velocidades de varredura, o que indica simetria entre os picos de corrente.

Um sistema eletroquimicamente reversível está definido por três características: (1) Simetria de picos de corrente; (2) linearidade na relação entre a corrente de pico e a velocidade de varredura e (3) a diferença de potencial entre os picos anódico e catódico deve ser de 0 V ($\Delta E_p = 0$) a baixas velocidades de varredura (Eckerman et al., 2010). O sistema eletroquímico em questão cumpriu com estes parâmetros, o que é pré-requisito para um sistema eletroquimicamente estável,

necessário a uma plataforma eletroquímica a ser usada em sensores capacitivos redox (Bueno et al., 2012)

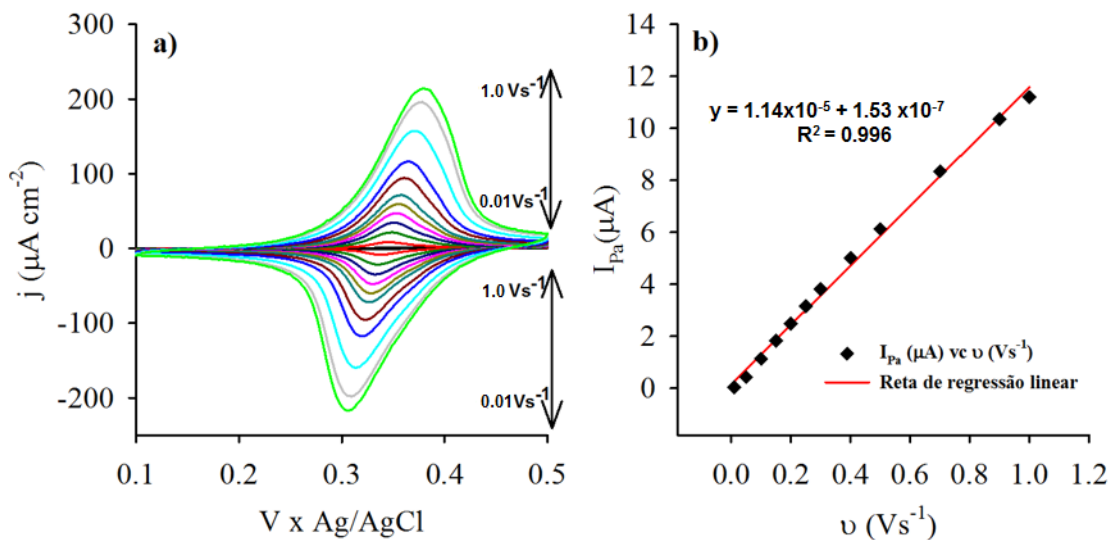


Figura 19: a) Voltamogramas da monocamada do peptídeo redox a diferentes velocidades de varredura. b) Distribuição das alturas dos picos de corrente anódicos (pontos pretos), em relação às velocidades de varredura, comparados com uma curva de ajustamento linear ($R^2=0.996$) dos dados (reta vermelha).

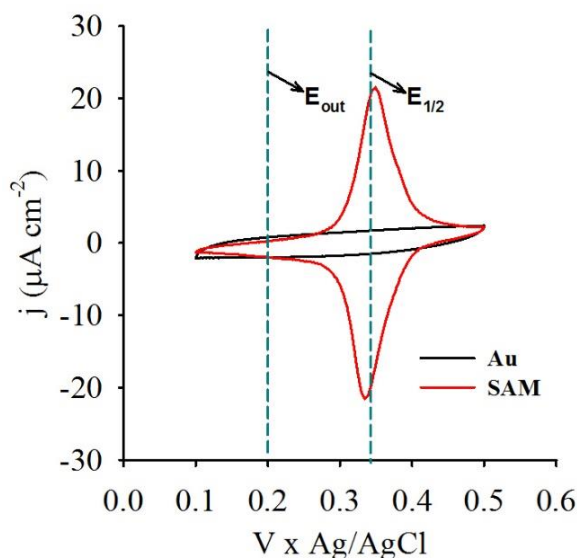


Figura 20: Voltametria Cíclica para SAM do peptídeo redox. As linhas indicam o potencial de meia onda ou potencial formal (0.34 V), e potencial considerado como redox out ou região não-faradaica (0.15 V), onde a medidas por ECE foram realizadas. A presença dos picos anódicos e catódicos na SAM de peptídeo (linha vermelha), que estão ausentes no ouro polido (linha preta) é a evidencia característica do sucesso na imobilização do peptídeo com atividade redox sobre o eletrodo de ouro. Medidas realizadas em 20 mM de TBAClO_4 dissolvidos em ACN e água deionizada (Milli-Q) (20:80 v/v) como eletrólito de suporte entre os potenciais de 0.1 V a 0.5 V com velocidade de varredura de 0.1 V s^{-1} .

As caracterizações da SAM por ECE foram realizadas no potencial de meia onda $E_{1/2}$ (resultante de calcular a meia dos potenciais de pico anódico e catódico na VC), que é a região de domínio da atividade faradaica na corrente. Estas medidas também foram realizadas em um potencial de domínio não-faradaico da corrente, ou como definido aqui fora da janela redox do sistema (E_{out} , *redox out* ou *região não-faradaica*, 0.2 V), ambos potenciais indicados na **Figura 20**. Os dados de impedância e capacitância estão representados nos gráficos de Nyquist (**Figura 21**). Nesta abordagem, os valores de capacitância são determinados com base no diâmetro do semicírculo no gráfico capacitivo de Nyquist. A partir dos valores de capacitância fica evidente a distinção entre a resposta capacitiva observada no E_{out} (gráfico inserido na **Figura 21b**) e a capacitância eletroquímica observada quando a medida é realizada no $E_{1/2}$. No primeiro caso, os fenômenos não-faradaicos são dominantes podendo se considerar a resposta de capacitância como se fosse unicamente devido a dupla camada elétrica (C_{dl}), com valores de aproximadamente $25 \mu\text{F cm}^{-2}$. Já nas medidas realizadas no $E_{1/2}$, a contribuição eletroquímica à capacitância fica evidente ($C_{\mu} + C_{dl}$), sendo que o valor observado é de aproximadamente $283 \mu\text{F cm}^{-2}$.

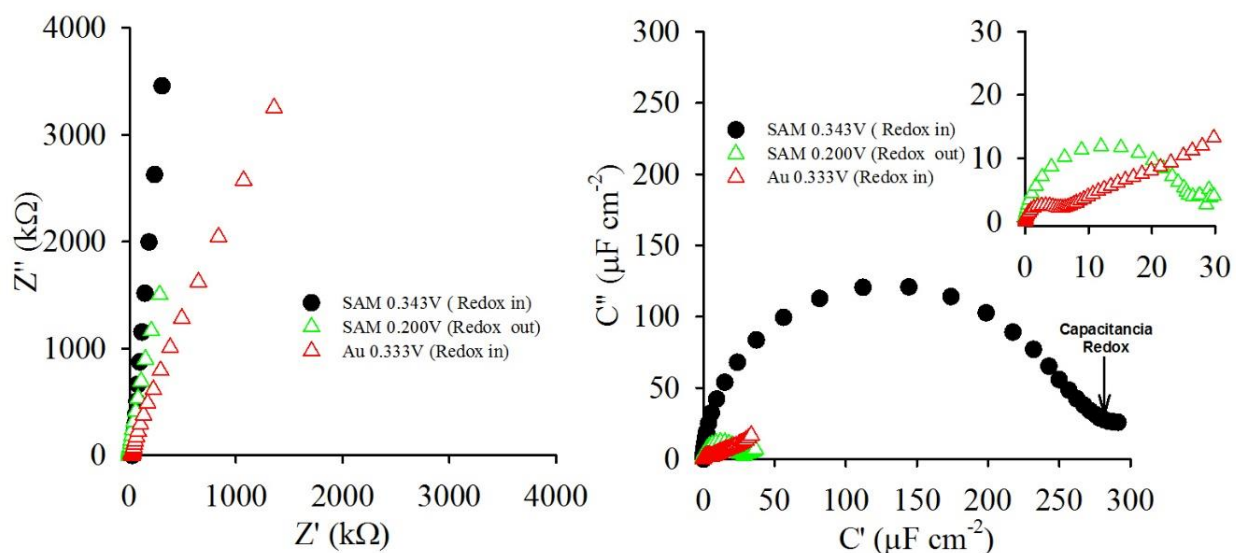


Figura 21: Diagramas de Nyquist: a) Impedância e b) dados de capacitância derivados das medidas em a) para a monocamada no potencial redox (círculos pretos), da monocamada fora do potencial redox (triângulos verde) e do ouro puro (triângulo vermelho). Claramente a capacitância aumenta de aproximadamente $6 \mu\text{F cm}^{-2}$ no ouro polido para $283 \mu\text{F cm}^{-2}$ no potencial de meia onda (Redox in) do eletrodo modificado. Medidas realizadas em 20 mM de TBAClO_4 dissolvidos em acetonitrila e água deionizada (Milli-Q) (20:80 v/v) como eletrólito de suporte entre as faixas de frequência de 0.01 Hz a 1.0 MHz.

Na **Figura 22** estão representados os dados de capacitância real e imaginária em função da frequência (gráficos de Bode) para as medidas de Au polido, SAM na região não-faradaica (redox out) e SAM no $E_{1/2}$ (redox in). A **Figura 22b** ilustra os dados da capacitância imaginária em que o principal parâmetro a ser observado é a escala de tempo da variação de transferência de elétrons no sistema (τ_r) (Bueno et al., 2013), a qual pode ser obtida diretamente pelo pico na capacitância imaginária conforme indicado na figura. Para as medidas na região faradaica foi observado o valor de τ_r igual 0.17 s (6 Hz), indicando um processo de carregamento/descarregamento completamente faradaico, é dizer que envolve a transferência de elétrons. Enquanto que nas medidas na região fora do potencial redox, se encontrou um τ_r de 0.003 s (300 Hz), indicando um processo de carregamento não faradaico ou sem transferência de elétrons.

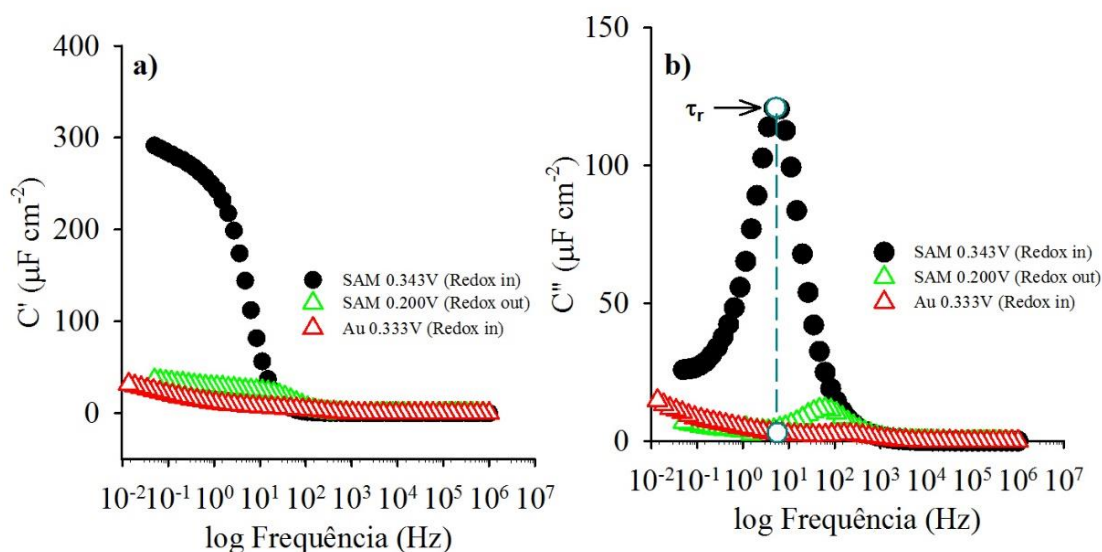


Figura 22: Variação da capacitância em função da frequência. a) Variação da capacitância real e b) Variação da capacitância imaginária. SAM no potencial redox (Pontos pretos. Frequência = ~6 Hz; τ_r = ~0.17 s). SAM potencial redox out (Triângulos verdes. Frequência: ~35 Hz). Ouro puro (Triângulos vermelhos. Frequência: ~300Hz).

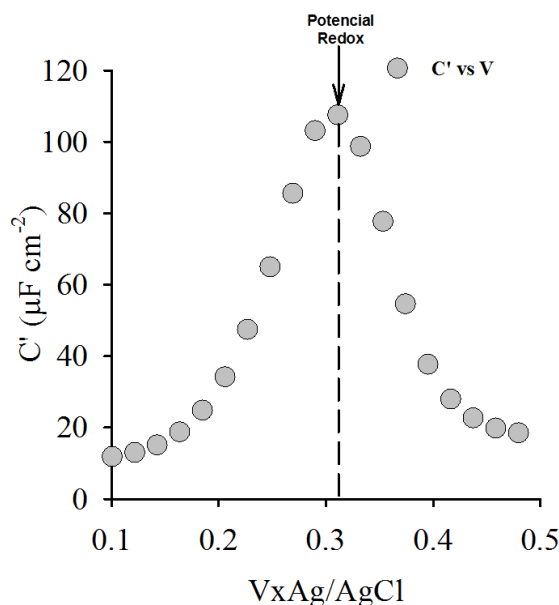


Figura 23: Curva Gaussiana representando a dispersão da Densidade de Estados Redox (RDOS) para SAM de peptídeo ancorado com ferroceno. O número de RDOS se calcula derivando a área embaixo a curva. O número de RDOS é 7.14×10^{-7} . Para o caso particular do ferroceno, o número de estados é proporcional ao número de moléculas. A curva já está normalizada pela área do eletrodo, portanto, basta dividir a área embaixo a curva pela carga elementar para obter o número de moléculas redox, neste caso o número de moléculas de peptídeo ancoradas com ferroceno.

As medidas de reposta em frequência fixa (neste caso 0.12 Hz) com varredura de potencial foram realizadas entre os potenciais de 0.1 V a 0.5 V em 20 diferentes valores de potencial. Analisando-se os dados de capacitância real (C') em função da energia (E) medida através do potencial (V) fornecido, obtêm-se uma curva Gaussiana conforme ilustrado na **Figura 23**. O pico de capacitância nesta medida está em concordância com o valor de potencial formal obtido nas medidas de CV (0.34 V), indicando que a natureza da atividade eletroquímica associada a capacitância neste potencial é maximizada. A integral desta Gaussiana mostrada na **Figura 23** permite calcular a densidade de estados redox ocupados (RDOS – sigla em inglês para Redox Density Occupied States). Isto porque, considerando-se que o processo redox em questão envolve a troca de um único elétron em cada molécula ($\text{Fc}^{++} + e^- \rightarrow \text{Fc}$), o número de estados por molécula de ferroceno ancorado ao eletrodo é igual a 1. Portanto o RDOS (N) total é igual ao número de moléculas sobre a superfície do ouro, ou em outros termos, o RDOS é igual ao grau de recobrimento molecular (Γ) da superfície de ouro pelo peptídeo redox obtido anteriormente.

Consequentemente, ao se calcular o RDOS, obtém-se também a densidade de moléculas imobilizadas sobre o eletrodo. O cálculo do RDOS foi realizado de acordo à seguinte equação:

$$N = \Gamma = \int_0^N dN = \frac{1}{e} \int C_{(V)} dV$$

Onde (dN) é o diferencial do RDOS; e é a carga elementar, que é uma constante ($-1,60 \times 10^{-19}$ Coulombs); $C_{(V)}$ ou C' é a componente real da capacitância medida.

Vale ressaltar que neste caso particular a componente real da Capacitância ($C_{(V)}$ ou C') medida pode ser considerar equivalente a Capacitância eletroquímica ($C_{(\bar{\mu})}$), devido a fato que a contribuição dos processos não faradaicos em C' no $E_{1/2}$ envolvidos na Capacitância eletroquímica, podem ser são considerados desprezíveis, como explicado por Bedatty *et al.*, 2015.

Também vale lembrar que $C_{(V)}$, se deriva do fato que o potencial eletroquímico $\bar{\mu}$ é igual à carga elementar (e) multiplicada pelo potencial elétrico aplicado (V).

Por meio da integral da Gaussiana da **Figura 23**, foi obtido um valor de densidade molecular na ordem de $1.32 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$, muito próximo daquele obtido por CV ($1.13 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$).

Assim, nas duas metodologias apresentadas aqui, os resultados obtidos foram próximos, ficando também na mesma ordem de grandeza que o recobrimento reportado na literatura para outras SAM confeccionadas com peptídeos ou tioladas (Fernandes *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2014; Piccoli, 2015) (**Tabela 6**). No entanto, as SAM tioladas apresentam um grau de cobertura maior, o que representa a formação de SAM mais compactas que as SAM confeccionadas com peptídeos.

Tabela 6: Comparação Superfície de recobrimento molecular em diferentes tipos de SAM.

SAM	Superfície de recobrimento molecular (mol cm^{-2})
Fc-Glu-Gly-Ser-Gly-Ser-Cys	1.13×10^{-10} - 1.32×10^{-10}
Ac-Cys-Ala-Ala-Lys(Fc)-Ala-Ala-COOH (Santos <i>et al.</i> , 2014)	1.2×10^{-10}
Ac-Cys-Ile-Ile-Lys(fc)-Ile-Ile-COOH (Piccoli <i>et al.</i> , 2016)	0.4×10^{-10}
Tiolada (Fernandes <i>et al.</i> , 2014)	3.0×10^{-10}

4.3. ENSAIO DE ELISA

Os resultados do ensaio de ELISA foram positivos tanto para o par NS1 ($R^2 = 0.99$) (**Figura 24 “a” e “b”**) quanto para o par CRP ($R^2 = 0.99$) (**Figura 24 “c” e “d”**), dado que as concentrações testadas de ambas as proteínas deram resultados de absorbância muito superiores ao branco (BSA), superando os 20% considerados suficientes para um resultado positivo com a utilização de esta plataforma. Portanto, sendo possível confirmar a interação antígeno-anticorpo, tanto do par CRP quanto do par NS1.

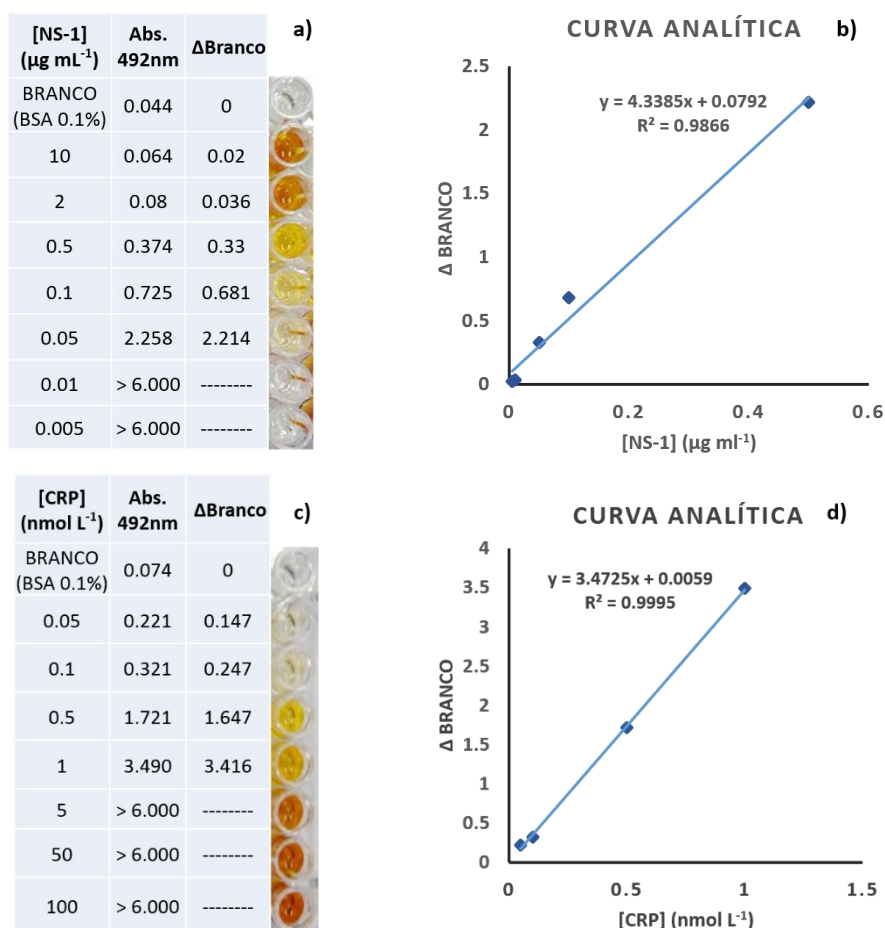


Figura 24: Ensaio de ELISA dos pares antígeno-anticorpo para NS1 e CRP: a) Dados de absorbância e fotografia amostrando a reação colorimétrica de diferentes concentrações de antígeno-NS1 vs. o anticorpo-NS1, b) Curva analítica das 5 menores concentrações de antígeno (NS1) testadas no ensaio, demonstrando uma boa interação do par ($R^2 = 0.99$), c) Dados de absorbância e fotografia amostrando a reação colorimétrica de diferentes concentrações de antígeno-CRP vs. o anticorpo-CRP, d) Curva analítica das 4 menores concentrações de antígeno (CRP) testadas no ensaio, demonstrando uma boa interação do par ($R^2 = 0.99$)

4.4. ENSAIOS DE RESPOSTA DA SAM COMO SUPERFÍCIE DE BIOSENSORIAMENTO

4.4.1. ENSAIO DE ESTABILIDADE DA SAM

O controle de estabilidade do sistema se realizou de acordo com o procedimento descrito na secção caracterizando cada etapa por CV e ECE (Figura 25).

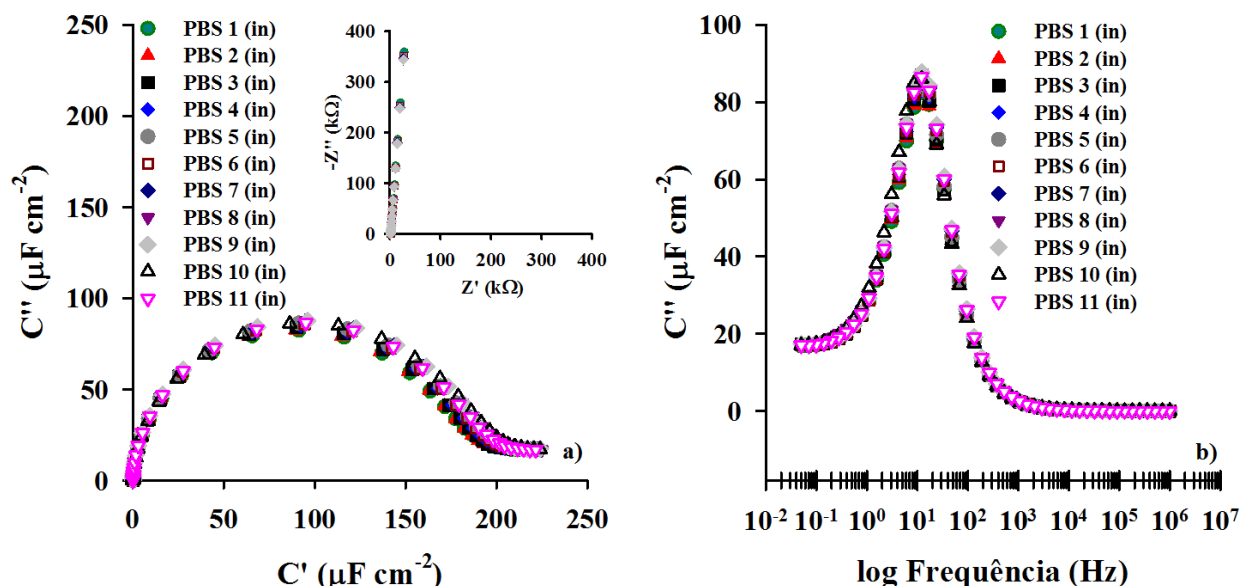


Figura 25: a) Curvas de Nyquist: Capacitância e Impedância (acima), e b) Gráficos de Bode. Incubação em PBS pH 7.4 por 11 vezes, simulando a incubação com target. Porém as três primeiras medições (PBS 1, PBS 2 e PBS 3) se consideram verdadeiros brancos. Medidas realizadas em solução 20 mM de TBAClO₄ dissolvido em acetonitrila e água deionizada (Milli-Q) (20:80 v/v) como eletrólito de suporte entre as faixas de frequência de 0.03 Hz a 1.0 MHz.

Observando tanto as curvas de Nyquist, quanto o gráfico de Bode, pode se observar que a variação entre as 11 medidas é mínima, mostrando que a SAM tem uma grande estabilidade de sinal, sendo não responsiva por longo tempo a soluções eletrolíticas não proteicas. No entanto, para poder confirmar esta ausência de resposta, se realizou uma prova estatística qualitativa simples, ou seja, se calculou a variação da resposta relativa ($\Delta RR_{(\%)}$) de acordo com a seguinte equação: $\Delta RR_{(\%)} = [(R_n - R_0)/R_n] * 100$. Onde, $R_n = 1/C_{\bar{\mu}_n}$, que representa o inverso da capacitância redox média (definida como C_r ou $C_{\bar{\mu}}$) para cada concentração de proteína ou solução

(p.e. PBS) ensaiada no sensor; $R_0 = 1/C_{\bar{\mu}_0}$, representa inverso da capacitância redox média dos brancos.

Os dados foram apresentados num gráfico de barras (**Figura 26**), mostrando a variação de $\Delta RR_{(\%)}$, com os correspondentes desvios padrões relativos de cada medida que foi realizada em triplicata.

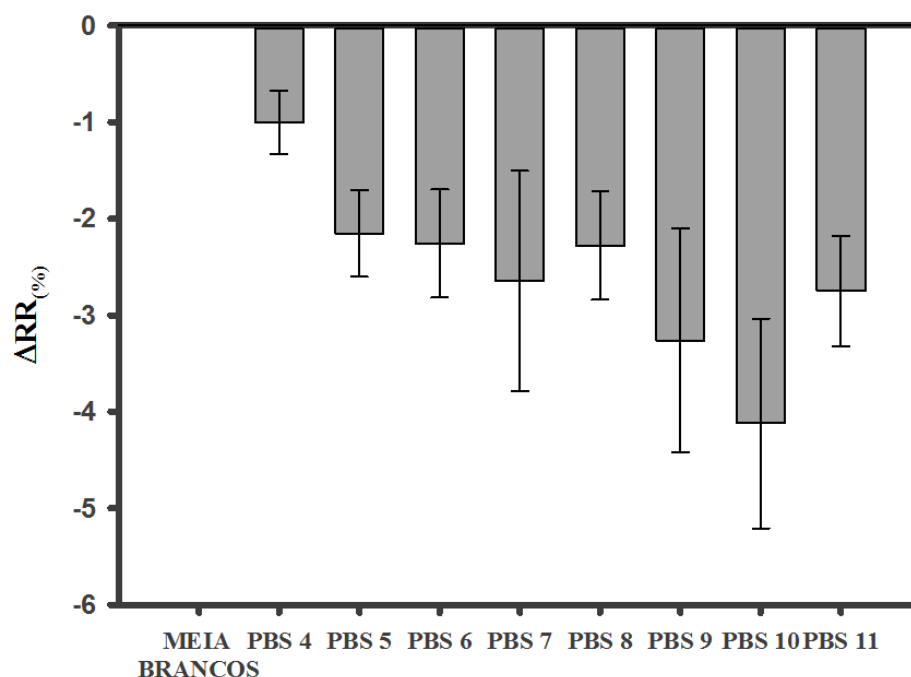


Figura 26: Gráfico de barras, representando a variação de sinal relativo ($\Delta RR_{(\%)}$) entre as medidas realizadas com PBS. Meia Brancos refere-se à meia de $\Delta RR_{(\%)}$ das três primeiras incubações com PBS.

Como pode ser observado no gráfico de barras (**Figura 26**) o $\Delta RR_{(\%)}$ varia entre 1% e -4%. Por outro lado, o desvio padrão para cada medida, varia entre 0.1 a 1% do $\Delta RR_{(\%)}$. Portanto, poderia se afirmar que a variação observada entre as medidas, não é muito maior que a variação observada entre as repetições de uma mesma medida. Concluindo-se, desta forma, que a variação entre medidas realmente se deve principalmente a oscilações inerentes do sistema (“ruído”) e não à resposta do sensor.

4.4.2. CONTROLE DE SUPERFÍCIE

Os controles de superfície do sistema se realizaram de acordo com o procedimento descrito na secção 3.2.2.3, utilizando a proteína HSA em lugar do alvo, para verificar a ausência de interação entre o sistema e outras proteínas inespecíficas que pudessem ser consideradas potenciais interferentes. O resultado da comparação entre a resposta do sistema diante dos brancos, a proteína inespecífica e o alvo se mostra nas **Figuras 27 e 28**

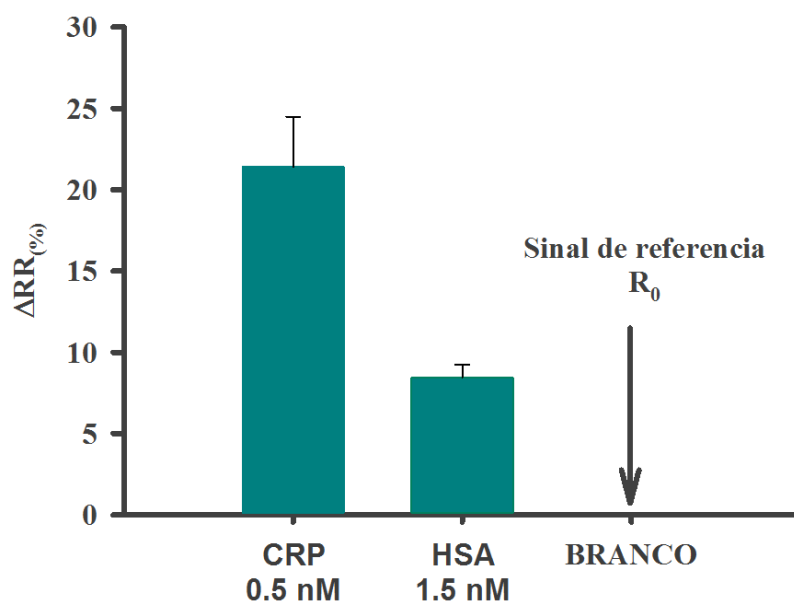


Figura 27: Gráfico de barras, estabelecendo a diferença de $\Delta RR(\%)$ do sensor para a interação específica do par antígeno/anticorpo CRP, a uma concentração 0.5nM de alvo (antígeno CRP) comparada com $\Delta RR(\%)$ do sensor para a interação antígeno CRP-controlado negativo, a uma concentração 1.5 nM do controle negativo (triplo da concentração de alvo). O controle negativo foi realizado com a proteína HSA.

A **Figura 27** nos permite observar que a $\Delta RR(\%)$ do sensor para o analito de interesse (proteína C-reativa), foi mais do que o dobro quando comparada com a $\Delta RR(\%)$ ao triplo da concentração do controle negativo (HSA). Esta diferença de resposta pode ser tomada como um indicativo da utilidade do sistema testado como superfície de biossensoriamento para amostras complexas.

A continuação se mostra a comparação da resposta do sistema funcionalizado com o anticorpo NS1 diante do alvo (antígeno NS1), comparado com a resposta do mesmo sistema diante de uma proteína inespecífica e abundante no soro sanguíneo como é a proteína HSA.

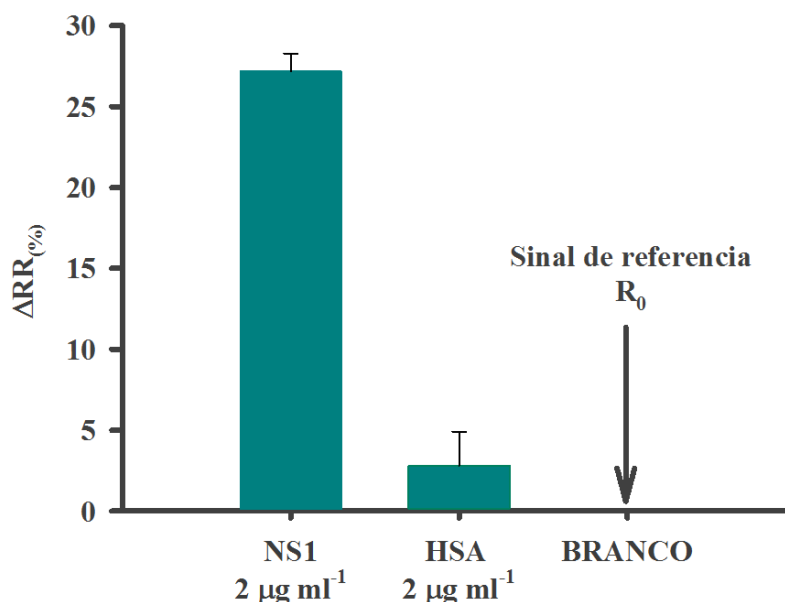


Figura 28: Gráfico de barras, estabelecendo a diferença de $\Delta RR(\%)$ do sensor para a interação específica do par antígeno-anticorpo NS1, a uma concentração $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ de alvo (antígeno NS1) comparada com $\Delta RR(\%)$ do sensor para a interação antígeno NS1-controle negativo na mesma concentração $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ do alvo. O controle negativo foi realizado com a proteína HSA

A diferença de sinal observada entre a máxima concentração de antígeno NS1 testada, comparada com o sinal detectado para a proteína HSA testada na mesma concentração do analito, mostrou especificidade do sistema para a detecção do antígeno NS1, já que o sinal de resposta diante do alvo foi mais de 5 vezes maior do que o sinal observado para a proteína inespecífica.

4.4.3. ENSAIOS DE RESPOSTA DA SAM DIANTE DAS INTERAÇÕES ANTÍGENO-ANTICORPO

4.4.3.1. PAR CRP

O ensaio de interação específica do par CRP foi realizado de acordo com o procedimento descrito na secção 3.2.2.4.1, para verificar a resposta do sistema diante a interação antígeno-

anticorpo de um par proteico já utilizado com sucesso em sistemas impedimétricos e capacitivos. A resposta do sistema pode se observar através dos gráficos de Nyquist e Bode na **Figura 29**.

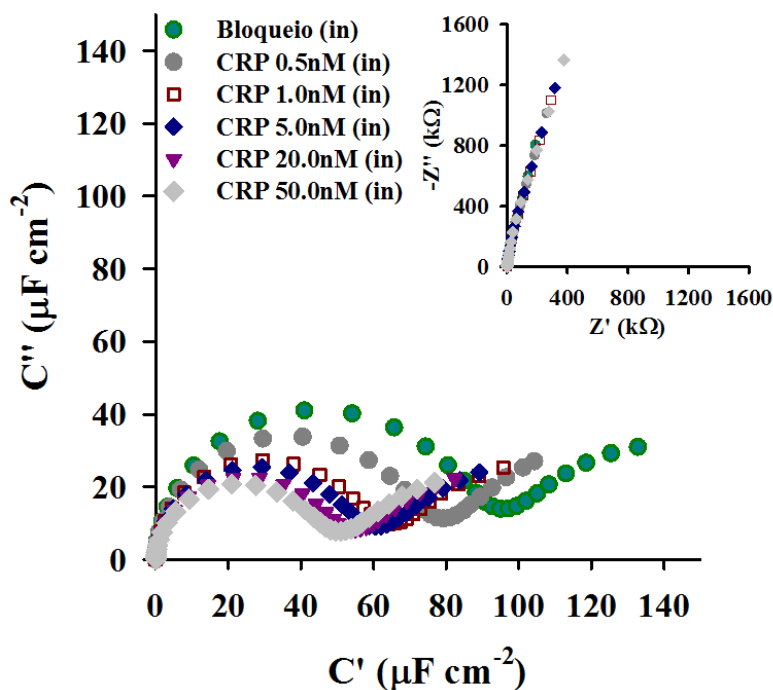


Figura 29: Curvas de Nyquist: Capacitância e Impedância (acima). Incubação em 5 diluições de proteína C-reativa, diluída em PBS pH 7.4. Pode se observar o decaimento da capacitância redox desde $\sim 90 \mu\text{F cm}^{-2}$ após o bloqueio até $\sim 50 \mu\text{F cm}^{-2}$ após da incubação com a menor concentração de antígeno, o que sugere que o sensor tem sensibilidade de resposta dentro da faixa de concentrações de proteína adicionada. Medidas realizadas em solução 20 mM de TBAClO₄ dissolvido em acetonitrila e água deionizada (Milli-Q) (20:80 v/v) como eletrólito de suporte entre as faixas de frequência de 0.01 Hz a 1.0 MHz.

Como pode se observar pelo decaimento da capacitância redox, desde a etapa do bloqueio com etanolamina ($\sim 90 \mu\text{F cm}^{-2}$) até a última concentração de proteína C-reativa, ensaiada ($\sim 50 \mu\text{F cm}^{-2}$), a resposta do sensor para o par antígeno-anticorpo CRP, demonstrou sensibilidade dentro da faixa de concentrações de antígeno ensaiada. No entanto, para confirmar a correlação entre a resposta do sensor e as concentrações de proteína testadas, se realizou uma regressão linear simples (**Figura 30**), realizando a transformação logarítmica dos dados de concentração de antígeno e calculando a variação da resposta relativa ($\Delta RR_{(\%)}$), a partir da resposta capacitiva. Também foi realizada uma comparação mediante regressão linear da resposta da plataforma diante o par CRP

contra a resposta da plataforma frente à interação do anticorpo CRP com a proteína HSA. Os resultados desta comparação podem se observar na **Figura 31**.

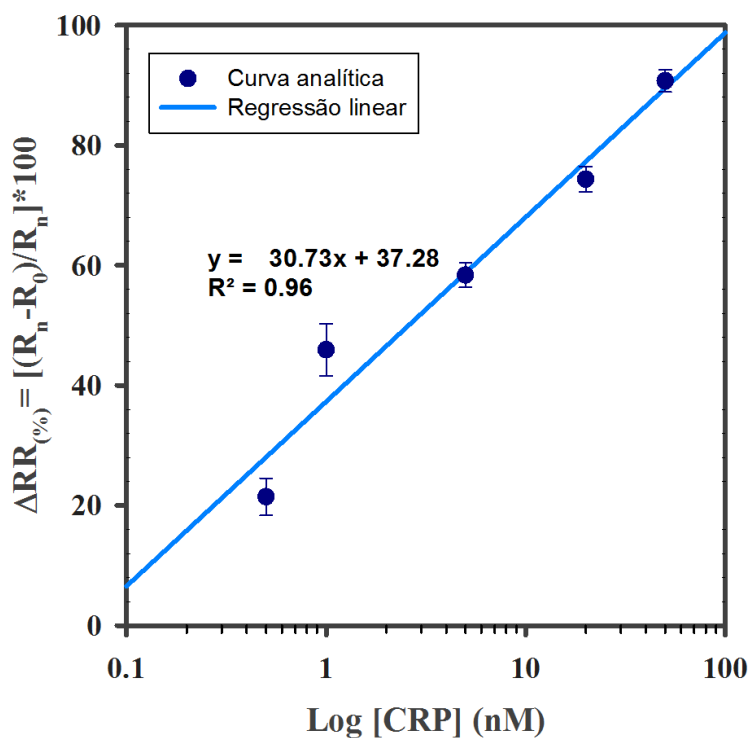


Figura 30: Curva de regressão linear simples, mostrando a relação entre o logaritmo da concentração de analito (antígeno CRP), e a $\Delta RR_{(\%)}$ do sensor. O coeficiente de determinação da reta (R^2) foi de 0.96, confirmando a correlação linear entre a concentração de analito e a variação da resposta relativa do sensor ($\Delta RR_{(\%)}$).

O resultado obtido da regressão linear ($R^2=0.96$) neste ensaio evidenciou uma correlação linear aceitável entre a concentração do analito (antígeno da proteína C-reativa) e a $\Delta RR_{(\%)}$, que era o comportamento esperado. Além do mais, os desvios padrões relativos calculados para cada medida foram bastante menores que a variação observada entre medidas.

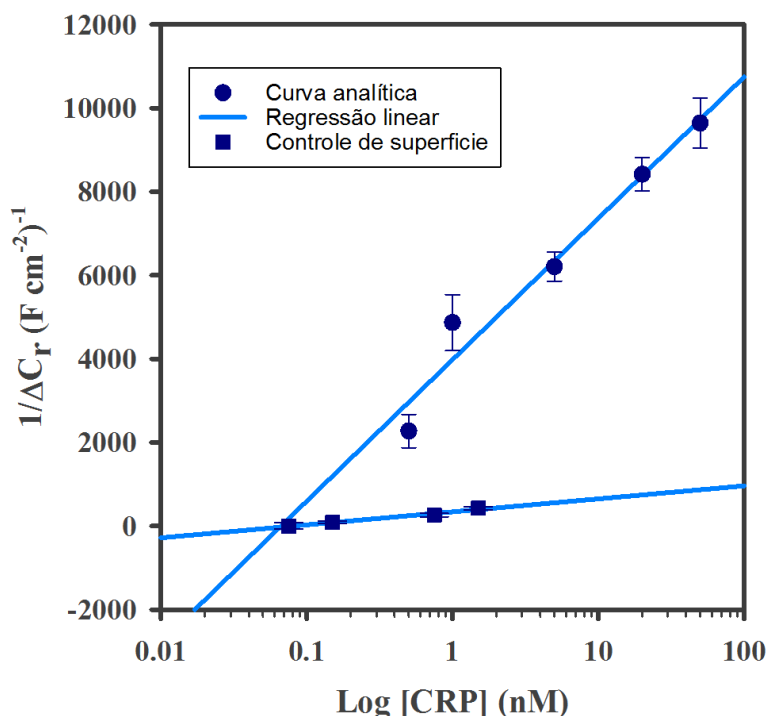


Figura 31: Curva analítica obtida a partir da curva de Nyquist para dados de capacitância para a proteína C-reativa. A resposta linear é obtida traçando o inverso da variação da capacitância redox média (definida como ΔC_r ou ΔC_{μ}), calculada da seguinte forma: $1/\Delta C_r = (1/C_{r_n}) - (1/C_{r_0})$, onde $1/C_{r_n}$ é o inverso da capacitância redox média do biossensor depois de exposto à solução proteica, e $1/C_{r_0}$ é o inverso da capacitância redox média do biossensor depois de exposto ao branco ou bloqueio), contra o logaritmo da concentração de CRP. O ajuste da regressão linear foi de 96%.

Os resultados observados nas **Figuras 29 a 31**, demonstram que o biossensor foi responsivo diante a interação antígeno-anticorpo para o par CRP, e não responsivo diante da proteína HSA, apresentando sensibilidade e especificidade, diante as proteínas testadas.

4.4.3.2. PAR NS1

O ensaio de interação específica do par NS1 foi realizado de acordo com o procedimento descrito na secção 3.2.2.4.2, para verificar a resposta do sistema diante da interação antígeno-anticorpo do par proteico de interesse. A resposta do sistema pode se observar através dos gráficos de Nyquist na **Figura 32**.

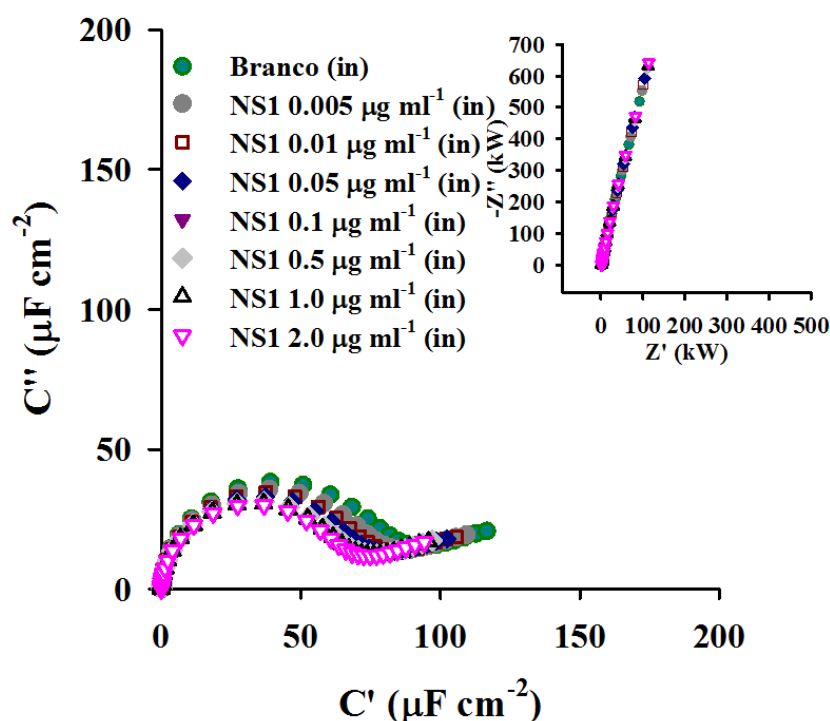


Figura 32: Curvas de Nyquist para a proteína NS1: Capacitância e Impedância (acima). Incubação em 7 diluições de proteína NS1, diluída em PBS pH 7.4. Pode se observar o decaimento da capacitância redox desde $\sim 90 \mu\text{F cm}^{-2}$ após incubação com branco até, $\sim 70 \mu\text{F cm}^{-2}$ após da incubação com a menor concentração de antígeno, o que sugere que o sensor tem sensibilidade de resposta dentro da faixa de concentrações de proteína adicionada. Medidas realizadas em solução 20 mM de TBAClO4 dissolvido em acetonitrila e água deionizada (Milli-Q) (20:80 v/v) como eletrólito de suporte entre as faixas de frequência de 0.01 Hz a 1.0 MHz.

Existiu uma variação da capacitância redox entre o branco e as diferentes concentrações de antígeno NS1 testadas, demonstrando sensibilidade do sensor diante as interações antígeno-anticorpo para o par de interesse, no entanto, a resposta gráfica, através das curvas de Nyquist, não foi tão evidente quanto à resposta obtida para o par CRP. No entanto a análise de regressão linear e a comparação com o controle de superfície parecem indicar uma correlação positiva entre a resposta do sensor e concentração do alvo NS1 (**Figura 33**).

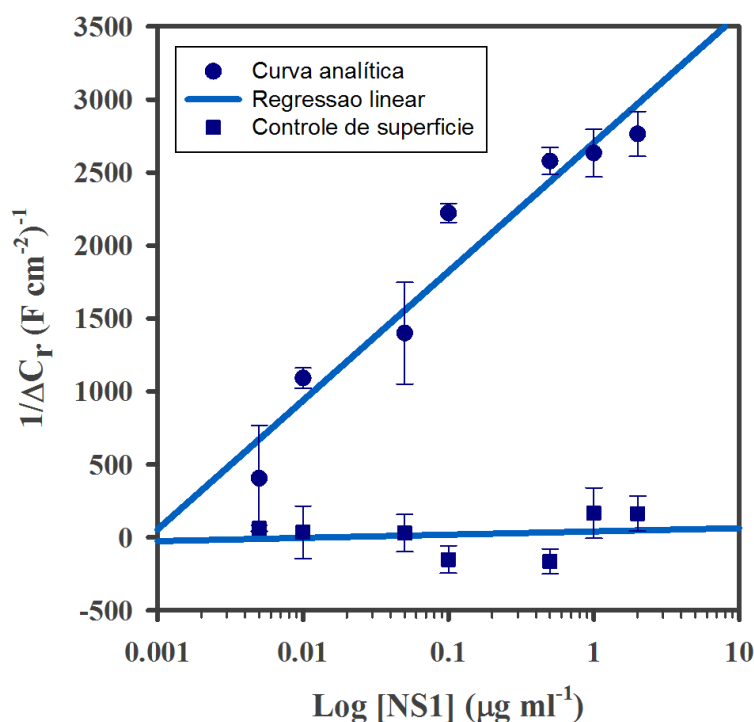


Figura 33: Curva analítica obtida a partir da curva de Nyquist para dados de capacitância. A resposta linear é obtida traçando o inverso da variação da capacitância redox média (definida como ΔC_r ou ΔC_{μ}), calculada da seguinte forma: $1/\Delta C_r = (1/C_{r_n}) - (1/C_{r_0})$, onde $1/C_{r_n}$ é o inverso da capacitância redox média do biossensor depois de exposto à solução proteica, e $1/C_{r_0}$ é o inverso da capacitância redox média do biossensor depois de exposto ao branco ou bloqueio), contra o logaritmo da concentração de CRP. O ajuste da regressão linear foi de 93%.

O ajuste de regressão linear (93%) para a curva de calibração da proteína NS1 no sensor, mostrando uma correlação linear direta entre o sinal medido no sensor e a concentração do alvo, o que se corrobora ao comparar dita curva com o controle de superfície obtido mediante incubação de diferentes concentrações de proteína HSA no sensor imobilizado com anticorpo NS1. Dito ajuste foi aceitável, porém menor que o obtido por Ceccheto (2014) em ensaios de EIE (97%) e ECE (98%), utilizando biossensores confeccionados com SAMs de alcanotiois para detectar a proteína NS1.

A variação da resposta relativa do sensor ($\Delta RR_{(\%)}$) diante as diferentes concentrações de proteína NS1 pode se ver na **Figura 34**:

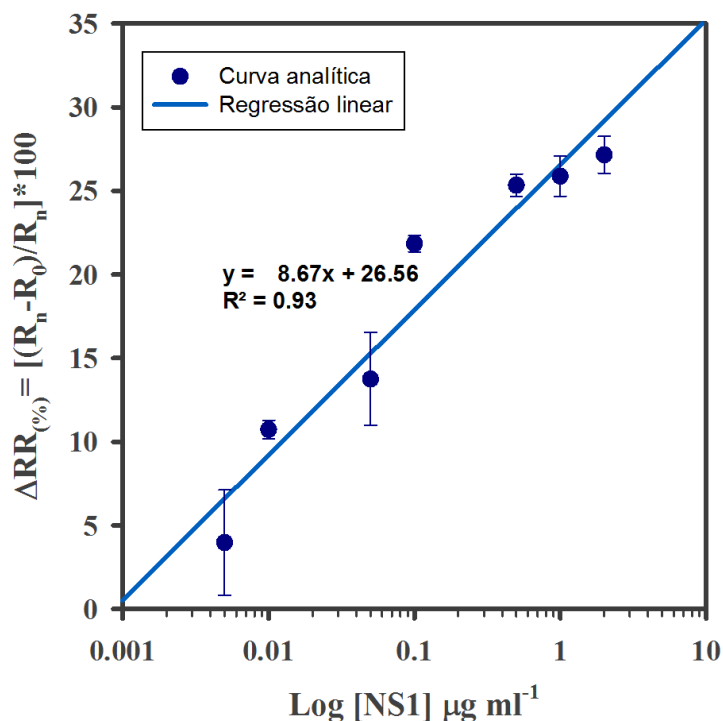


Figura 34: Curva de regressão linear simples, amostrando a relação entre o logaritmo da concentração de analito (antígeno NS1), e a $\Delta RR(\%)$ do sensor. O coeficiente de determinação da reta (R^2) foi de 0.93, confirmando a correlação linear entre a concentração de analito e a variação da resposta relativa do sensor ($\Delta RR(\%)$).

Mesmo a resposta não sendo a esperada, o biossensor foi sensível diante as interações antígeno-anticorpo do par NS1. Além do mais, a comparação de resposta do par NS1 respeito do controle de superfície realizado funcionalizando o biossensor com o anticorpo NS1 e ensaiando diferentes concentrações de proteína HSA, demonstrou que o biossensor é também seletivo, o que pode se atribuir à capacidade da SAM peptídica de formar camadas de solvatação anti-incrustantes, assim como também ao fato que os anticorpos testados não apresentam interações inespecíficas com outras proteínas como é o caso da HSA.

5. CONCLUSÃO

Foi obtido um peptídeo com características redox e capacidade de formação de SAM sobre a superfície do ouro, ou seja, com as características necessárias à aplicação analítica visada neste trabalho. Estas características foram confirmadas através da caracterização do mencionado peptídeo por técnicas como VC e ECE. Adicionalmente, aplicando-se técnicas como a varredura de potencial foi possível demonstrar que as monocamadas formadas pelo peptídeo redox possuem

densidade molecular superficial comparável com a de monocamadas automontadas confeccionadas com outros peptídeos já reportadas na literatura. O peptídeo é apropriado para imobilização de anticorpo e, portanto, por todas as características mencionadas, as monocamadas automontadas formadas com ele são potencialmente úteis no desenvolvimento de biossensores capacitivos eletroquímicos. Adicionalmente se testou a estabilidade da SAM, simulando o tempo e o número de medidas de analito a serem realizadas durante a execução de uma verdadeira curva analítica com proteína e se observou que durante esse tempo e com um número similar de repetições de branco, a monocamada peptídica mostrou mínimas mudanças do sinal relativo e sem um padrão de tendência, o que sugere a estabilidade dela durante o tempo requerido para a realização de um experimento.

Por outro lado, o sistema de biossensoramento mostrou sensibilidade estatisticamente significativa diante das interações antígeno anticorpo, utilizando dois pares proteicos. Ele também mostrou especificidade ao não apresentar resposta significativa diante de incubações com diferentes concentrações de uma proteína inespecífica. No entanto, para a obtenção de uma plataforma capacitiva útil para a realização de análises em amostras clínicas, é necessário realizar outros tipos de ensaios que incluem: ensaios de especificidade da plataforma diante de outras proteínas como a proteína NS1 proveniente de outros flavivirus diferentes do DENV; ensaios da proteína diluída em soro negativo e ainda a possibilidade de ensaiar outro tipo de bioreceptores além dos anticorpos, como por exemplo aptâmeros para poder melhorar a interação do alvo com a plataforma de biossensoramento. Também é recomendável realizar um maior número de repetições dos experimentos que possam garantir a repetibilidade e a obtenção de curvas de calibração com maior significância estatística.

6. REFERÊNCIAS

- ANGEL, R.; VALLE, J. Dengue Vaccines: Strongly Sought but Not a Reality Just Yet. *PLoS Pathogens*, v. 9, n. 10, p. e1003551, 2013.
- BAINES, I.; COLAS, P. Peptide aptamers as guides for small-molecule drug discovery. *Drug Discovery Today*, v. 11, n. 7-8, p. 334-341, 2006.
- BEDATTY FERNANDES, F. et al. Optimized Diagnostic Assays Based on Redox Tagged Bioreceptive Interfaces. *Analytical Chemistry*, v. 87, n. 24, p. 12137-12144, 2015.

- BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*, v. 496, n. 7446, p. 504-507, 2013.
- BRAULT, N. et al. Ultra-low fouling and functionalizable zwitterionic coatings grafted onto SiO₂ via a biomimetic adhesive group for sensing and detection in complex media. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 25, n. 10, p. 2276-2282, 2010.
- BUENO, P. et al. A Facile Measurement of Heterogeneous Electron Transfer Kinetics. *Analytical Chemistry*, v. 85, n. 22, p. 10920-10926, 2013.
- BUENO, P.; MIZZON, G.; DAVIS, J. Capacitance Spectroscopy: A Versatile Approach To Resolving the Redox Density of States and Kinetics in Redox-Active Self-Assembled Monolayers. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 116, n. 30, p. 8822-8829, 2012.
- CASTRO-JORGE, L. et al. Clinical evaluation of the NS1 antigen-capture ELISA for early diagnosis of dengue virus infection in Brazil. *Journal of Medical Virology*, v. 82, n. 8, p. 1400-1405, 2010.
- CAVALCANTI, I. et al. A disposable chitosan-modified carbon fiber electrode for dengue virus envelope protein detection. *Talanta*, v. 91, p. 41-46, 2012.
- CECCHETTO, J. DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DIAGNÓSTICO DE DENGUE. [s.l.] Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 2014.
- CECCHETTO, J. et al. An impedimetric biosensor to test neat serum for dengue diagnosis. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 213, p. 150-154, 2015.
- CECCHETTO, J. et al. The capacitive sensing of NS1 Flavivirus biomarker. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 87, p. 949-956, 2017.
- CILLI, E. et al. Reações de clivagem ácida de aminoácidos e peptídeos ligados a polímeros: relevância para a metodologia de síntese de peptídeo. *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4*, p. 175-196, 2017.
- COLAS, P. The eleven-year switch of peptide aptamers. *Journal of Biology*, v. 7, n. 1, p. 2, 2008.
- DARWISH, N.; ALIAS, Y.; KHOR, S. An introduction to dengue-disease diagnostics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 67, p. 45-55, 2015.
- DEIMANTAVIČIŪTĖ, E. Characterization of Antibody Interaction Using Surface Plasmon Resonance for the Application in Nanoparticle-Based Immunoassays. [s.l.] Aalborg University, 2017.

- ECKERMAN, A. et al. Electrochemistry of redox-active self-assembled monolayers. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 254, n. 15-16, p. 1769-1802, 2010.
- FERNANDES, F. et al. Comparing label free electrochemical impedimetric and capacitive biosensing architectures. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 57, p. 96-102, 2014.
- FRY, S. et al. The Diagnostic Sensitivity of Dengue Rapid Test Assays Is Significantly Enhanced by Using a Combined Antigen and Antibody Testing Approach. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 6, p. e1199, 2011.
- GRIESHABER, D. et al. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors*, v. 8, n. 12, p. 1400-1458, 2008.
- GUBLER, D. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.
- HARRIS, A. et al. Successful suppression of a field mosquito population by sustained release of engineered male mosquitoes. *Nature Biotechnology*, v. 30, n. 9, p. 828-830, 2012.
- KAISER, E. et al. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Analytical Biochemistry*, v. 34, n. 2, p. 595-598, 1970.
- KAO, C. et al. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. *Journal of microbiology, immunology, and infection*, v. 38, p. 5-16, 2005.
- KHALIL, I. et al. Graphene–Gold Nanoparticles Hybrid—Synthesis, Functionalization, and Application in a Electrochemical and Surface-Enhanced Raman Scattering Biosensor. *Materials*, v. 9, n. 12, p. 406, 2016.
- KITTIGUL, L.; SUANKEOW, K. Use of a Rapid Immunochromatographic Test for Early Diagnosis of Dengue Virus Infection. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 21, n. 3, p. 224-226, 2002.
- LE, M. et al. A Label-Free Impedimetric DNA Sensor Based on a Nanoporous SnO₂ Film: Fabrication and Detection Performance. *Sensors*, v. 15, n. 12, p. 10686-10704, 2015.
- LI, J. et al. Peptide Aptamers with Biological and Therapeutic Applications. *Current Medicinal Chemistry*, v. 18, n. 27, p. 4215-4222, 2011.
- LORENZÓN, E. Efeitos da dimerização na estrutura e atividade biológica dos peptídeos antimicrobianos Aureína 1.2 e Magainina 2. [s.l.] Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2015.
- LOWE, C. Biosensors. *Trends in Biotechnology*, v. 2, n. 3, p. 59-65, 1984.

- LUO, X.; DAVIS, J. Electrical biosensors and the label free detection of protein disease biomarkers. *Chemical Society Reviews*, v. 42, n. 13, p. 5944, 2013.
- MERRIFIELD, R. Solid-Phase Peptide Synthesis. III. An Improved Synthesis of Bradykinin*. *Biochemistry*, v. 3, n. 9, p. 1385-1390, 1964.
- MULLER, D.; YOUNG, P. The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Research*, v. 98, n. 2, p. 192-208, 2013.
- MUSTAFA, M. et al. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical Journal Armed Forces India*, v. 71, n. 1, p. 67-70, 2015.
- PARKASH, O.; SHUEB, R. Diagnosis of Dengue Infection Using Conventional and Biosensor Based Techniques. *Viruses*, v. 7, n. 12, p. 5410-5427, 2015.
- PEELING, R. et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, n. 12, p. S30-S37, 2010.
- PERUMAL, V.; HASHIM, U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *Journal of Applied Biomedicine*, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2014.
- PICCOLI, J. Desenvolvimento de Biossensores Capacitivos Constituídos de Monocamadas Peptídicas Nanometricamente Estruturadas. [s.l.] Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 2015.
- PICCOLI, J. et al. The self-assembly of redox active peptides: Synthesis and electrochemical capacitive behavior. *Biopolymers*, v. 106, n. 3, p. 357-367, 2016.
- RUSSELL, P.; HALSTEAD, S. Challenges to the Design of Clinical Trials for Live-Attenuated Tetravalent Dengue Vaccines. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 8, p. e0004854, 2016.
- SANTOS, A.; BUENO, P. Glycoprotein assay based on the optimized immittance signal of a redox tagged and lectin-based receptive interface. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 83, p. 368-378, 2016.
- SANTOS, A.; DAVIS, J.; BUENO, P. Fundamentals and Applications of Impedimetric and Redox Capacitive Biosensors. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, v. S7, n. 012, 2014.
- SANTOS, A. et al. Redox-tagged peptide for capacitive diagnostic assays. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 68, p. 281-287, 2015.
- SHU, P.; HUANG, J. Current Advances in Dengue Diagnosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 11, n. 4, p. 642-650, 2004.

- SUGIO, S. et al. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Engineering, Design and Selection*, v. 12, n. 6, p. 439-446, 1999.
- TRASATTI, S.; PETRII, O. Real surface area measurements in electrochemistry. *Pure and Applied Chemistry*, v. 63, n. 5, 1991
- ULMAN, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chemical Reviews*, v. 96, n. 4, p. 1533-1554, 1996.
- WANG, G. et al. Zwitterionic peptide anchored to conducting polymer PEDOT for the development of antifouling and ultrasensitive electrochemical DNA sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 92, p. 396-401, 2017.
- WHO. Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020. France: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em: 14 jan. 2018.
- WHO. International travel and health: situation as on 1 January 2012. Geneva: [s.n.]. . Acesso em: 6 jan. 2018.