ADRIANO DOS SANTOS

Desenvolvimento de biossensor impedimétrico/capacitivo para detecção de biomarcadores de importância clínica

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

Orientador: Dr. Paulo Roberto Bueno
Co-orientadora: Dra. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor

Araraquara
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Adriano dos
S237d Desenvolvimento de biossensor impedimétrico/capacitivo para detecção de biomarcadores de importância clínica / Adriano dos Santos. – Araraquara : [s.n.], 2017
157 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Paulo Roberto Bueno
Coorientador: Maria Del Pilar Taboada Sotomayor

1. Biossensores. 2. Análise eletroquímica. 3. Espectroscopia de impedância. 4. Marcadores bioquímicos. 5. Lectinas. I. Título.

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

ADRIANO DOS SANTOS

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

Araraquara, 24 de março de 2017.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP

Prof. Dr. Hideko Yamanaka
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP

Prof. Dr. Emanuel Carrilho
Instituto de Química – USP, São Carlos - SP

Prof. Dr. Marcelo Mulato
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – USP, Ribeirão Preto - SP

Profª Drª Mauro Bertotti
Instituto de Química – USP, São Paulo - SP

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Adriano dos Santos
Nome em citações bibliográficas: A. dos Santos, A. Santos, Adriano dos Santos, Adriano Santos.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Unesp-Instituto de Química, Departamento de Físico-Química
Rua Prof. Francisco Degni, 55, Bairro Quitandinha
CEP: 14800-060, Araraquara, São Paulo, Brasil

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2005-2009. *Graduação em Licenciatura em Química.*
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Instituto de Química, Campus de Araraquara.
Relatório de Estágio Supervisionado: *Relatório referente ao estágio supervisionado realizado na empresa de revestimentos antiaderentes Whitford do Brasil Ltda.*
Orientador: Prof. Dr. Ossamu Hojo

2010-2012. *Mestrado em Química.*
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Instituto de Química, Campus de Araraquara.
Dissertação: *Estudo da afinidade das proteínas rTgMIC1 e rTgMIC4 da Toxoplasma gondii com fetuína e asialofetuína utilizando técnica piezelétrica.*
Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno

Prêmios

2008. Menção Honrosa no XX Congresso de Iniciação Científica da UNESP (Área de Exatas).
2009. Concurso para criação de logotipo e nome fantasia da Agência UNESP de Inovação.
Prêmio Lavoisier, Conselho Regional de Química - IV Região.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

2008-2009. Estágio supervisionado na empresa Whitford do Brasil Ltda (controle da qualidade e pesquisa e desenvolvimento)
2012. Gestor de pesquisa e desenvolvimento na empresa Biocane Química Industrial Ltda

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

1. SANTOS, A.; RIBEIRO, W. C.; BUENO, P. R. **Estudo *in situ* da funcionalização da superfície de ouro para imobilização de proteína**. Eclética Química (UNESP. Araraquara. Impresso), v.39, p.244 - 256, 2016.
2. SANTOS, A.; BUENO, P. R. **Glycoprotein assay based on the optimized immittance signal of a redox tagged and lectin-based receptive interface**. Biosensors and Bioelectronics. Fator de Impacto (2015 JCR): 7,4760, v.83, p.368 - 378, 2016.
3. PICCOLI, J. P.; SANTOS, A. ; SANTOS-FILHO, N. A.; LORENZÓN, E. N.; CILLI, E. M.; BUENO, P. R. **The self-assembly of redox active peptides: synthesis and electrochemical capacitive behavior**. Biopolymers (New York. Print). Fator de Impacto (2015 JCR): 2,2480, v.106, p. 357 - 367, 2016.

4. CECCHETTO, J.; CARVALHO, F. C.; SANTOS, A.; FERNANDES, F. C. B.; BUENO, P. R. **An impedimetric biosensor to test neat serum for dengue diagnosis**. Sensors and Actuators B: Chemical. Fator de Impacto (2015 JCR): 4,7580, v.213, p.150 - 154, 2015.
5. SANTOS, A.; CARVALHO, F. C.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; ZORZETTO-FERNANDES, A. L.; GIMENEZ-ROMERO, D.; MONZÓ, I.; BUENO, P. R. **Evidence for conformational mechanism on the binding of TgMIC4 with β-galactose-containing carbohydrate ligand**. Langmuir. Fator de Impacto (2015 JCR): 3,9930, v.31, p.12111 - 12119, 2015.
6. SANTOS, A.; PICCOLI, J. P.; SANTOS-FILHO, N. A.; CILLI, E. M.; BUENO, P. R. **Redox-tagged peptide for capacitive diagnostic assays**. Biosensors and Bioelectronics. Fator de Impacto (2015 JCR): 7,4760, v.68, p.281 - 287, 2015.
7. MARQUES, S. M.; SANTOS, A.; GONÇALVES, L. M.; SOUSA, J. C.; BUENO, P. R. **Sensitive label-free electron chemical capacitive transducer signal for d-dimer electroanalyses**. Electrochimica Acta. Fator de Impacto (2015 JCR): 4,8030, v.182, p.946-952, 2015.
8. FERNANDES, F. C. B.; SANTOS, A.; MARTINS, D. C.; GÓES, M. S.; BUENO, P. R. **Comparing label free electrochemical impedimetric and capacitive biosensing architectures.** Biosensors and Bioelectronics. Fator de Impacto (2015 JCR): 7,4760, v.57, p.96 - 102, 2014.
9. CARVALHO, F.; MARTINS, D. C.; SANTOS, A.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; BUENO, P. R. **Evaluating the equilibrium association constant between ArtinM lectin and myeloid leukemia cells by impedimetric and piezoelectric label free approaches.** Biosensors, v.4, p.358 - 369, 2014.
10. SANTOS, A.; DAVIS, J.J.; BUENO, P. R.; **Fundamentals and applications of impedimetric and redox capacitive biosensors**. Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques, v.S7, 2014.
11. SANTOS, A.; CARVALHO, F. C.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; BUENO, P.R. **Impedance-derived electrochemical capacitance spectroscopy for the evaluation of lectin-glycoprotein binding affinity**. Biosensors and Bioelectronics. Fator de Impacto (2015 JCR): 7,4760, v.62, p.102 - 105, 2014.
12. SANTOS, A.; SILVA, J. J.; BUENO, P. R.; WATANABE, A. M. **Determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos da adsorção de L-cisteína em ouro por meio da técnica de microbalança a cristal de quartzo**. Química Nova (Impresso). Fator de Impacto (2015 JCR): 0,6170, v.35, p.1365 - 1368, 2012.
13. WATANABE, A. M.; SANTOS, A.; BUENO, P. R. **Harmonical oscillator and electro-mechanical analogy: an interdisciplinary experiment to high precision mass variation measurements.** Eclética Química (UNESP. Araraquara. Impresso), v.34, p.57 - 75, 2009.

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos

1. PICCOLI, JULIA P.; SANTOS, ADRIANO; BUENO, P. R.; CILLI, E.M. **Self-assembled monolayers of redox peptides.** In: 2nd International Conference on Peptide Materials for Biomedicine and Nanotechnology PepMat 2016, 2016, Barcelona, Espanha.
2. PICCOLI, JULIA P.; SANTOS, A.; SANTOS-FILHO, NORIVAL ALVES ; LORENZÓN, ESTEBAN N. ; BUENO, PAULO R. ; CILLI, EDUARDO MAFFUD . **Synthesis and electrochemical behavior os self assembled peptide monolayers**. In: 45ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, 2016, Natal-RN.
3. SANTOS, A.; CARVALHO, F.C.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; BUENO, P.R. **Impedance-derived electrochemical capacitance spectroscopy for the evaluation of lectin-glycoprotein binding affinity**. In: 2nd International Conference on Label-free Technologies, 2015, Boston-MA (EUA).

4. FERNANDES, FLAVIO C. BEDATTY; MARTINS, DENISE C. ; SANTOS, ADRIANO; GÓES, MÁRCIO S. ; BUENO, PAULO R. **Comparing label free electrochemical impedimetric and capacitive biosensing architectures**. In: 2nd International Conference on Label-free Technologies, 2015, Boston-MA (EUA).

5. PICCOLI, J. P.; SANTOS, ADRIANO; SANTOS-FILHO, N. A.; LORENZON, E. N.; BUENO, P. R., CILLI, E.M. **Self-assembled peptide monolayer**: synthesis and electrochemical behavior in biosensor. In: Latin American Postgraduate Program of Biophysics, 2015, Salto (Uruguai).

6. PICCOLI, J. P.; SANTOS-FILHO, N. A.; LORENZÓN, E. N.; SANTOS, A.; BUENO, P. R.; CILLI, E.M. **Self-assembled peptides monolayers in capacitive biosensors**. In: 24th America Peptide Symposium, 2015, Orlando (EUA).

7. PICCOLI, J.P.; SANTOS-FILHO, N. A.; LORENZÓN, E. N.; SANTOS, A.; FERNANDES, F. C. B., BUENO, P. R.; CILLI, E. M. **Ferrocene-Peptides**: a new approach for self-assembled monolayer. In: 33rd European Peptide Symposium, 2014, Sofia (Bulgária).

8. SANTOS, F. C.; SANTOS, A.; BUENO, P. R. **Application of the technique of the quartz crystal microbalance for real-time study of the influence of pH and inhibition of kinetics enzymatic.** In: 7th International Symposium on Advanced Materials and Nanostructures, 2012, Sorocaba-SP.

9. LEGENDRE, A. O.; SANTOS, A.; CUNHA, G. A.; CASTELLANO, E. E.; MAURO, A. E. **Estrutura tridimensional de um polímero de cobre(II) gerada pela coordenação em ponte de um dicarboxilato em forma de V.** In: III Encontro Capixaba de Química, 2011, Vitória-ES.

10. SANTOS, A.; BUENO, P. R.; PINZAN, C. F.; BARREIRA, M. C. R. **Piezoelectric biosensor applied to the study of lectin-carbohydrate interaction**. In: International Conference Nanoscale Materials and Devices for Energy Conversion, Storage and Biosensors, 2011, Natal-RN.

11. SANTOS, ADRIANO DOS; WATANABE, AILTON MASSAITI; BUENO, PAULO ROBERTO. **Caracterização de monocamada automontada utilizando técnica eletrogravimétrica com fator dissipativo.** In. XXI Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2009, São José do Rio Preto-SP.

12. LEGENDRE, A. O.; SANTOS, A.; CUNHA, G. A.; NOGUEIRA, V. M.; CASTELLANO, E. E.; MAURO, A. E. **Estrutura tridimensional de um polímero de cobre(II) gerada pela coordenação em ponte de um carboxilato em forma de V**. In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia-SP.

13. LEGENDRE, A. O.; CORRÊA, J. R. A.; SANTOS, A.; CUNHA, G. A.; MATOS, J. R. **Synthesis and thermal behavior of copper(II) coordination polymers containing bridging diamine and pseudohalide ligands**. In: 14th International Congress on Thermal Analysis and Calorimetry, 2008, São Pedro-SP.

14. SANTOS, ADRIANO DOS; LEGENDRE, A. O.;MAURO, A.E. **Dois novos cianometalatos complexos de cobre(II) e seus comportamentos vapocrômicos frente ao vapor de amônia**. In. XX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2008, São José dos Campos-SP.

15. SANTOS, A.; LEGENDRE, A. O.; MAURO, A. E. **Estruturas poliméricas heterobimetálicas de cobre(II) contendo grupos cianometalatos e N,N-dietiletilenodiamina**. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia-SP.

16. LEGENDRE, A. O.; CORRÊA, J. R. A.; SANTOS, A.; MAURO, A. E. **Sensor vapocrômico para detecção de amônia utilizando um polímero de coordenação de cobre(II)**. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia-SP.

17. SANTOS, A.; MAURO, A. E.; LEGENDRE, A. O. **Polímeros de coordenação de cobre(II) contendo grupos cianometalatos e N,N-dietiletilenodiamina**. In: XIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2007, Presidente Prudente-SP.

18. CUNHA, G. A.; MAURO, A. E.; SANTOS, A. **Síntese mecanoquímica de um composto supramolecular de cobre(II) com isonicotinamida**. In: XIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2007, Presidente Prudente-SP.
19. SANTOS, A.; MAURO, A. E.; LEGENDRE, A. O. **Pseudo-haletos complexos de cobre(II) contendo 4-aminopiridina como ligante**: síntese e caracterização. In: XVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2006, Bauru-SP.

Apresentação de trabalho

1. SANTOS, A.; CARVALHO, F.C.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; BUENO, P.R. **Impedance-derived electrochemical capacitance spectroscopy for the evaluation of lectin-glycoprotein binding affinity**. In. 2nd International Conference on Label-free Technologies, 2015, Boston-MA (EUA).
2. SANTOS, A.; BUENO, P. R.; PINZAN, C. F.; BARREIRA, M. C. R. **Piezoelectric biosensor applied to the study of lectin-carbohydrate interaction**. In. International Conference Nanoscale Materials and Devices for Energy Conversion, Storage and Biosensors, 2011, Natal-RN.
3. SANTOS, ADRIANO DOS; WATANABE, AILTON MASSAITI; BUENO, PAULO ROBERTO. **Caracterização de monocamada automontada utilizando técnica eletrogravimétrica com fator dissipativo.** In. XXI Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2009, São José do Rio Preto.
4. SANTOS, ADRIANO DOS; LEGENDRE, A. O.;MAURO, A.E. **Dois novos cianometalatos complexos de cobre(II) e seus comportamentos vapocrômicos frente ao vapor de amônia**. In. XX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2008, São José dos Campos-SP.
5. SANTOS, A.; LEGENDRE, A. O.; MAURO, A. E. **Estruturas poliméricas heterobimetálicas de cobre(II) contendo grupos cianometalatos e N,N-dietiletilenodiamina**. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia-SP.
6. SANTOS, A.; MAURO, A. E.; LEGENDRE, A. O. **Polímeros de coordenação de cobre(II) contendo grupos cianometalatos e N,N-dietiletilenodiamina**. In: XIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2007, Presidente Prudente-SP.
7. SANTOS, A.; MAURO, A. E.; LEGENDRE, A. O. **Pseudo-haletos complexos de cobre(II) contendo 4-aminopiridina como ligante. Síntese e caracterização**. In: XVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2006, Bauru-SP.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

1. 2nd International Conference on Label-free Technologies. Boston-MA (EUA), 2015.
2. International Conference Nanoscale Materials and Devices for Energy Conversion, Storage and Biosensors. Natal-Rio Grande do Norte (Brasil), 2011.
3. XX Congresso de Iniciação Científica da UNESP. São José dos Campos-SP (Brasil), 2008.
4. XXXVIII Semana da Química (UNESP-Instituto de Química). Araraquara-SP (Brasil), 2008.
5. 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia-SP (Brasil), 2007.
6. XIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP. Presidente Prudente-SP (Brasil), 2007.
7. V Evento em educação em química (UNESP-Instituto de Química). Araraquara-SP (Brasil), 2007.
8. XXXVII Semana da Química (UNESP-Instituto de Química). Araraquara-SP (Brasil), 2007.
9. XVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP. Bauru-SP (Brasil), 2006.
10. IV Evento em educação em química (UNESP-Instituto de Química). Araraquara-SP (Brasil), 2006.
11. XXXVI Semana da química (UNESP-Instituto de Química). Araraquara-SP (Brasil), 2006.

12. III Evento em educação em química (UNESP-Instituto de Química). Araraquara-SP (Brasil), 2005.
13. XXXV Semana da Química (UNESP-Instituto de Química). Araraquara-SP (Brasil), 2005.

OUTRAS INFORMAÇÕES

Bolsista didático nas seguintes disciplinas

1. Laboratório de Física I (Engenharia Química - 4 horas/semana) no primeiro semestre de 2014.
2. Laboratório de Física I (Engenharia de Bioprocessos - 4 horas/semana) no primeiro semestre de 2014.
3. Física Experimental I (Bacharelado em Química - 4 horas/semana) no segundo semestre de 2014.
4. Física IV (Bacharelado em Química - 2 horas/semana) no segundo semestre de 2014.

Estágio no exterior

University of Oxford
Physical and theoretical chemistry laboratory (PTCL)
South Parks Road, Oxford OX1 3QZ, Oxford – UK
Orientador: Prof. Dr. Jason J. Davis
Período: 30/08/2016 – 23/02/2017

A Deus, pelo crescimento e
à minha família pelo apoio e carinho incondicionais.
À Fabiana P. R. Mota,
pelo companheirismo e suporte nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo R. Bueno pela oportunidade oferecida, bem como pela valiosa orientação, apoio e amizade dedicados durante o meu doutoramento, que me fortaleceram tanto pessoalmente como profissionalmente.

À Profa. Dra. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor pela ajuda e auxílio incondicionais, sempre presente durante o meu doutoramento.

Ao Prof. Dr. Jason J. Davis, da Universidade de Oxford, por ter dedicado seis meses de orientação à minha pesquisa na Inglaterra (estágio). Uma experiência profissional inesquecível e repleta de novos saberes e amigos.

Ao Prof. Dr. Gustavo T. Feliciano pelos diálogos e saudáveis discussões no campo da ciência, em especial no campo da simulação molecular na tentativa de interpretar os sistemas eletroquímicos.

Ao Prof. Dr. Eduardo M. Cilli, pela parceria, conversas e suporte incondicional muito valioso no transcorrer desse projeto.

À Dra. Fernanda Carvalho, cuja participação em nosso grupo de pesquisa como pós-doutoranda foi muito valiosa devido à troca de ideias e saberes, essenciais ao meu projeto envolvendo o estudo da interação entre glicoproteína e lectina.

À Rose, administradora do LIEC, pela amizade e ágil apoio nas questões técnicas e burocráticas que surgiram no transcorrer do trabalho, essenciais e necessárias para o andamento de qualquer processo vinculado à pesquisa.

Aos meus amigos Beatriz, Flávio, Juliana Cecchetto, Juliana Andrade, Júlia Picolli, Inácio, Melany, Raphael, Rute, Tiago, Verónica, Welder e a todos os integrantes do LIEC pela amizade, auxílio e compartilhamento de todos os momentos, bons e ruins, que, sem dúvida, fizeram a diferença em vários momentos de minha caminhada.

A todos os amigos do Instituto de Química - Campus de Araraquara, desde o corpo docente, profissionais das diversas áreas, até o corpo discente; que ofereceram, de forma implícita, estimado auxílio no transcorrer de toda minha formação.

Ao CNPq (processo 141058/2013-7), FAPESP e CAPES pelo suporte financeiro.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

O que é ciência?

Embora possa ser uma simples pergunta, hesito afirmar que se possa dizer o mesmo da resposta. Sobretudo, ao chegar ao final de aproximadamente onze anos de estudos em Química, é fundamental que eu tenha uma ideia, e que seja uma ao menos confortável. Penso que eu não estou sozinho nessa indagação, e que os meus colegas pesquisadores que frequentemente encontro nos corredores do instituto também caminharam, a passos largos ou auspiciosos, fatalmente a esse destino. Sempre nos perguntamos, voltados ao nosso problema, o que acontece dentro de nossas "caixas pretas", de nossos "quebra-cabeças", muitas vezes duvidosos, outras mais assertivos, mas indubitavelmente esperançosos em encontrar respostas; e nos esquecemos, talvez, da principal pergunta da qual emana os mais variados conhecimentos humanos: afinal, *o que é a ciência*? E consequentemente, *para que*? Talvez essa seja apenas uma pergunta existencial daquele que está prestes a finalizar mais um passo de uma longa e sinuosa jornada até o topo da colina, na tentativa de encontrar sentido onde provavelmente não haja; ou talvez seja uma pergunta coerente que obrigatoriamente deva ser respondida por aquele(a) que traça seu destinos na ciência, seja como pesquisador(a) ou professor(a). Esperançosamente, desejo que a segunda opção seja a *mais* correta, dentro das limitações que ainda carrego no meu caminhar.

Será ciência o poder da explicação sobre algo dominável, perscrutável?[a] Desde o comportamento dos gregos antigos, em utilizarem "da ciência" como fonte de contemplação da natureza (talvez como poetas que enxergavam o mundo), até às ideias modernas de Francis Bacon, classificando-a como instrumento do qual o homem pode ditar diretrizes à natureza e dela tomar proveito para si mesmo, existe um turbilhão de ideias a este respeito. Entretanto, no final de tudo isso o que resulta são nossas percepções como cientistas, como atores da pesquisa, e provavelmente existirão tantas definições quanto o número de definidores, e o debate estendido até a exaustão. Não obstante, sou inclinado a pensar que o mais importante talvez não seja responder a pergunta diretamente, mas em encontrar sentido nos olhos de quem *faz* ciência, em suas motivações, em seus porquês, em seus sonhos. Desta forma, passo a encarar a ciência como meio e não como fim, e acredito nela como fonte que pode nos auxiliar, um dia, a compreender o mundo e talvez quem somos. Quem sabe em fornecer uma indescritível leitura do universo que nos faça enxergar a natureza com os olhos admirados de uma criança? A ciência, talvez, não deve ser responsável em responder todos nossos questionamentos e afastar a plenitude de nossos medos e incertezas, mas tem seu papel claro quando vislumbramos do que somos capazes de fazer e, mais importante, do que não somos.

A ciência para mim, portanto, não é responsável por apenas gerar um conjunto de dados que possa ser reproduzido, testado, esmiuçado até suas ínfimas partes, testado, aprovado ou recusado. Talvez ela própria seja em si como uma obra de arte, que possa ser contemplada em vários momentos históricos e por diferentes culturas. Que possa ser aplaudida ou vaiada, e essencialmente questionada. Que possa ser o veículo de profundas descobertas, como os das ondas gravitacionais, de novas formas de biosensoriamento, de novas interpretações do mundo quântico. Seja ela o que for em essência, que produza sempre o melhor para todos.

"*Toda a vida é solução de problemas*"
(Karl Popper)

[a] Oliva, A. **Filosofia da ciência**. Rio de Janeiro: Zahar, 2003. Coleção passo-a-passo, 76 p.

RESUMO

A técnica de espectroscopia de capacitância eletroquímica foi recentemente utilizada com sucesso para detecção de biomarcadores de interesse clínico, como o caso da proteína C-reativa (CRP), que está relacionada com doenças cardíacas e processos inflamatórios. Nesta tese, esta técnica foi utilizada para desenvolver dispositivos eletroanalíticos com possíveis aplicações para a detecção de trombose, utilizando a proteína biomarcadora D-dímero; câncer de próstata, por meio da detecção da enzima fosfatase ácida prostática (PAP), e glicoproteína HRP, para possível detecção de células tumorais e como modelo para o estudo da interação lectina-glicoproteína. Além, no último caso, utilizaram-se também as funções de imitância como sinal transdutor como possível aplicação em *glycoarray*. Para a construção da superfície receptora sobre eletrodo de ouro, foram utilizadas duas moléculas diferentes de tiol (R-SH, sendo R uma cadeia carbônica genérica). A primeira, que contém em sua estrutura o grupo terminal carboxílico, foi utilizada com o objetivo de imobilizar o material biológico para reconhecimento do analito (i.e., anticorpos ou lectina) via protocolo EDC/NHS. A segunda, com o grupo redox terminal (11-ferrocenil-undecanotiol, 11Fc), foi utilizada com o intuito de fornecer o sinal transdutor. As monocamadas bifuncionais obtidas pela adsorção conjunta de ambas as moléculas apresentam densidade molecular superficial na ordem de $\Gamma \approx 5 \times 10^{-10}$ mol/cm^2. A imobilização do anticorpo para detecção da PAP (anti-PAP) foi investigada por QCM, sendo possível verificar que a saturação ocorre em aproximadamente 1 h, atingindo $\Gamma \approx 3{,}7$ mg/m^2, sugerindo orientação "*end-on*". Utilizando o sinal de capacitância eletroquímica, foi possível desenvolver um biossensor para detecção de PAP com limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) de 9 pmol/L e 28 pmol/L, respectivamente, aplicado a uma faixa de concentração clinicamente útil de PAP entre 50-1000 pmol/L em tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4). O desvio-padrão relativo obtido foi de 9,5%, e apresentou especificidade quando avaliado frente à fetuína como controle negativo. O mesmo ensaio foi realizado em soro comercial não diluído, apresentando faixa linear de 50-5000 pmol/L, com limites de detecção e quantificação maiores quando comparados com resultados em PBS, de 52 pmol/L e 132 pmol/L, respectivamente. A etapa de imobilização do anticorpo para detecção de D-dímero (anti-DD) também foi avaliada por QCM, obtendo-se $\Gamma \approx 3{,}0$ mg/m^2, sugerindo que o filme pode apresentar orientação dos anticorpos numa composição intermediária entre "*end-on*" e "*side on*". D-dímero foi detectado tanto em solução PBS (pH 7,4) como em soro não diluído, numa faixa de concentração de 5 pmol/L - 5 nmol/L, com LD e LQ de 50 fmol/L e 165 fmol/L (em PBS) e 7 pmol/L e 21 pmol/L (em soro), respectivamente. A técnica de espectroscopia de capacitância eletroquímica foi capaz de avaliar a interação entre a lectina ArtinM e glicoproteína HRP em concentrações 1500 vezes menores do que a piezelétrica (QCM). A abordagem possibilitou detectar HRP na faixa de concentração de 0,5-100 nmol/L com LD de 200 pmol/L e com desvio-padrão relativo de 7%. As funções de imitância também foram utilizadas como sinal transdutor para o estudo da interação ArtinM-HRP, apresentando a mesma sensibilidade que a espectroscopia de capacitância eletroquímica, com a vantagem de oferecer ensaios com maior rapidez. Os resultados obtidos nesta tese evidenciam o potencial uso da capacitância eletroquímica e das funções de imitância para o desenvolvimento de dispositivos biossensores aplicados ao diagnóstico clínico (trombose e câncer de próstata) e em *glycoarray*.

Palavras-chave: Espectroscopia de capacitância eletroquímica. Biossensores. Funções de Imitância. Biomarcadores. ArtinM.

ABSTRACT

The electrochemical capacitance spectroscopy technique has been recently applied to detect biomarkers of clinical interest, such as C-reactive protein (CRP) which is related to heart disease and inflammatory processes. Herein, this technique was used to develop electroanalytical approaches with potential applications for thrombosis diagnosis by detecting D-dimer biomarker protein; prostatic cancer, using prostatic acid phosphatase (PAP) enzyme as target; and glycoprotein assay, for possible detection of tumor cells and as a model for studying lectin-glycoprotein interaction (using ArtinM lectin and HRP glycoprotein). In addition, in the latter case, immittance functions were used as transducer signals as possible application for glycoarray. For the construction of the receptor surface on gold electrodes, two different thiol molecules (R-SH, being R a generic carbonic chain) were used. The first, which contains the carboxylic terminal group, was applied to immobilize the biological material for target recognition (i.e., either antibodies or lectin) via EDC/NHS protocol. The second molecule contains a terminal redox group (11-ferrocenyl-undecanethiol, 11Fc) in order to provide the transducer signal. The bifunctional monolayers obtained herein present high surface coverage, $\Gamma \approx 5 \times 10^{-10}$ mol/cm^2. The immobilization of the antibody to PAP detection (anti-PAP) was investigated by QCM, and it was verified that saturation occurs in approximately 1 h, yielding a surface coverage of $\Gamma \approx 3.7$ mg/m^2, suggesting "end on" orientation. Using the electrochemical capacitance signal, it was possible to develop an approach for PAP detection with limit of detection (LD) and quantification (LQ) of 9 pmol/L and 28 pmol/L, respectively, applied to a PAP clinically useful concentration range of 50-1000 pmol/L in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4). The relative standard deviation obtained was 9.5%, and showed specificity when evaluated against fetuin as a negative control. The same assay was performed in undiluted commercial serum in a linear range of 50-5000 pmol/L, with higher LD and LQ when compared to PBS, with results of 52 and 132 pmol/L, respectively. Anti-DD immobilization was also evaluated by QCM, presenting similar saturation time, 1 h, when compared with anti-PAP coupling. The surface coverage, $\Gamma \approx 3.0$ mg/m^2, suggests an intermediate antibody SAM orientation between "end on" and "side on". D-dimer was detected in both PBS (pH 7.4) and undiluted serum at a concentration range of 5 pmol/L - 5 nmol/L, with LD and LQ of 50 fmol/L and 165 fmol/L (in PBS) and 7 pmol/L and 21 pmol/L (in serum), respectively. Higher values of LD and LQ were obtained in serum when compared to those in PBS in combination with increase in relative standard deviation, from 11% (in PBS) to 14% (in serum) due to the matrix effect. The capacitance spectroscopy technique was also able to evaluate the interaction between ArtinM lectin and HRP glycoprotein at concentrations 1,500 times lower than those used in classical techniques, such as piezoelectric (QCM). The approach allowed detecting HRP in the concentration range of 0.5-100 nmol/L with LD of 200 pmol/L and with a relative standard deviation of 7%. Immittance functions were also used as a transducer signal for the study of the ArtinM-HRP interaction, presenting the same sensitivity as electrochemical capacitance, with the advantage of offering quicker assays. The results obtained in this thesis show the potential use of electrochemical capacitance and immittance functions for the development of biosensor devices applied for clinical diagnosis (prostatic cancer and thromboses) and glycoarray.

Keywords: Electrochemical capacitance spectroscopy. Biosensors. Immittance functions. Biomarkers. ArtinM.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A ciência como parecer ser: um quebra-cabeça complicado 22

Figura 2 - Faixas de concentração de proteínas (valores aproximados) acessíveis para diferentes técnicas analíticas.....25

Figura 3 - Diferentes abordagens para detecção de proteínas..... 26

Figura 4 - Representação esquemática de um biossensor.....27

Figura 5 - Representação de um sensor voltamétrico para detecção de lisozima baseado no uso de aptâmero..... 31

Figura 6 - Ilustração de um processo ideal de impressão molecular para detecção de moléculas alvo utilizando tiol 33

Figura 7 - Curvas e esquemas característicos da impedância eletroquímica.. 34

Figura 8 - Representação esquemática do modelo de Góes para a capacitância de um sistema com propriedades de relaxação iônica..... 40

Figura 9 - Modelo explicavo da capacitância eletroquímica..... 43

Figura 10 - Voltamogramas típicos para o processo de limpeza do eletrodo de ouro..... 53

Figura 11 - Voltamograma típico para o processo de dessorção do tiol da superfície de ouro.55

Figura 12 - Curvas referentes ao teste de Kronig-Kramers (KK). 61

Figura 13 - Curvas para análise da validação dos dados de impedância eletroquímica..... 61

Figura 14 - Resultados de análise eletroquímica obtidos para a modificação do eletrodo de ouro utilizando 11Fc e PEG-tiol. 64

Figura 15 - Voltamogramas e a dependência da intensidade da corrente de pico com a velocidade de varredura obtidos utilizando a superfície modificada..... 65

Figura 16 - Diagrama de Nyquist obtidos nos processos de modificação do eletrodo com SAM, anti-PAP e bloqueio com BSA..... ..... .66

Figura 17 - Exemplo de sensograma obtido no processo de imobilização de anti-PAP.....67

Figura 18 - Etapa de bloqueio durante construção do biossensor para a detecção de PAP por meio da técnica de QCM.....69

Figura 19 - Análise por espectrocopia de impedância/capacitância obtidos para detecção de PAP.....70

Figura 20 - a) Curva de calibração obtida utilizando a abordagem de capacitância eletroquímica, variando a concentração de PAP de 50-1000 pmol/L. b) Avaliação da especificidade do ensaio utilizando uma proteína não específica.....71
Figura 21 - Avaliação da propriedade anti-incrustrante de superfície funcionalizada com filme de PEG-tiol 73
Figura 22 - Curva de calibração para detecção da proteína biomarcadora PAP, utilizando faixa de contração de 50-5000 pmol/L em soro comercial não diluído..... 73
Figura 23 - Representação conceitual da engenharia de superfície desenvolvida para a detecção de D-dímero. 76
Figura 24 - Análises eletroquímicas (VC e EIE) obtidos para a caracterização da superfície de ouro modificada com 11Fc e 16MHx. 77
Figura 25 - Exemplo de sensograma obtido no processo de imobilização de anti-DD. 78
Figura 26 - Etapa de bloqueio durante construção do biossensor para a detecção de D-dímero por meio da técnica de QCM. 80
Figura 27 - Análise por espectroscopia de impedância/capacitância para a detecção de D-dímero. 81
Figura 28 - Gráficos de Bode para os dados de capacitância real (a) e imaginária (b) em função da frequência. 81
Figura 29 - Curva de calibração obtida utilizando DD diluído em soro comercial..... 83
Figura 30 - Caracterização eletroquímica obtida para o eletrodo de ouro modificado com 11Fc e 16MHx para a realização do glico-ensaio... 87
Figura 31 - Análise por espectroscopia de impedância/capacitância para o estudo da interação AntinM-HRP. 88
Figura 32 - a) Curva de saturação obtida por meio do sinal de capacitância eletroquímica, que pode ser linearizada, como mostrado em (b). c) Resposta do sensor frente a uma proteína não específica (BSA). 89
Figura 33 - Curva de calibração para a detecção da glicoproteína HRP utilizando o sinal de capacitância eletroquímica no potencial *in*..... 89
Figura 34 - Exemplo de glycoarray para o estudo da interação entre lectinas e carboidratos..93
Figura 35 - Resposta relativa (RR) dos 18 parâmetros analisados na faixa de frequência de 0,01 – 100,000 Hz variando a concentração de HRP de 0,5 to 100,0 nmol/L. 95

Figura 36 - Resposta de $1/C''$ em função da concentração de HRP para toda faixa de frequências..... 96

Figura 37 - Curvas analíticas obtidas nas frequências otimizadas para todos os 18 parâmetros analíticos e capacitância eletroquímica.....97

Figura 38 - Controles negativos para diferentes funções de imitância utilizando BSA 98

Figura 39 - Sensibilidades para diferentes funções de imitância em função da faixa de frequências..... 98

Figura 40 - Curvas de saturação obtidas, na frequência otimizada, para todos os 18 parâmetros analíticos (funções de imitância e suas relações)..... 99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de biossensores eletroquímicos para detecção de diferentes biomarcadores. 38

Tabela 2 - Substâncias, suas procedências e finalidades. 49

Tabela 3 - Comparação entre os parâmetros analíticos obtidos em solução tampão PBS (pH 7,4) e em soro comercial não diluído para a detecção da proteína biomarcadora PAP. 74

Tabela 4 - Comparação entre os parâmetros analíticos obtidos em solução tampão PBS (pH 7,4) e em soro comercial não diluído para a detecção da proteína biomarcadora D-dímero. 83

Tabela 5 - Frequências otimizadas de diferentes funções de imitância ($\boldsymbol{ImFs}$) para o estudo da interação ArtinM-HRP. 96

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18
2 REFERENCIAL TEÓRICO 23
2.1 Capacitância redox ou eletroquímica 39
3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS 46
4 PARTE EXPERIMENTAL 48
4.1 Reagentes e soluções 48
4.2 Equipamentos 50
4.3 Medidas eletroquímicas 51
4.4 Limpeza e caracterização da superfície de ouro para as medidas eletroquímicas 52
4.6 Imobilização do material biológico e caracterização da superfície 56
4.7 Construção das curvas analíticas 56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 59
5.1 Validação dos ensaios de espectroscopia de impedância eletroquímica 59
5.2 Um estudo para detecção da PAP: um biomarcador para o câncer de próstata. 62
5.3 Uma nova abordagem para a detecção femtomolar de D-dímero 75
5.4 O uso da técnica de capacitância redox como ferramenta para a determinação da constante de afinidade em biointerações: o caso da ArtinM-HRP 84
5.5 Funções de imitância como transdução de sinal de biorreconhecimento: uma nova abordagem para glycoarray? 90
6 CONCLUSÕES 101
REFERÊNCIAS 104
APÊNDICE A 121
APÊNDICE B 136
APÊNDICE C 143
APÊNDICE D 147

1 INTRODUÇÃO

Em meados de 2012, quando estava à procura de algo relacionado com biossensores para meu doutorado (no mestrado eu desenvolvi uma plataforma piezelétrica para a compreensão do processo de interação e determinação da constante de afinidade entre lectinas recombinantes de *T. gondii* com glicoproteínas),[1] eu enviei um e-mail ao Prof. Dr. Paulo R. Bueno, com o intuito de verificar se ele não estaria desenvolvendo algo inédito nesta área. Naquela época, ele imprimiu e me ofereceu o manuscrito ainda não submetido do artigo que estava elaborando, em parceria com o Prof. Dr. Jason J. Davis, da Universidade de Oxford, relacionado a uma nova abordagem para transdução eletroquímica de reconhecimento biológico do tipo antígeno-anticorpo. Nos meses seguintes, esse artigo foi aceito na *Biosensors and Bioelectronics*[2] e pareceu ser o que procurava: inovadora (técnica eletroquímica diferenciada), com possibilidade de aplicação na área clínica (desenvolvimento de biossensores para diagnóstico molecular) e com potencial impacto social (os baixos limites de detecção poderiam auxiliar no diagnóstico precoce de doenças). Em março de 2013, após seis meses de preparação para o exame de ingresso ao doutoramento da UNESP-Instituto de Química de Araraquara, iniciei minhas atividades.

O meu interesse em biossensores surgiu ao longo da pesquisa no mestrado: desenvolver um dispositivo que pudesse detectar e quantificar determinados biomarcadores (biomoléculas ou proteínas relacionadas ao aparecimento de alguma doença) é essencial e de grande impacto econômico-social. Muitos métodos que atualmente são empregados, como ELISA (e*nzyme-linked immunosorbent assay*) e outros baseados no uso de marcadores, não são sensíveis ou miniaturizáveis para o diagnóstico de doenças em estágios iniciais e, ao mesmo tempo, de forma portátil (desejável em diagnóstico *point-of-care* que idealmente necessita da análise fora do ambiente de custosos laboratórios clínicos). Devido a essa necessidade, não é difícil encontrar vasto conteúdo na literatura de métodos promissores para a construção em biossensores,[3-6] que partem de engenharias criativas e ao mesmo tempo intrincadas (como o uso de nanotubos e nanopartículas),[7,8] mas a nova metodologia reportada pelo grupo do Prof. Paulo R. Bueno me chamou a atenção pois fugia da tradicional aplicação da impedância como mecanismo de transdução,[9] e recaia em algo essencialmente novo, pois os ensaios não necessitavam de espécie eletroativa em solução ao mesmo tempo que apresentavam a mesma capacidade de detecção de biomarcadores que a metodologia

faradáica,[10] e despontava frente aos métodos ópticos e piezelétricos discutidos na literatura da época.[11,12] Além disso, sabe-se que as abordagens eletroquímicas são inerentemente promissoras uma vez que possibilitam a construção de plataformas multiplexáveis (i.e., mais de uma análise ao mesmo tempo) e potencialmente miniaturizáveis:[13] uma combinação interessante quando se pretende desenvolver biossensores.

Não apenas a necessidade de novas plataformas para análise clínica justifica o crescente aumento de pesquisas voltadas ao assunto. Existem, ao menos, duas outras motivações ou oportunidades que inerentemente conduzem, com mãos invisíveis, o desenvolvimento de novas metodologias para o diagnóstico clínico ou molecular. A primeira delas está relacionada com a possibilidade de melhora da saúde e da qualidade de vida da população. A ideia fica clara quando pensamos que o diagnóstico de câncer em estágios iniciais é de crucial importância para que o paciente tenha um tratamento menos agressivo e maiores chances de vida. Por exemplo, a taxa de sobrevivência após cinco anos do diagnóstico de câncer de mama é de apenas 15% quando diagnosticado em estágio avançado. Por outro lado, ele sobe para 90% quando ele é detectado precocemente.[14] O mesmo se repete para o câncer de ovário (de 5% para 90%)[14] e de próstata (de 30% para 99%).[15] Claramente, quando se possibilita minimizar a necessidade de tratamento médico do câncer em estágios mais avançados (o que é muito oneroso do ponto de vista financeiro), o impacto econômico é consideravelmente positivo. A segunda motivação, inerentemente relacionada à primeira, se encontra nas características de financiamento e mercadológicas. Estima-se que o mercado de diagnóstico de câncer alcançará um valor de US$ 168 bilhões em 2020, o que corresponde a um aumento de 68% quando comparado a 2013 (US$ 100 bilhões). Esse aumento é fruto dos avanços tecnológicos (que abrem novas perspectivas e oportunidades de desenvolvimento não antes contempladas), e iniciativas governamentais relacionadas com o aumento do financiamento em fundos de pesquisa e desenvolvimento.[16]

Quando se discute biossensores, é impossível não mencionar as áreas da pesquisa que alicerçam seus avanços na busca por metodologias inovadoras que, fatalmente, culmina no conceito de nanotecnologia. Já dizia ***Feynman***[b] que "*existem muitos espaços lá embaixo"* (de seu discurso *"There's plenty of room at the bottom"* proferido no Instituto de Tecnologia da

[b] **Richard Philips Feynman** (1918-1988) foi um físico estadunidense que compartilhou o prêmio Nobel de Física em 1965 por suas contribuições no campo da eletrodinâmica quântica. Veio ao Brasil na década de 1950, na qual descreve sua experiência no livro "O senhor está brincando, Sr. Feynman!" (Elsevier, 348 p).

Califórnia, *Caltech*, em 1959) ao fazer referência da imensa possibilidade proporcionada pela miniaturização aos diferentes campos da ciência. De certa forma, essa possibilidade vem sendo explorada, especialmente em biossensores, quando filmes auto-organizados são obtidos sobre superfícies metálicas pela adsorção e organização espontânea de determinadas moléculas para posterior imobilização do material biológico. Um grande exemplo que se pode citar neste caso é a observação fenomenológica da adsorção de tióis (R-SH, sendo R a representação de um alcano, alceno, ou grupo de átomos contendo carbono) sobre ouro, realizada por Nuzzo e Allara em 1983.[17] A Química, por exemplo, se faz presente na compreensão dessas observações para o avanço tecnológico quando descreve o fenômeno mecanisticamente ou em leis universais, como os princípios da termodinâmica em analisar a espontaneidade de processos; ou em termos de mecanismos de reação, em especial quando se pretende analisar profundamente como o material biológico receptor pode ser ancorado na superfície metálica e como isso pode afetar a eficiência do biossensor. Neste ponto, pode-se evidenciar como a contribuição da Biologia se faz necessária, uma vez que ela pesquisa e identifica, por meio das ciências relacionadas (como a genômica, proteômica e glicômica, por exemplo),[18-20] os biomarcadores ideais (DNA, RNA, anticorpos, aptâmeros, enzimas, etc.). Adicionalmente, não é difícil associar a Física quando se pretende desenvolver modelos e interpretações teóricas que satisfaçam os dados experimentais, especialmente explorados em simulação molecular e nas teorias universais que movimentam os próprios átomos e partículas subatômicas e, consequentemente, as reações (como a incrível contribuição do modelo quântico na compreensão do comportamento, embora imprevisível, dos elétrons); ou em mecanismos de transdução de sinal de reconhecimento biológico que alicerçam modelos para interpretação de processos biológicos e no desenvolvimento de biossensores.[1,21,22]

Desta forma, ao se trabalhar com biossensores, é inevitável que nesse processo o pesquisador se envolva com outras áreas a ela relacionadas. É uma incrível e desafiadora busca de extrair o máximo de cada uma delas na tentativa de combinar as "peças desse quebra-cabeça" e obter a melhor visão panorâmica que elas suportam. Para quem aprecia quebra-cabeças, sabe que não é fácil encaixar as peças sem um modelo (que geralmente vem na embalagem), e a ciência recai muitas vezes neste conceito (Figura 1).

A tentativa de juntar essas "peças coletadas" durante esse estudo sobre o uso de técnicas eletroquímicas (especificamente voltametria cíclica, espectroscopia de impedância/capacitância eletroquímica e funções de imitância), em combinação com

piezelétrica (microbalança a cristal de quartzo), na avaliação de sua aplicação no diagnóstico clínico e em glicobiologia, no período de 03/2013 a 02/2017, é mostrada nesta tese. Ela tem como principais objetivos demonstrar a viabilidade do uso da técnica eletroquímica de espectroscopia de impedância/capacitância para aplicação tanto em diagnóstico clínico, que se fundamenta na detecção de biomarcadores de interesse clínico; como em glycoarray, que essencialmente é o ensaio de interação entre carboidratos e proteínas, fundamentais para a compreensão de mecanismos biológicos, como invasão celular. Claramente, o estudo se fundamentou na possibilidade de encontrar novas metodologias que oferecessem baixos valores de limite de detecção (na ordem de 10^{-9} mol/L) combinado com faixas clinicamente úteis de detecção. Com o intuito de alcançar esses objetivos, estudos da construção do biossensor foram monitorados por técnicas eletroquímicas (voltametria cíclica e impedância) e piezelétrica. Os biomarcadores alvos utilizados foram proteína PAP (*Prostatic acid phosphatase*, fosfatase prostática ácida), relacionada ao diagnóstico de câncer de próstata; D-Dímero, para embolia e trombose; e a glicoproteína HRP (*Horseradish peroxidase*, peroxidase de raiz forte) como modelo para o estudo de interação lectina-carboidrato. Todas essas proteínas são geralmente quantificadas ou determinadas por técnicas que não possuem baixos limites de detecção ou, se possuem, necessitam de marcadores para a detecção e demorado tempo de análise (maiores detalhes na seção 5). A principal vantagem da técnica de capacitância eletroquímica (como será mostrado na próxima seção) se resume no fato de ser desnecessário adicionar espécie eletroativa em solução e, quando associado às funções de imitância,[23,24] possibilitam obter potenciais plataformas para análise rápida e *point-of-care*.

Por conveniência, essa tese foi organizada em diferentes seções ou capítulos. A próxima seção traz a discussão do referencial teórico sobre as técnicas utilizadas, além do levantamento bibliográfico sobre as formas como os biomarcadores podem ser detectados e como os biossensores auxiliam nesta tarefa. Posteriormente, serão apresentados especificamente os objetivos desse trabalho (seção 3) e, naturalmente, os materiais e métodos utilizados (seção 4). A partir desse ponto, serão mostrados os resultados experimentais, começando pelos de validação dos dados de impedância e, posteriormente, na determinação específica de cada biomarcador (seção 5). Após a conclusão do trabalho (seção 6) e referências, podem-se encontrar os artigos já publicados com os resultados previamente mostrados na seção 5 (Apêndices A-D), exceto para o caso da detecção da PAP em que, até o momento da escrita dessa tese, o artigo se encontra em elaboração. Em

especial, no Apêndice A, encontra-se artigo de revisão que descreve as variadas técnicas eletroquímicas utilizadas como sinal transdutor de biorreconhecimento.

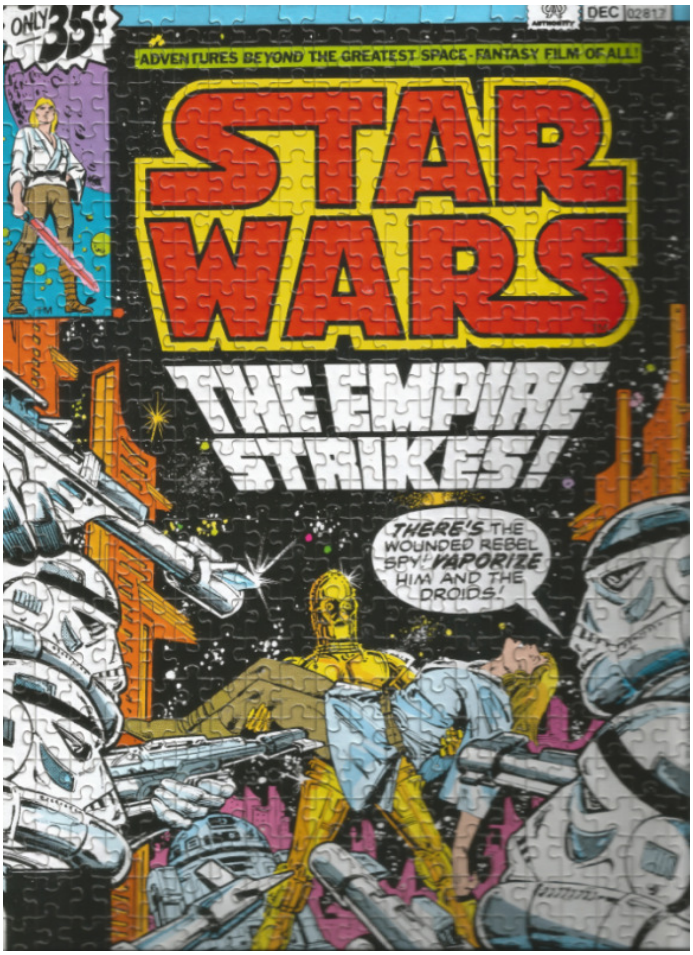


Figura 1 - A ciência como parecer ser: um quebra-cabeça complicado em que na maioria das vezes se tenta encaixar as peças sem um modelo. Eu caminhei a essa ideia quando estava montando o quebra-cabeça acima e pensando como os dados obtidos por técnica piezelétrica se encaixariam com os eletroquímicos. Como experiência de vida, posso dizer que ficamos mais conscientes quando visualizamos o processo final de encaixe e enxergamos o panorama mais completo possível. Antes disso, apenas visualizamos um todo incompleto. Aqui, um dos heróis da saga de Star Wars, Luke Skywalker, está inconsciente nos braços do androide C-3PO e ao lado de R2-D2, na tentativa de fuga dos soldados do Império (Stormtroopers). Agradeço à Fabiana P. R. Mota por ter me ajudado com a montagem do quebra-cabeça.
Fonte: autor. Arte: Toyster/Disney

2 REFERENCIAL TEÓRICO

É inquestionável que atualmente somos espectadores (e autores) de um visível progresso tecnológico e científico que expande e ao mesmo tempo fascina nosso olhar sobre o conhecimento. Em nenhum outro momento de nossa história fomos capazes de construir tanto as maiores arquiteturas do mundo como o *Burj Khalifa* (arranha-céu de 828 m localizado em Dubai), como em desenvolver partículas de dimensões milhões de vezes menores que 1 cm e que podem ser encontradas, por exemplo, em promissores dispositivos para diagnóstico clínico.[25] Por outro lado, devido a esse avanço da ciência, das novas tecnologias e da industrialização, esse fascínio se transmuta em preocupação, pois essa mesma ciência repercute em profundas transformações sociais, como o caso da modificação do perfil demográfico mundial.[26] Um exemplo dessa alteração é o envelhecimento populacional causado pelo aumento da expectativa de vida. Consequentemente, o perfil de morbimortalidade está se modificando, diminuindo a ocorrência de doenças infectocontagiosas e colocando as doenças crônico-degenerativas (como o câncer) em foco por ser uma das principais causas de morte no mundo.[26] Neste caso, estima-se que em 2030 o número de novos casos de câncer chegue a 21,4 milhões, causando, infelizmente, 13,2 milhões de óbitos.[26]

No Brasil, esperam-se 600 mil novos casos de câncer no biênio 2016-2017.[26] Estima-se que o de maior incidência será o câncer de pele não melanoma, que corresponde a 180 mil, seguido do câncer de próstata com 61 mil e mama com 58 mil. Excetuando-se os casos de câncer de pele não melanoma, os tipos mais frequentes em homens serão o de próstata (28,6%), pulmão (8,1%) e intestino (7,8%); enquanto em mulheres as taxas serão de 28,1% para câncer de mama, 8,6% para o câncer de intestino e 7,9% para o caso do cólon do útero, tornando evidente o problema do câncer no país.[26]

Uma das principais estratégias de luta contra o câncer é por meio de seu diagnóstico precoce, uma vez que a sua detecção em estágios iniciais permite ao médico realizar tratamentos mais eficazes, diminuindo consideravelmente a taxa de mortalidade causada pela doença.[27] Não apenas nos casos de câncer o diagnóstico precoce é desejável. Por exemplo, a trombose, em especial a embolia pulmonar proveniente por entupimentos em uma ou mais artérias pulmonares causados por coágulos, além de agravar o quadro clínico do

paciente (estudos demonstram que ela pode levar à hipertensão pulmonar e cardíaca[28]), ela pode ser fatal. Por outro lado, o diagnóstico precoce permite ao médico orientar o paciente e oferecer tratamento adequado, de tal forma a minimizar ou até mesmo evitar o agravamento do quadro clínico.[29] Neste mesmo contexto, o diagnóstico precoce de muitas outras doenças, como as cardiovasculares,[30] renais[31] e doença de Alzheimer,[32] por exemplo, é inegavelmente uma estratégia necessária para reduzir o número de casos graves e fatais, bem como possibilita oferecer melhora na qualidade de vida do paciente.

Com o avanço da proteômica[33] (ciência que se dedica ao profundo estudo das proteínas) e da glicômica[19,34,35] (estudo das glico-estruturas e suas funções biológicas), muito se têm descoberto sobre biomarcadores. Do ponto de vista clínico, biomarcadores podem ser definidos como sendo biomoléculas (geralmente proteínas) relacionadas a um trauma físico, infecção ou, de forma geral, relacionadas com o início ou progresso de uma doença.[36,37] A importância do avanço destas ciências está no fato de elas oferecerem estratégias para o diagnóstico clínico quando são capazes de identificar as proteínas que estão relacionadas a determinadas doenças, bem como em quais níveis de concentração elas são encontradas, modificações sofridas (especialmente em glicoproteínas)[19] e em qual meio biológico (soro sanguíneo, sangue, urina, etc.) são encontradas. Graças a estas descobertas, muitos estudos têm se dedicado ao desenvolvimento de metodologias para a detecção e quantificação de proteínas biomarcadoras de doenças.[4,19,35,38-42]

Atualmente, os métodos para a detecção de proteínas estão divididos em dois grupos: *label-based* e *label-free*. Ambas as abordagens são capazes de detectarem ampla faixa de concentrações de proteínas ou biomarcadores (Figura 2). Técnicas *label-based* requerem o uso de marcadores como corantes fluorescentes, radioisótopos, enzimas, etc., que são utilizados para "marcar" a proteína de interesse (ou alguma espécie intermediária) para oferecer o sinal necessário para a detecção (Figura 3a).[38] Essa metodologia é amplamente utilizada para detecção de proteínas devido à fácil disponibilidade de reagentes e simples instrumentação. Por outro lado, essa abordagem é trabalhosa e consome tempo. ELISA (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*) é um exemplo dessa metodologia, que utiliza anticorpos marcados para a detecção da proteína. Apesar dos métodos de análises *label-based* serem reprodutíveis e em muitos casos com sensibilidade suficiente para a detecção de proteínas, elas são suscetíveis às interferências causadas por substâncias corantes presentes naturalmente em várias amostras como, por exemplo, sangue, urina e saliva.[43] Além disso,

elas são muitas vezes ineficientes para detecção de proteínas em baixos níveis,[44] muitas vezes essencial para o diagnóstico precoce. Não obstante, formatos de métodos ELISA, como o sanduíche, necessitam de, pelo menos, dois anticorpos para a detecção do antígeno (conhecidos como anticorpos de ancoragem e de reconhecimento), aumentando a complexidade da análise. Portanto, torna-se evidente a importância da investigação científica no que se refere ao desenvolvimento de métodos de análises mais simples e também sensíveis para detecção dos biomarcadores para fins clínicos.

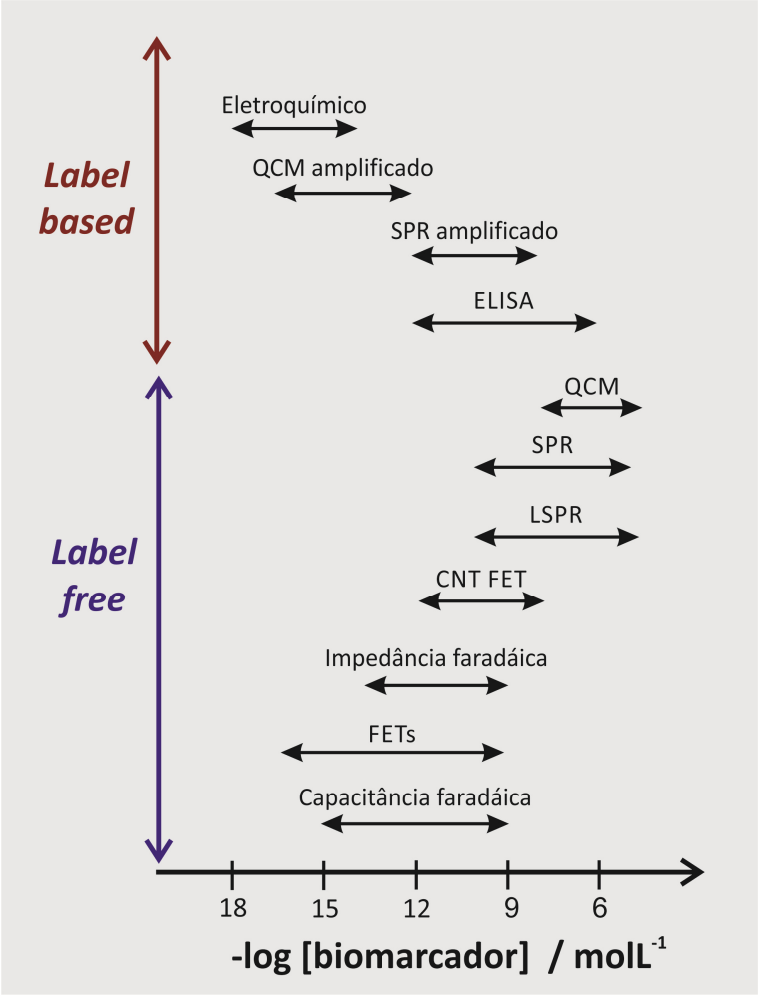


Figura 2 - Faixas de concentração de proteínas (valores aproximados) acessíveis para diferentes técnicas analíticas. QCM: Quartz crystal microbalance [microbalança a cristal de quartzo];[11] SPR: Surface plasmon resonance spectroscopy [Espectroscopia de ressonância plasmônica de superfície];[12] ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay [ensaio de imunoabsorção enzimática]; LSPR: Localised surface plasmon resonance spectroscopy [Espectroscopia de ressonância plasmônica de superfície localizada];[45] CNT FET: Carbon-nanotube field-effect transistor [Transistor de efeito de campo a base de nanotubos de carbono];[46] FET: Field-effect transistor [Transistor de efeito de campo].[47; 48]
Fonte: autor, adaptada da referência 49

Por outro lado, técnicas *Label-free* removem a necessidade de marcação, e o sinal de reconhecimento é obtido das características inerentes da própria proteína alvo, como sua massa e propriedade dielétrica (Figura 3b).[50] Neste caso, os métodos permitem o monitoramento em tempo real[51] que, além de oferecerem ferramentas ideais para o estudo de cinética de interação do tipo receptor-ligante (importante para investigar o papel bioquímico da proteína), possibilitam desenvolver dispositivos capazes de detectar a proteína no momento do ensaio, desejáveis em análises do tipo *point-of-care* (i.e., ensaios que podem ser realizados ao lado do leito do paciente).

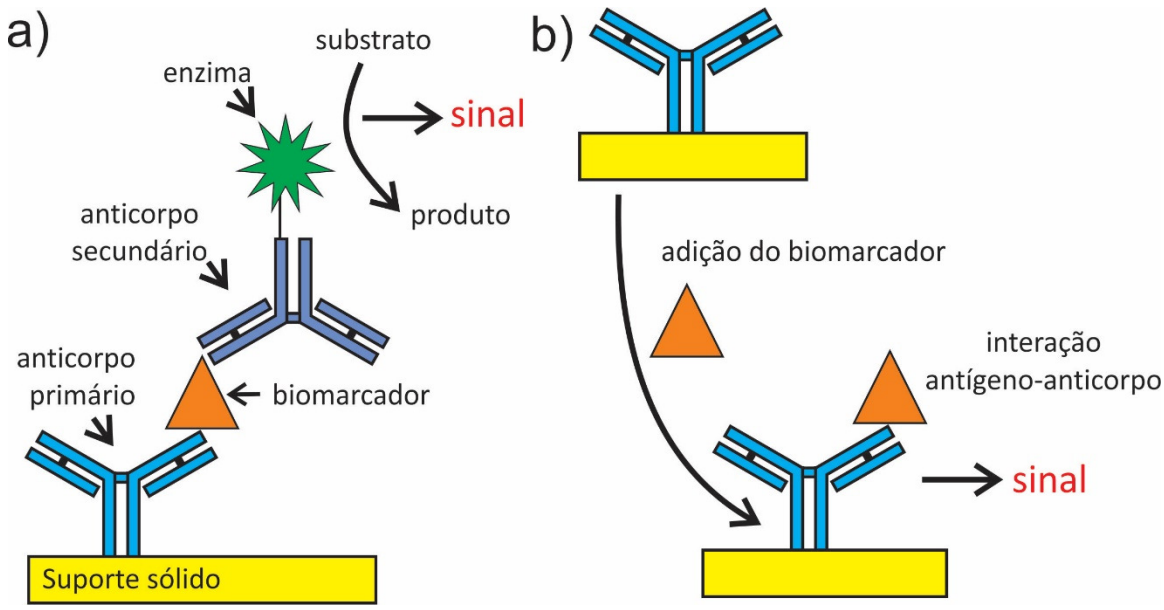


Figura 3 - Diferentes abordagens para detecção de proteínas (neste caso, biomarcadores ou analito). Essencialmente, os biomarcadores podem ser detectados por metodologia (a) *label-based* ou (b) *label-free*. Na metodologia *label-based*, se faz necessário utilizar uma espécie de reconhecimento contendo uma marcação (*label*), sendo as enzimas e compostos fluorescentes os mais utilizados. Como exemplificado em (a), o anticorpo primário (também conhecido como anticorpo de reconhecimento) é primeiramente imobilizado no suporte sólido. Após a interação com o biomarcador presente na amostra clínica, pode ser utilizado um anticorpo secundário marcado com enzima. Posteriormente, adiciona-se o substrato adequado e a conversão enzimática do substrato em produto gera um sinal proporcional à quantidade de biomarcador na amostra. (b) Por outro lado, nas metodologias *label-free* não se faz necessário adicionar nenhuma espécie marcada. A própria interação do biomarcador com o anticorpo (acoplamento antígeno-anticorpo, como exemplificado) fornece o sinal necessário para quantificar o nível do biomarcador na amostra.
Fonte: autor

Ambas as abordagens têm sido amplamente utilizadas na construção de biossensores, que são definidos como sendo dispositivos que possuem um material biológico (anticorpos, lectinas, aptâmeros, enzimas, etc.) acoplado a um transdutor, responsável por converter o sinal de interação biológica (reconhecimento) em outro mensurável, como o elétrico.[52,53] O

biossensor é essencialmente formado por uma superfície de reconhecimento, constituída pela espécie de reconhecimento ancorada no transdutor de sinal (Figura 4). Existem diferentes tipos de transdutores, sendo os eletroquímicos (uso de propriedades elétricas da interface eletrodo/solução), piezelétricos (relaciona a variação de oscilação do cristal de quartzo com a massa adsorvida sobre ele) e ópticos (alteração do acoplamento de onda evanescente com os plásmons de superfície) os mais comuns.

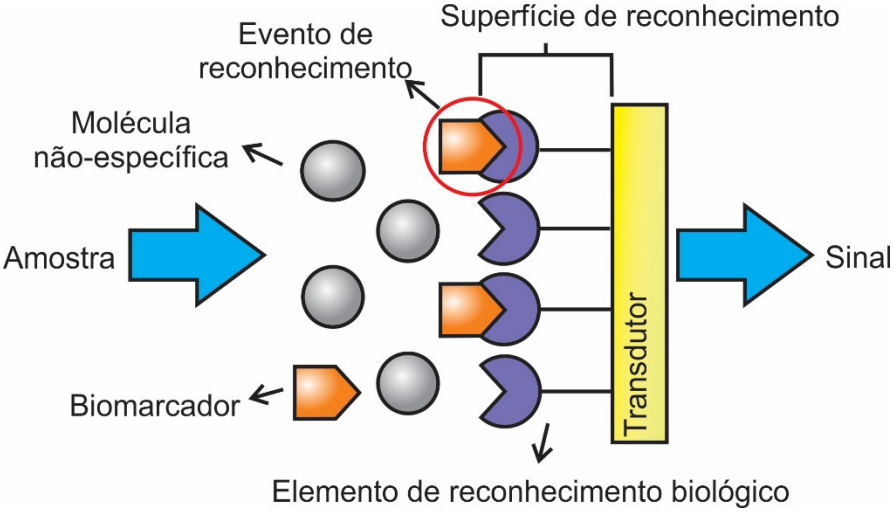


Figura 4 - Representação esquemática de um biossensor. Uma amostra contendo o biomarcador (analito) e moléculas não específicas (interferentes) está em contato com a superfície de reconhecimento. O elemento de reconhecimento biológico (anticorpo, fragmento de anticorpo, aptâmeros, DNA, RNA, células, etc.) que está imobilizado sobre o transdutor (piezelétrico, óptico, eletroquímico, etc.) interage com a molécula alvo presente na amostra (evento de reconhecimento). O transdutor converte o sinal de reconhecimento em outro mensurável e proporcional à concentração do biomarcador, como o elétrico.
Fonte: autor

Dentre as diversas formas de quantificar proteínas de forma *label-free,* a técnica de microbalança a cristal de quartzo, QCM (do inglês *quartz crystal microbalance*) é um exemplo sendo explorado no meio acadêmico.[51,54] Embora essa técnica tem sido aplicada para a detecção de proteínas[54-57] e ácidos nucléicos (DNA e RNA),[54-57] variados estudos têm sido conduzidos especialmente para a determinação de constante de afinidade entre biomoléculas.[58] Nesta abordagem, o elemento de reconhecimento é imobilizado sobre transdutor piezelétrico e um aumento de massa devido à ligação da molécula alvo pode ser analisada por um decréscimo proporcional da frequência de oscilação do cristal de quartzo, como descrito por Sauerbrey.[59] Por exemplo, Tai *et al.* [60] detectaram com sucesso a proteína NS1 (uma proteína biomarcadora para dengue) por duas diferentes abordagens. Os dois

diferentes protocolos (imobilização do anticorpo para NS1 ou construção de polímeros molecularmente impressos [*molecularly imprinted polymer*, MIP] para epítopo do NS1 sobre cristal de quartzo) foram sensíveis para NS1 com limite de detecção em níveis clinicamente relevantes para a doença (i.e., na ordem de ng/mL). Su *et al*.[61] utilizaram cerâmica de PZT (titanato de zircônio) para desenvolver um biosensor para detectar baixos níveis (ng/mL) de biomarcadores de câncer (PSA, *prostatic specific antigen,* relacionado ao câncer de próstata; e α-fetoproteína, AFT, ao câncer de fígado e metástase). Embora a técnica de QCM seja essencialmente *label-free*, o uso de nanopartículas modificadas com anticorpos secundários como agentes ligantes tem aumentado a sensibilidade das análises (a ideia neste caso é que as nanopartículas oferecem maior quantidade de massa às espécies marcadas).[56,61] A técnica de espectroscopia plasmônica de superfície (SPR, *surface plasmonic ressonance*) monitora alterações no índice de refração da superfície funcionalizada por meio da análise do ângulo de ressonância ou SPR e, de forma geral, recai nas mesmas aplicações que QCM (i.e., estudos termodinâmicos de interações biomoleculares e biosensoriamento).[62-67]

Outras técnicas que também têm recebido destaque no meio acadêmico são as eletroquímicas.[68] Neste caso, os dispositivos incorporam o elemento de reconhecimento sobre a superfície de um eletrodo metálico ou com características condutoras. O sinal de transdução está relacionado com a transferência eletrônica de uma espécie eletroativa presente em solução ou como espécie marcadora, e alterações na capacitância e/ou impedância do sistema devido à interação biológica. As técnicas eletroquímicas incluem a voltametria, amperometria, potenciometria, condutometria e impedância eletroquímica.[69]

As técnicas de voltametria e amperometria têm como princípio aplicar um potencial (i.e., alteração em níveis de energia) em um eletrodo de trabalho previamente modificado *versus* um eletrodo de referência e medir a resposta em corrente elétrica. A corrente surge devido a reações redox que ocorrem no eletrodo de trabalho. Na voltametria, uma faixa de potencial é utilizada, obtendo-se a resposta em corrente elétrica, enquanto na amperometria o potencial é mantido fixo e a resposta em corrente é registrada ao longo do tempo.[68] Por exemplo, Yu e colaboradores[70] desenvolveram um biossensor voltamétrico utilizando como elemento de reconhecimento um aptâmero de DNA anti-lisozima imobilizado em eletrodo de ouro para detectar lisozima numa faixa linear de 0,5 a 50 μg/mL usando complexo de rutênio como espécie eletroativa ($[Ru(NH_3)_6]^{3+}$). A abordagem consiste em utilizar a estrutura do aptâmero negativamente carregada (devido aos grupos fosfatos presentes na estrutura) para

atrair grupos eletroativos positivamente carregados do complexo de rutênio (Figura 5). Uma varredura de potencial na faixa de -0,4 a 0,1 V (*versus* Ag|AgCl) apresenta picos característicos da atividade redox do complexo de rutênio. Após a incubação com a molécula alvo, a molécula de lisozima positivamente carregada neutraliza parcialmente a estrutura negativa do aptâmero. Consequentemente, $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ se liga somente onde a lisozima não foi hábil para se ligar, apresentando sensível decréscimo no pico de redução em função da concentração do analito. Desta forma, a metodologia proposta pelos pesquisadores está relacionada com o "desligamento" do sinal eletroquímico (corrente elétrica) proveniente do decréscimo da concentração da espécie redox eletrostaticamente ancorada no aptâmero. Em uma abordagem similar, Yan *et al*.[71] desenvolveram um biosensor baseado em aptâmero bifuncional para detecção de trombina e adenosina. Neste caso, o aptâmero para trombina foi imobilizado sobre eletrodo de ouro. Posteriormente, essa sequência foi hibridizada com o aptâmero para adenosina. Azul de metileno (*methilene blue*, MB) foi utilizado como indicador eletroquímico desde que ele se adsorve nos aptâmeros via resíduos de guanina. A presença de MB na estrutura do aptâmero foi detectada pelo pico de corrente na voltametria de pulso diferencial. Após incubação com as espécies alvo (adenosina ou trombina), a interação causa uma alteração nos níveis de MB adsorvidos no aptâmero com consequente decréscimo no pico de corrente, proporcional com a concentração do analito. A partir dessa metodologia, os autores puderam detectar trombina na faixa linear de 6-60 nmol/L (limite de detecção de 3 nmol/L) e 10-1000 nmol/L para adenosina (limite de detecção de 10 nmol/L).

Um biossensor amperométrico para detecção do antígeno-carcinoembriogênico (CEA, um biomarcador para câncer) foi desenvolvido por Laboria *et al*.[72] A abordagem é baseada no formato sanduíche que consiste na combinação de dois diferentes anticorpos: o anticorpo para captura (imobilizado sobre um monocamada automontada apropriada) e um outro marcado com a enzima HRP. A metodologia consiste, primeiramente, em imobilizar o anticorpo de reconhecimento (anti-CEA) sobre o eletrodo de ouro. Após incubação com o analito, o segundo anticorpo marcado com HPR interage com o CEA capturado pelo anti-CEA. Posteriormente, expondo o sensor a uma mistura de 1 mmol/L de H_2O_2 e 1 mmol/L de hidroquinona em solução tampão (PBS, pH 6,0) é possível detectar CEA aplicando um potencial de -0,2V versus Ag|AgCl em uma faixa clinicamente útil de 0-200 ng/mL e limite de detecção de 0,2 ng/mL. É importante notar que as enzimas podem ser substituídas por materiais eletroativos e de maior estabilidade (em termos de pH e condições ambientes) para

a geração de sinal em ensaios amperométricos, tais como as nanopartículas de ouro (GNPs). Neste caso, ao invés de utilizar um anticorpo marcado com enzima para a geração de sinal analítico, utiliza-se um anticorpo marcado com GNP para a geração de sinal. Por exemplo, Ho *et al*.[73] reportaram uma abordagem para detectar α-Enolase (ENO1, um biomarcador para câncer de pulmão) com limite de detecção de 2,38 pg/mL. Os autores construíram o biossensor amperométrico por meio da imobilização por adsorção física do anticorpo sobre eletrodo modificado com polietilenoglicol. Após a interação anticorpo-antígeno, o uso de nanopartículas modificadas com anticorpo possibilitou a detecção de ENO1. Neste caso, o sinal foi obtido primeiramente oxidando as nanopartículas em HCl 0,1 mol/L aplicando 1,2 V por 2 min., seguido da redução por voltametria de onda quadrada. Ensaios diretos sem o uso de marcadores podem ser alcançados utilizando superfícies modificadas com elemento de reconhecimento redox ativa, como enzimas. Por exemplo, Gonçalves *et al.*[74] desenvolveram um biossensor amperométrico para penicilina G por meio da imobilização da enzima penicillinase sobre eletrodo de ouro previamente modificado com L-cisteína. O biossensor responde ao analito na faixa linear de 10 a 50 nmol/L com limite de detecção de 4,5 nmol/L.

Diferentemente dos dois métodos eletroquímicos previamente discutidos, sensores potenciométricos são baseados na medida do potencial em uma célula eletroquímica entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência em condições no equilíbrio (i.e., com nenhuma ou negligenciável corrente elétrica). Em tal situação, a composição da célula permanece estável. Nessa técnica, a superfície sensível ao analito (eletrodo) reconhece o alvo e, por meio da alteração do potencial da célula (devido à interação antígeno-anticorpo que causa alteração na distribuição de cargas na superfície do eletrodo) pode-se mensurar a quantidade de analito. Por exemplo, Levon e colaboradores[75] desenvolveram um biossensor potenciométrico para detectar concentrações em níveis picomolares da proteína HAPLN1, uma espécie biomarcadora para câncer. Nesse caso, os pesquisadores não imobilizaram anticorpo para o reconhecimento da molécula alvo, mas "imprimiram" sobre a superfície do eletrodo a estrutura química do biomarcador (Figura 6). Para imprimir a identidade química (i.e., estrutura tridimensional e mapa de potencial), os autores preparam uma mistura contendo HAPLN1 e 0,1 mmol/L de 11-mercapto-1-undecanol e mergulharam o eletrodo de ouro nessa solução. A molécula alvo se adsorve na superfície juntamente com os tióis para formar um filme auto-organizado e empacotado. Após a incubação, as moléculas de proteína

alvo são “lavadas” da superfície do sensor, formando cavidades que são complementares em tamanho e formato, que podem interagir especificamente com o biomarcador HAPLN1.

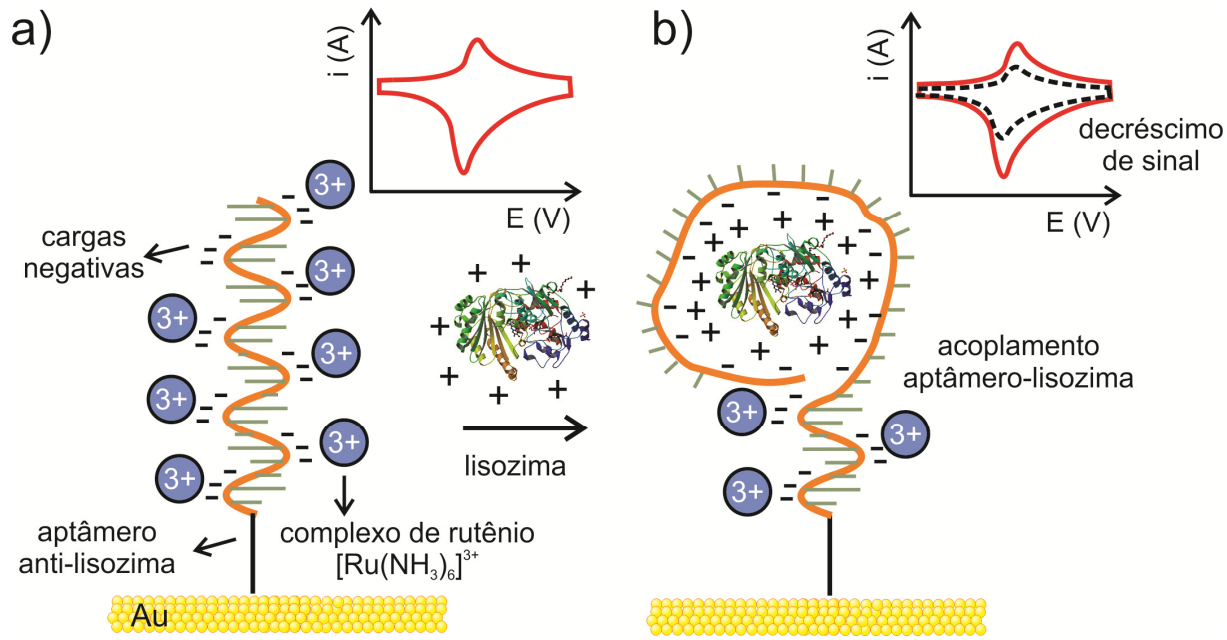


Figura 5 - Representação de um sensor voltamétrico para detecção de lisozima baseado no uso de aptâmero desenvolvido por Yu e colaboradores.[70] (a) Devido à estrutura negativa do aptâmero (imobilizado sobre eletrodo de ouro), o complexo de rutênio positivamente carregado interage eletrostaticamente com o aptâmero. Por meio de um ensaio de voltametria cíclica, foi possível verificar os picos de oxidação e redução do íon complexo (linha vermelha). (b) Após o acoplamento da lisozima positivamente carregada, a molécula neutraliza parcialmente as cargas negativas do aptâmero. Consequentemente, o íon complexo $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ se ligará somente onde a lisozima não se ligou, rendendo um decréscimo de sinal de pico de redução proporcional à concentração do analito, como mostrado no gráfico de voltametria cíclica (linha pontilhada).
Fonte: autor, adaptada da referência 70

Ismail *et al.*[76] desenvolveram um sensor potenciométrico para detectar concentrações micromolares de penilicilina. Os pesquisadores desenvolveram duas camadas de enzima para intensificar o sinal eletroquímico. A primeira camada foi obtida por meio da eletrodeposição de pirrol (Py) contendo penicilinase (P’nase). A segunda camada, além de Py e P’nase, penicilina (pen) foi incorporada durante a eletrodeposição de Py com o objetivo de obter um dispositivo estável e reprodutível. A partir dessa abordagem, os autores construíram um dispositivo capaz de detectar penicilina numa faixa linear de 7,5-146 µmol/L com limite de detecção de 0,3 µmol/L.

Recentemente, Tang e colaboradores[77] reportaram um immunosensor (biossensor que utiliza anticorpo como espécie de reconhecimento) para a detecção de α-fetoproteína (AFP) por meio de ensaio condutimétrico (i.e., alteração na condutância da solução) do tipo

sanduíche usando nanopartículas de carbono (CNPs) contendo anticorpos anti-AFT marcados com HRP (CNP-HRP-anti-AFP). Primeiramente, os autores eletrodepositaram nanopartículas de ouro seguida de modificação com anti-AFT. As nanopartículas de carbono modificadas com anticorpos foram obtidas pelo pré-tratamento das nanopartículas com solução contendo H_2SO_4/HNO_3 seguido da ativação com EDC/NHS,[78] da qual forma grupos éster-NHS para a ligação do anticorpo marcado com HRP. Após a imunorreação entre a amostra e o eletrodo modificado com as nanopartículas de ouro marcadas com anti-AFT, o sensor foi imerso na solução contendo CNP-HRP-anti-AFT. Posteriormente, o biossensor foi exposto a uma solução tampão PBS contendo H_2O_2 e KI. Desde que a enzima HRP catalisa reação que converte os íons I^- a I_2, um decréscimo na condutância da solução foi monitorado em função da concentração da molécula alvo. Por meio dessa abordagem, os pesquisadores obtiveram um ensaio que foi possível detectar o biomarcador na faixa linear de 0,1-500 ng/mL com limite de detecção de 50 pg/mL.

Biossensores do tipo transistores de efeito de campo (FET, *field-effect transistors*) são tipicamente compostos por dois eletrodos ou terminais (i.e., fonte, conhecido na literatura por *source*, e o dreno ou *drain*) separados por um curto canal de semicondutor recoberto com um terceiro, o *gate* (porta) do qual controla a condutância no canal.[4,79,80] O eletrodo *gate* pode ser modificado por meio da imobilização de anticorpos ou antígenos para a detecção do biomarcador ou, alternativamente, o elemento de reconhecimento pode ser ancorado diretamente no semicondutor.[80] O método de transdução é baseado no uso de um campo elétrico no *gate* que altera a condutividade no semicondutor.[79] Desde que anticorpos e antígenos são espécies carregadas, o reconhecimento biomolecular causa uma alteração na distribuição de carga no *gate* que modula a corrente no dispositivo FET. Como resultado, a interação antígeno-anticorpo pode ser detectada como uma alteração na corrente ou condutância no canal. Uma variação nesse método, um eletrodo do tipo "porta estendida" foi desenvolvido com a finalidade de intensificar a resposta à detecção do analito.[81] Ensaios sensíveis são reportados usando dispositivos do tipo FET hábeis para detectar proteínas biomarcadoras em níveis menores ou iguais a nmol/L.[47,79,82]

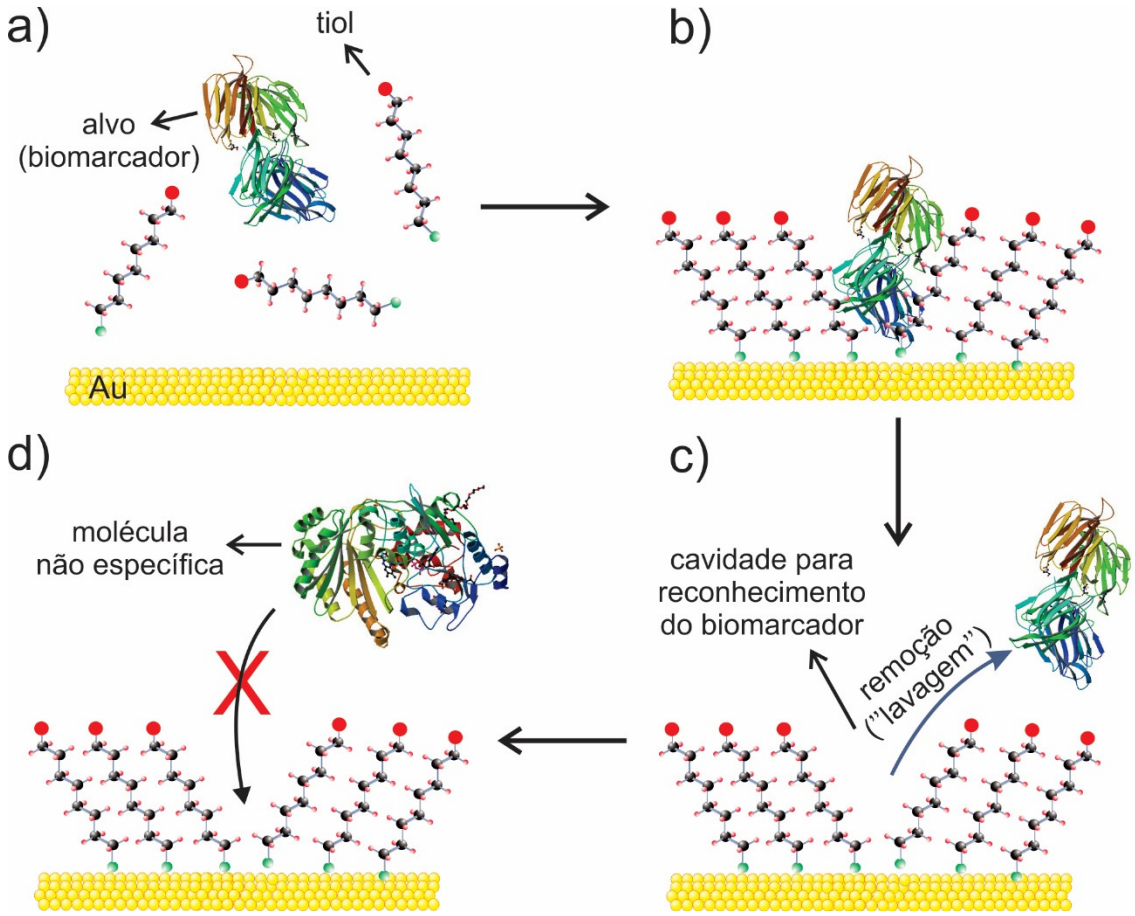


Figura 6 - Ilustração de um processo ideal de impressão molecular para detecção de moléculas alvo utilizando tiol, como descrito por Levon e colaboradores.[75] (a) Um eletrodo de ouro previamente limpo é mergulhado numa solução contendo o biomarcador (molécula alvo) e moléculas de tiol. (b) Ambas as moléculas se absorvem na superfície do eletrodo. (c) Após incubação, as moléculas alvo são "lavadas" da monocamada, formando cavidades que são seus complementares em tamanho e formato. (d) Estas cavidades são específicas às moléculas alvo.
Fonte: autor

Biossensores impedimétricos dos quais se incluem os faradáicos e não faradáicos são baseados na espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). Essa técnica é muita utilizada na caracterização de superfícies, transporte de carga e estudos de corrosão.[83-87] Quando aplicada em biossensores, ela apresenta pontos positivos tais como capacidade de miniaturização, multiplexação e alta sensibilidade.[9,38,88,89] Basicamente, a impedância é medida aplicando-se uma perturbação senoidal de potencial (~ 2-10 mV)[68] numa ampla faixa de frequências (100 kHz – 1 Hz). A resposta de corrente é então obtida e, dependendo se está ou não em fase com o potencial alternado (caracterizada pelo anglo de fase, φ),[38] é possível obter os comportamentos capacitivos e/ou resistivos do sistema (Figura 7a). Importante notar que a condição de linearidade da resposta da corrente devido à perturbação da voltagem (na faixa de frequências utilizada) deve ser satisfeita. Uma simples forma de verificar essa

condição é pelo ajuste dos dados experimentais utilizando circuitos equivalentes contendo combinação de resistores e capacitores (teste de Kronig-Kramers)[90] ou pelos gráficos de Lissajous.

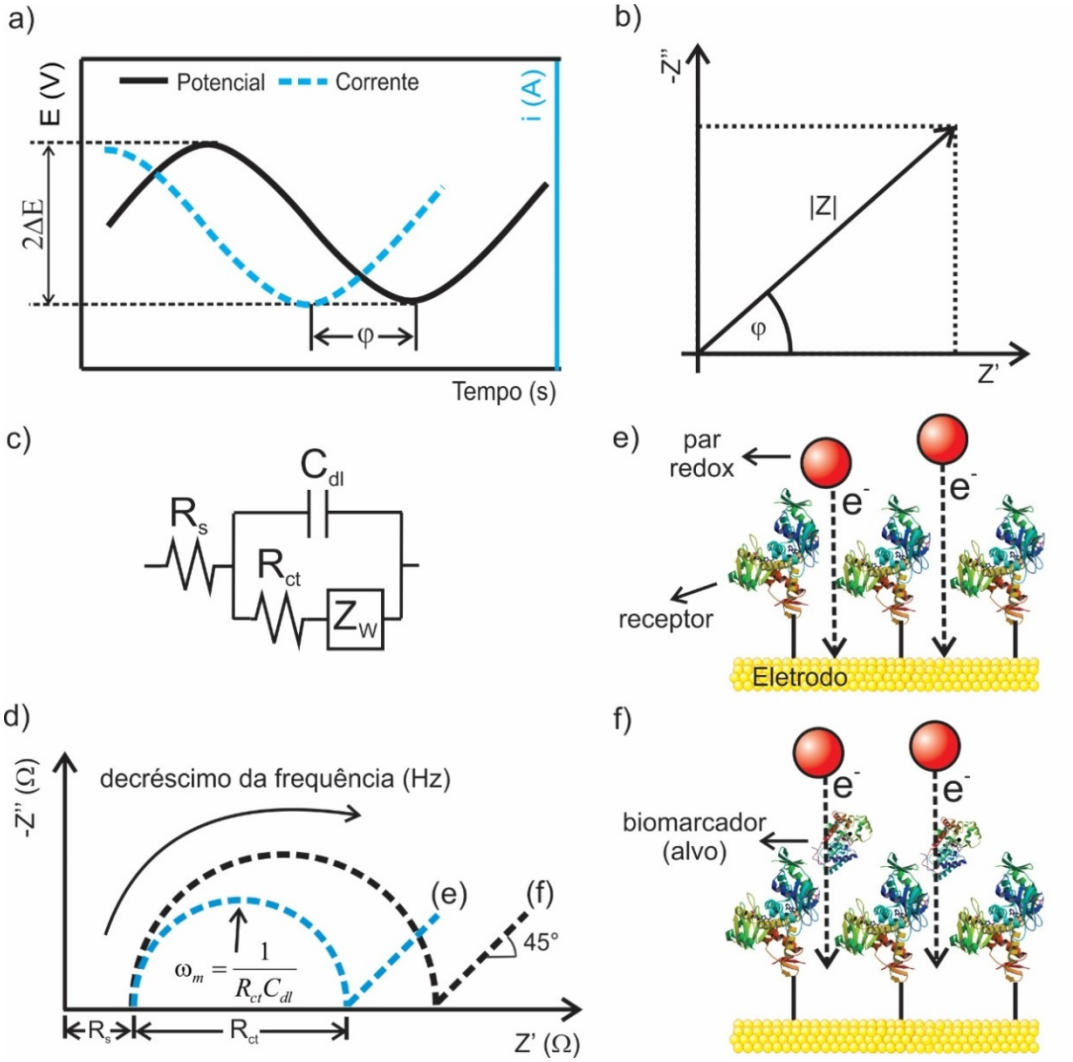


Figura 7 - Curvas e esquemas característicos da impedância eletroquímica. (a) Exemplo de um ensaio de impedância realizado numa única frequência $\boldsymbol{f}$. A perturbação senoidal (de amplitude ΔE) gera uma resposta em corrente com um anglo de fase $\boldsymbol{\varphi}$. (b) Gráfico de Nyquist representando o resultado mostrado em (a). Note que $\boldsymbol{Z^*(\omega) = Z' - jZ'', \omega = 2\pi f}$, $\boldsymbol{j = \sqrt{-1}}$ e $\boldsymbol{|Z| = \sqrt{(Z')^2 + (-Z'')^2}}$. (c) O circuito equivalente de Randles que é constituído pela combinação de resistores, um capacitor e a impedância de Warburg. Esse circuito gera um gráfico de Nyquist característico mostrado em (d), dos quais os valores de $\boldsymbol{R_S}$, $\boldsymbol{R_{ct}}$ e $\boldsymbol{C_{dl}}$ podem ser facilmente extraídos ($\boldsymbol{f_m}$ é a frequência relacionada com o máximo valor de $\boldsymbol{-Z''}$ no semicírculo). O processo difusional da espécie eletroativa (representado pela impedância de Warburg) é visualizado como uma linha reta com $\boldsymbol{\varphi = 45°}$ em baixas frequências. (e) Em um ensaio utilizando um biossensor impedimétrico, geralmente é adicionado uma espécie eletroativa em solução com o intuito de trocar elétrons com o eletrodo de trabalho quando determinados potenciais ou níveis de energia são atingidos. Quando um filme proteico é formado sobre a superfície do eletrodo, cria-se um impedimento à passagem de corrente, representado pela resistência à transferência de carga, $\boldsymbol{R_{ct}}$. Quando moléculas alvo interagem com o elemento de reconhecimento (f), a característica isolante do filme aumenta com consequente aumento de $\boldsymbol{R_{ct}}$. Os gráficos de Nyquist relacionados com as situações ilustradas em (e) e (f) são mostradas em (d).
Fonte: autor

Dispositivos impedimétricos baseados em impedância faradáica são utilizados em ensaios de afinidade (isto é, utilizando anticorpos, afímeros, aptâmeros e ácidos nucleicos como elementos de reconhecimento). Essa abordagem monitora a impedância da interface de um eletrodo modificado por meio da adição de uma espécie eletroquimicamente ativa na solução (geralmente íons complexos de ferro ou cobalto).[4,91] A análise da impedância é realizada por meio do ajuste dos dados experimentais (gráfico de Nyquist em que as parte imaginária é mostrada em função da parte real, i.e., $-Z''$ *versus* Z', Figura 7b) com um circuito equivalente apropriado, comumente composto por resistores e capacitores. Geralmente, em tal configuração experimental, quatro elementos são utilizados em um circuito para a compreensão da relação entre a perturbação do potencial alternado e a resposta de corrente, conhecido como circuito de Randles.[9,88,91] A resistência da solução (R_S), capacitância da dupla camada elétrica (C_{dl}), resistência à transferência eletrônica (R_{ct}) e impedância de Warburg (Z_W), Figura 7c. A resistência da solução está relacionada com a mobilidade dos íons em solução. A capacitância da dupla camada elétrica se origina quando um potencial é aplicado no eletrodo e íons (com cargas contrárias ao eletrodo) se aproximam da superfície, formando a dupla camada elétrica. Em alguns casos, esse elemento capacitivo pode ser descrito por um elemento de constante de fase ou CPE, do inglês *constant phase element*, para refletir características não ideais a um capacitor de placas paralelas (rugosidade na superfície e defeitos no filme, por exemplo).[88] A resistência à transferência eletrônica reflete a barreira eletrostática e/ou barreira isolante da espécie eletroativa em trocar elétrons com a superfície do eletrodo modificado[9] (quanto maior as características isolantes do filme, maior será a R_{ct}). Finalmente, a impedância de Warburg representa a difusão de íons na solução.[91] Para fins analíticos, utiliza-se a impedância faradáica com o monitoramento de R_{ct} em função da concentração do analito.[38]

Geralmente, devido às características isolantes do filme constituído da proteína alvo (originada da interação entre receptor-ligante), é esperado um aumento proporcional de valores de R_{ct} em função da concentração do alvo (ou logaritmo da concentração do alvo),[38] Figuras 7d-f. Utilizando esse conceito, Jiménez *et al*.[92] desenvolveram uma abordagem para a detecção do hormônio da progesterona (P4, uma biomolécula envolvida em muitos efeitos negativos à saúde quando presente em altos níveis no organismo). Os pesquisadores imobilizaram um aptâmero modificado com dissulfeto em eletrodo de ouro. Utilizando $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ como espécies eletroativas em solução, um aumento de R_{ct} em função da

concentração da molécula alvo foi observado. Essa metodologia possibilitou aos autores detectarem progesterona numa faixa linear de 10-60 ng/mL com limite de detecção de 0,90 ng/mL. Utilizando uma abordagem similar, Johnson *et al*.[93] desenvolveram um biossensor impedimétrico para quantificar proteína C-reativa (CRP, do inglês *C-reactive protein*, uma proteína relacionada com doenças cardiovasculares) em soro. Nesse caso, os pesquisadores imobilizaram o elemento de reconhecimento (anticorpo ou afímero) em uma superfície de ouro modificada com grupos carboxílicos para detectar CRP com limite de detecção na faixa picomolar (300-500 pmol/L).

Recentemente, Johari-Ahar e colaboradores[94] desenvolveram um ensaio impedimétrico para detectar o antígeno CA-125 (um biomarcador associado ao câncer de ovário) utilizando combinação de sílica recoberta com nanopartículas de ouro (AuNP@SiO_2) e pontos quânticos de CdSe (CdSe QDs) para amplificação de sinal analítico. A ideia dos pesquisadores, neste caso, foi em utilizar sucessiva conjugação de AuNP@SiO_2, CdSe QDs e anti-CA-125 para o intensificação de sinal de R_{ct} relacionado ao evento de reconhecimento (i.e., interação antígeno-anticorpo). Primeiramente, a superfície de ouro, após passar por protocolo de limpeza, foi funcionalizada com grupos carboxílicos terminais por meio do uso de tióis. AuNP@SiO_2 foi funcionalizada com grupo amina e posteriormente ligado ao eletrodo modificado utilizando protocolo EDC/NHS. QDs, que possuem grupos carboxílicos terminais, foram ligados ao eletrodo para formar AuNP@SiO_2|QDs. Finalmente, o anticorpo monoclonal anti-CA125 foi imobilizado ao eletrodo modificado com AuNP@SiO_2|QDs por meio do protocolo EDC/NHS. A conjugação das nanopartículas e dos pontos quânticos associado com anticorpo foi capaz de intensificar o sinal impedimétrico relacionado à resistência de transferência de carga das espécies eletroativas $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ (aumento em R_{ct} com o aumento da concentração da proteína alvo) em solução tampão PBS (pH 7,0), fornecendo um biossensor impedimétrico que responde linearmente na faixa de 0 - 0,1 U/mL e apresenta limite de detecção de 0,0016 U/mL.

Geralmente, um aumento no valor de R_{ct} é observado quando a molécula alvo se liga na superfície de reconhecimento (como exemplificado nas figuras 7d-f), mas essa não é uma regra geral. Por exemplo, Rodriguez e colaboradores[95] reportaram uma metodologia do qual a proteína alvo é monitorada com o decréscimo de R_{ct}. A hipótese é que a barreira eletrostática negativamente carregada entre o aptâmero (para detecção de lisozima) e as espécies eletroativas $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ diminui quando a lisozima catiônica (presente numa

condição em que o ponto isoelétrico, pI, é maior que o pH da solução, i.e., pH<pI) liga-se ao aptâmero e atenua a característica repulsiva da superfície. Consequentemente, ao invés de um aumento do R_{ct}, um decaimento nesse parâmetro foi observado. É importante notar que um decréscimo de R_{ct} no evento de ligação também pode ser alcançado por um fenômeno que permite a liberação de material do eletrodo de trabalho. Utilizando esse princípio, Liu *et al*.[96] desenvolveram um aptasensor para detecção de mucina-1 (MUC1, biomarcador para câncer de mama), utilizando $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ como espécies eletroativas em solução. Os autores imobilizaram DNA complementar (cDNA) modificado com tiol e capaz de interagir com aptâmero para MUC1 em eletrodo de ouro. Posteriormente, aptâmero modificado com nanopartículas de ouro (Apt@) foi hibridizado com o eletrodo funcionalizado com cDNA. Desta forma, quando as moléculas de MUC1 estão em contato com o eletrodo modificado cDNA|Apt@AuNPs, MUC1 forma um bioconjugado estável que é removido da superfície, levando a um decréscimo de R_{ct}. Essa metodologia possibilitou os autores detectarem MUC1 em uma faixa clinicamente útil de 0,5-10 nmol/L com limite de detecção de 0,1 nmol/L.

Diferentemente, impedância não-faradáica monitora alterações na capacitância do sistema relacionada com a ligação da molécula alvo e não requer o uso de espécie eletroativa em solução (uma característica importante para aplicações do tipo *point-of-care*). Basicamente, biossensores baseados em capacitância não-faradáica medem alterações nas propriedades dielétricas e distribuições de carga do filme (eletrodo de trabalho) causado pela ligação da molécula alvo na superfície de reconhecimento.[89] Um exemplo de uso dessa técnica pode ser encontrado no trabalho de Teeparuksapun *et al.* Neste caso, foi utilizado albumina de soro humano (HSA) como espécie alvo modelo e, por meio da imobilização de anticorpos específicos anti-HSA, foi possível detectar a molécula alvo com limite de detecção de 8 fmol/L. Outros exemplos de aplicação dessa abordagem podem ser encontrados na Tabela 1, que também resume demais exemplos do uso das diferentes técnicas eletroquímicas na detecção de biomarcadores, bem como a faixa linear e seus limites de detecção.[10,71-73,77,97-126]

Tabela 1 - Exemplos de biossensores eletroquímicos para detecção de diferentes biomarcadores. A técnica de capacitância eletroquímica (ou redox) será discutida na próxima seção.

Biomarcador	Doença	Abordagem eletroquímica	Faixa linear	Limite de detecção	Ref.
Alfa-enolase (ENO1)	Câncer de pulmão	Voltametria	0,001-10 ng/mL	0,00238 ng/mL	73
Alfa-fetoproteína (AFP)	Câncer	Condutometria	0,1-500 ng/mL	0,05 ng/mL	77
Antígeno carcinoembriônico	Câncer	Impedância faradáica	0,001-100 ng/ml	0,0001 ng/ml	97
		Potenciometria	2,5-75 ng/mL	N/A	98
		Amperometria	0-200 ng/mL	0,2 ng/mL	72
Antígeno específico prostático (PSA)	Câncer de próstata	FET	N/A	5 ng/mL	120
			0,09-5 ng/mL	0,075 ng/mL	121
		Impedância faradáica	0,001 – 0,1 ng/mL	0,001 ng/mL	122
		Voltametria	~0-1 ng/mL	0,25 ng/mL	123
Células de *Streptococcus piogenes*	Infecção bacteriana	Impedância faradáica	10 – 10000 células/µL	N/A	124
D-dímero	Trombose	Impedância faradáica	0,0001 - 2000 ng/mL	0,0001 ng/mL	104
Enolase neurônio-específica (NSE)	Câncer de pulmão	Voltametria	0,001-100 ng/mL	0,0003 ng/mL	118
Fator de crescimento do endotélico vascular (VEGF)	Câncer	Potenciometria	N/A	0,07 ng/mL	126
Fator-alfa necrose tumoral (TNFα)	Eventos cardíacos e inflamação	Capacitância	0,025- 25 ng/ml	0,032 ng/mL	101
Fosfatase ácida prostática humana (PAP)	Câncer de próstata	Capacitância redox	5-1000 ng/mL	1 ng/mL	103
Hemoglobina-A1c	Diabetes	FET	4000-18000 ng/mL	N/A	105
Imunoglobulina E (IgE)	Alergia	Condutometria	N/A	0,00056 ng/mL	109
Insulina	Diabetes	Capacitância	0,0006 – 1,20 ng/mL	0,0003 ng/mL	110
		Impedância faradáica	0,029-290 ng/mL	0,007 ng/mL	111
Interleuquina-6 (IL-6)	Câncer	Impedância faradáica	$1x10^{-8}$ - $1x10^{-4}$ ng/mL	$1x10^{-8}$ ng/mL	112
Mioglobina	Infarto agudo do miocárdio	Impedância faradáica	10 - 650 ng/mL	5,2 ng/mL	115
	Doenças cardiovasculares	Condutometria	1,4-2500 ng/mL	1,4 ng/mL	116
		Potenciometria	N/A	21240 ng/mL	117
Mucina 1 (MUC1)	Câncer	Voltametria	1–12 ng/mL	0,62 ng/mL	113
Murina 2 (MDM2)	Câncer cerebral	Impedância faradáica	0,001 – 1000 ng/mL	0,00029 ng/mL	114
Proteína C-reativa	Inflamação e eventos cardíacos	Capacitância	0,025 - 25 ng/ml	0,032 ng/mL	101
		Impedância faradáica	59-1180 ng/mL	31 ng/mL	10
			N/A	11 ng/mL	102
		Capacitância redox	5,9-11800 ng/mL	3,3 ng/mL	103
Proteína não estrutural 1 (NS1)	Dengue	Impedância faradáica	10-2000 ng/mL	3 ng/mL	119
Quitinase human (YKL-40)	Infeção, inflamação, fibrose e câncer	Capacitância	0,1-1000 ng/mL	0,07 ng/mL	107
Receptor do fator de crescimento epidérmico 2 (HER2)	Câncer de mama	FET	N/A	0,138 ng/mL	108
Trombina	Trombose	Voltametria	222-2220 ng/mL	111 ng/mL	71
		FET	N/A	~370 ng/mL	125
Troponina cardíaca humana I	Infarto agudo do miocárdio	Potenciometria	1-100 ng/mL	N/A	106
Troponina cardíaca T	Infarto agudo do miocárdio	Condutometria	$1x10^{-6}$ – 1 ng/mL	$1x10^{-6}$ ng/mL	99
		Voltametria	0,009-0,8 ng/mL	0,009 ng/mL	100

Fonte: autor

Além das tradicionais técnicas previamente discutidas, recentemente foi observado que monocamadas contendo grupos redox apresentam alteração de sinal capacitivo (quando submetidos a níveis de energia correspondentes ao seu potencial formal) quando utilizadas como transdução de sinal de reconhecimento biológico.[2] Esta técnica, que foi nomeada capacitância redox ou eletroquímica, mostrou-se viável na detecção de biomarcadores e com correspondente sensibilidade a técnicas tradicionais, como a impedância faradáica,[10] com a vantagem de não utilizar espécie eletroativa em solução. Neste contexto, essa tese de

doutorado se preocupou em utilizar essa abordagem para o desenvolvimento de novas plataformas eletroanalíticas para a detecção e quantificação de biomarcadores de interesse clínico. Neste caso, biomarcadores para a trombose (proteína D-dímero) e câncer (fosfatase ácida prostática e glicoproteína) foram utilizados. Além desse ponto, expandiu-se a aplicação dessa técnica para outros tipos de reconhecimento biomolecular, como lectina-carboidrato, importante para o desenvolvimento de vacinas e na compreensão de processos de invasão celular. Detalhes da técnica serão discutidos na próxima seção.

2.1 Capacitância redox ou eletroquímica

Quando uma superfície metálica mergulhada é polarizada em uma solução eletrolítica, surge o que é comumente conhecido como capacitância da dupla camada elétrica. Essa capacitância, que pode ser descrita pelo modelo de Gouy-Chapman-Stern (GCS), modela o sistema como sendo um eletrodo imerso em uma solução contendo íons (idealmente representados por esferas) diluídos em um solvente com momento dielétrico. Quando se aplica um potencial elétrico neste eletrodo, os íons e moléculas do solvente respondem ao potencial por meio de alterações da orientação e proximidade da superfície do eletrodo, gerando a capacitância da dupla camada (C_{dl}). Matematicamente, essa capacitância pode ser modelada pela combinação em série de dois capacitores: a capacitância de Helmholtz (C_H) que constitui uma camada compacta de moléculas de íons e de solvente; e a capacitância difusa (C_D) que descreve a dispersão iônica da solução em relação com a distância do eletrodo:

$$\frac{1}{C_{dl}} = \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_D} \quad (1)$$

No desenvolvimento de biossensores eletroquímicos, a superfície do eletrodo geralmente é modificada por uma monocamada automontada (SAM, do inglês *self-assembled monolayer*) para posterior imobilização do material biológico. Desta forma, a inclusão desta SAM sobre o eletrodo modifica essa capacitância, introduzindo as características dielétricas intrínsecas do próprio filme, e também devido à possibilidade de inclusão de íons e solvente dentro da monocamada. Góes[127] descreveu esta perturbação por meio da adição de um capacitor em série (C_b), resultando na capacitância da monocamada (C_m):

$$\frac{1}{C_m} = \frac{1}{C_{dl}} + \frac{1}{C_b} \tag{2}$$

Desde que C_b é a capacitância esperada do filme sem o ingresso de íons/solvente, a migração de íons/solvente no filme origina um fenômeno de relaxação que pode ser quantificado por dois termos relacionados em série, C_t e R_t. A resposta complexa dessa combinação em termos de capacitância em função da frequência [$C^*(\omega)$] pode ser descrita idealmente pelo modelo de relaxação de Debye ou, de forma mais realística, Cole-Cole:[127]

$$C^*(\omega) = C_m + \frac{C_t - C_m}{1 + (j\omega\tau_t)^{1-\alpha}} \tag{3}$$

sendo $j = \sqrt{-1}$, $\tau_t = R_t C_t$, sendo que $\alpha = 0$ para a condição ideal ou de Debye. Note que o circuito equivalente da equação (3) pode ser descrito como sendo C_m em paralelo com a combinação em série de C_t e R_t (i.e., o circuito de Debye), como mostrado na Figura 8.[127]

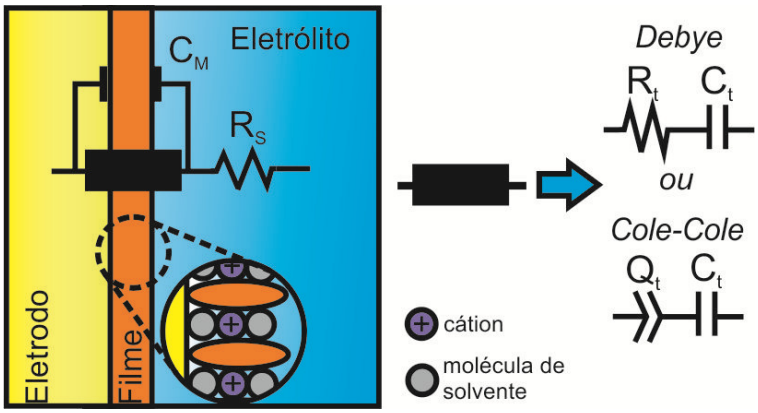


Figura 8 - Representação esquemática do modelo de Góes para a capacitância de um sistema com as propriedades de relaxação iônica. Note a existência de íons solvatados no filme. Essas características podem ser descritas pelo modelo de relaxação de Debye (ideal, $\boldsymbol{\alpha = 0}$) ou Cole-Cole ($\boldsymbol{\alpha \neq 0}$). No último caso, $\boldsymbol{R_t}$ assume uma distribuição de valores que pode ser representado por um CPE (elemento de constante de fase, $\boldsymbol{Q_t}$) definido por $\boldsymbol{Q_t(j\omega)^{-\alpha}}$ sendo $\boldsymbol{j = \sqrt{-1}}$ e $\boldsymbol{\omega}$ a frequência angular. Além disso, $\boldsymbol{C_m \ll C_t}$, de forma que $\boldsymbol{R_t}$ e $\boldsymbol{C_t}$ controlam a resposta dielétrica do filme. [17,127-130]
Fonte: autor

Se o eletrodo é modificado com um filme que possui uma entidade que pode ser carregada/descarregada (i.e., uma espécie eletroativa) surge um termo de carregamento adicional, comumente conhecido como pseudocapacitância. Importante notar que ambas as

contribuições de capacitância (capacitância da dupla camada e pseudocapacitância) estão presentes nesta configuração, mas a última é distintamente maior.

Recentemente, foi demonstrado experimentalmente em associação com simulações moleculares utilizando a Teoria do funcional da densidade (DFT, do inglês *Density functional theory*) que essa pseudocapacitância é uma manifestação da capacitância de ordem mesoscópica (i.e., dimensões atômicas/moleculares),[22] cuja definição foi primeiramente discutida por Marcus Buttiker.[131-134] A esta capacitância é designado o nome de capacitância redox ou eletroquímica (C_r), e surge da sobreposição energética da densidade de estados (DOS) da entidade redox [$g_r(E)$] presente no filme e da densidade de estados do eletrodo metálico [$g_m(E)$].[22,132,133] Também foi demonstrado que esta capacitância é uma combinação em série de duas distintas capacitâncias:

$$\frac{1}{C_r} = \frac{1}{C_e} + \frac{1}{C_q} \tag{4}$$

sendo $C_e = dq/dV$ a capacitância eletrostática (ou geométrica) originada por meio da separação de cargas, e C_q é a capacitância quântica, definida por Buttiker como: [131,133]

$$\frac{1}{C_q} = \frac{1}{e^2}\left(\frac{1}{g_m(E)} + \frac{1}{g_r(E)}\right) \tag{5}$$

sendo e a carga elementar. É importante notar que, desde que $g_m(E) \gg g_r(E)$, isto é, a densidade de estados eletrônica do metal é muito maior do que a densidade de estados da entidade redox, a capacitância quântica pode ser aproximada a:

$$C_q(E) = e^2 g_r(E) \tag{6}$$

Da equação 6, a capacitância quântica pode ser definida como uma função de distribuição dos estados (orbitais redox acessíveis) de um sistema energeticamente perturbável composto por, de um ponto de vista quântico, um finito DOS (entidade redox presente na SAM) associado a um infinito DOS (eletrodo). Essa função de distribuição segue a estatística de ocupação de Fermi-Dirac:

$$F_{FD}(E_r, \mu_e) = \frac{1}{1 + exp[(E_r - \mu_e)/k_B T]} \quad (7)$$

sendo k_B a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta, μ_e o potencial eletroquímico ($dE = -edV = d\mu_e$) e E_r o nível energético dos orbitais redox acessíveis. Note que F_{FD} é uma função de μ_e e E_r, i.e., o potencial do grupo redox controla a ocupação de acordo com o nível do potencial redox $\Delta G = E_r - \mu_e$.

Para um nível específico de energia, $n(\mu_e) = F_{FD} g_r(\mu_e) = F_{FD}\Gamma$, e a capacitância eletroquímica pode ser definida como:[133]

$$C_r(\mu_e) = \frac{dq}{dV} = \frac{edq}{edV} = \frac{e(edn)}{d\mu_e} = \frac{e^2 dn}{d\mu_e} = \frac{e^2 \Gamma df}{d\mu_e} = \frac{e^2 \Gamma}{k_B T} F_{FD}(1 - F_{FD}) \quad (8)$$

sendo n o número de centros redox ocupados e Γ o número de moléculas contendo grupos redox. Note que C_r é maximizado quando $F_{FD} = 1/2$ e $F_{FD}(1 - F_{FD}) = 1/4$, i.e., no potencial formal $E_{in} = (E_{ox} + E_{Red})/2$, sendo E_{ox} e E_{Red} os potenciais de oxidação e redução, respectivamente, da espécie eletroquimicamente ativa. Neste caso, a equação 8 pode ser escrita como:

$$C_r(\mu_e) = \frac{e^2 \Gamma}{4 k_B T} \quad (9)$$

Essa interface composta pelo filme contendo um grupo redox (que consiste no filme contendo características redox) pode ser descrita por um circuito equivalente, como mostrado na Figura 9.[127,135,136] Basicamente, o circuito é composto por dois braços: faradáico e não faradáico. A parte não faradáica está relacionada com a relaxação devido à migração iônica/solvente como discutido anteriormente. Por outro lado, a braço faradáico está exclusivamente relacionado com a redistribuição de elétrons por entre os orbitais energeticamente permitidos. Esse braço é composto por um termo resistivo (devido a perdas energéticas, R_{ct}) e capacitivo, C_r, que descreve a capacidade de armazenamento de energia elétrica do filme. Por meio da espectroscopia de capacitância, é possível resolver cada componente, simplesmente fornecendo energia ao sistema relacionado com o potencial E_{in} (potencial formal ou *redox in*) e outra com energia insuficiente para a transferência de

elétrons (*redox out*). O valor de capacitância eletroquímica pode ser facilmente obtido por meio da aproximação do diâmetro do semicírculo das curvas nos gráficos de Nyquist (Figura 9b).

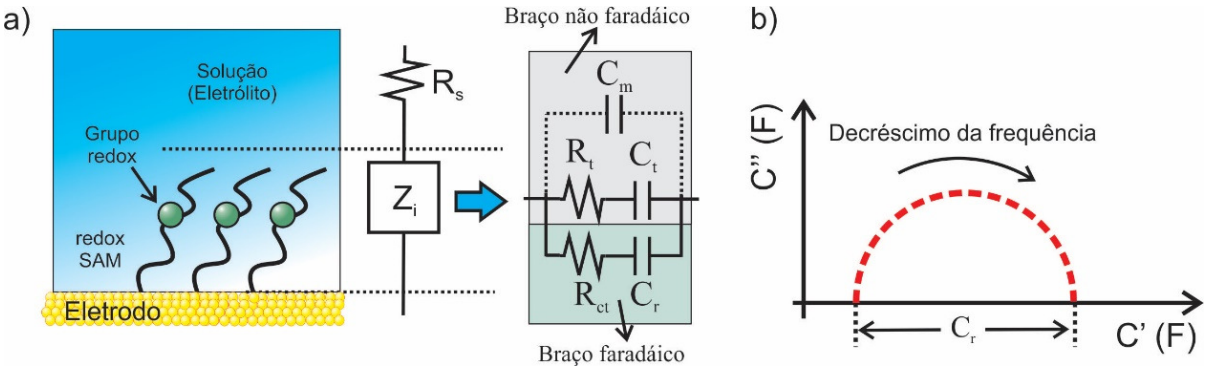


Figura 9 - Modelo explicativo da capacitância eletroquímica. (a) Representação esquemática da impedância interfacial do sistema composto por eletrodo modificado com monocamada (SAM) contendo espécie eletroativa mergulhada em solução eletrolítica. O circuito equivalente pode ser descrito pela resistência da solução ($\boldsymbol{R_S}$) em série com o elemento de impedância $\boldsymbol{Z_i}$. Esse elemento é composto por um braço não faradáico (associado com a relaxação iônica) e faradáico (exclusivamente relacionado com a transferência de elétrons entre o eletrodo e as espécies eletroativas). O braço faradáico, em termos de circuito equivalente, é composto pela capacitância redox ($\boldsymbol{C_r}$) e a resistência à transferência de carga ($\boldsymbol{R_{ct}}$). É importante notar que as contribuições faradáica e não faradáica podem ser resolvidas pela espectroscopia de capacitância. (b) Representação de um diagrama de Nyquist capacitivo para o circuito equivalente mostrado em (a), sendo $\boldsymbol{C_r \gg C_t \gg C_m}$. Em tais condições, a resposta de capacitância é predominantemente devido à $\boldsymbol{C_r}$, com valor que pode ser aproximado pelo diâmetro do semicírculo.
Fonte: autor

Interessante notar que a capacitância eletroquímica (ou mais especificamente DOS da entidade redox presente na monocamada) é sensível às influências do ambiente em que as entidades eletroativas estão presentes. Bueno e Davis, por exemplo, demonstraram recentemente que solventes utilizados na solução eletrolítica com altos valores de constante dielétrica causam maior polarização e dispersão energética em filmes formados por ferrocenil.[132,133] Essa influência também foi observada em eventos de biorreconhecimento entre antígeno-anticorpo,[2] tornando essa abordagem como uma potencial ferramenta para transdução de sinal e, consequentemente, para o desenvolvimento de biossensores. No último caso, Fernandes *et al.*[2] imobilizaram fisicamente anti-CRP sobre uma monocamada bifuncional contendo 11-ferrocenil-undecanotiol (tiol com grupo redox) e pentadecanotiol. Esta abordagem simples e *label-free* é baseada no inverso da variação da capacitância redox ($1/C_r$) e possibilitou a detecção de CRP (proteína C-reativa, um biomarcador para doenças cardiovasculares e inflamação) em baixas concentrações (faixa linear de 0,5-10 nmol/L) com

um limite de detecção de 200 pmol/L. É importante notar que essa abordagem se demonstrou tão sensível quanto a impedância faradáica, mas com a vantagem de não necessitar a adição de uma espécie eletroativa na solução.[10]

Posteriormente, aplicaram-se os mesmos princípios de engenharia de superfície (mistura de tióis, sendo que um deles contém grupo redox em sua estrutura) com o objetivo de utilizar, como sinal transdutor, as funções de imitância oriundas dos dados de impedância eletroquímica obtidos no potencial formal. Neste caso, as alterações nas propriedades elétricas da interface do eletrodo/solução foram monitoradas para cada função de imitância e, dentro de cada função, quais as frequências que apresentaram melhor limite de detecção e repetitividade.[24] A mesma ideia foi realizada utilizando espécie eletroativa em solução.[23] Basicamente, em ambos os casos a transdução de sinal do reconhecimento biológico para sinal elétrico foi realizado por meio do uso dos dados de impedância coletados numa ampla faixa de frequência. As funções complexas de imitância analíticas utilizadas são a impedância (*Z**), admitância (*Y**), capacitância (*C**) e módulo (*M**). As suas relações fasoriais são, considerando a impedância complexa como $Z^*(\omega) = Z' + jZ''$, sendo $j = \sqrt{-1}$ e $\omega = 2\pi f$:

$$C^* = 1/j\omega Z^* \quad (10)$$

$$Y^* = j\omega C^* = 1/Z^* \quad (11)$$

$$M^* = j\omega Z^* \quad (12)$$

Como pode ser observado, todas as funções de imitância estão relacionadas com a impedância e, desde que são complexas (possuem o módulo e partes real e imaginária) o conjunto de resultados constitui ao menos 12 diferentes parâmetros para cada frequência de perturbação. Em adição a estes parâmetros, geralmente são acrescentados outros baseados na relação entre as suas partes reais e imaginárias, e o inverso das partes reais e imaginárias da capacitância, como por exemplo, Z''/Z', C''/C', Y''/Y', M''/M', 1/C e 1/C''. Portanto, pode-se obter diferentes parâmetros analíticos para cada frequência de perturbação.

A resposta analítica (R) obtida para cada um desses parâmetros é avaliada em toda a faixa de frequência no ensaio utilizando anticorpo e o respectivo antígeno como analito. De forma a obter um sinal normalizado para cada parâmetro com o intuito de compará-los, o sinal relativo (RR) é mais conveniente. Desta forma, para certa frequência de perturbação f, o sinal relativo é definido como:

$$RR^{f}_{[analito]}(\%) = \left[\left(R^{f}_{[analito]} - R^{f}_{0}\right)/R^{f}_{0}\right] x\ 100 \quad (13)$$

sendo que R^{f}_{0} representa o sinal do branco (amostra sem analito) e $R^{f}_{[analito]}$ o sinal do parâmetro após expor o eletrodo na solução de analito (biomarcador) obtido na mesma frequência f. Desta forma, coletando n frequências é possível obter n sinais analíticos de reconhecimento para cada parâmetro, possibilitando avaliar qual frequência possui a melhor repetitividade (em termos de menor desvio-padrão relativo na análise em replicata).[23,137] Sem dúvida, essa abordagem permite obter um conjunto amplo de dados que possibilita otimizar o ensaio com relação ao tempo de análise sem prejuízo na repetitividade e nos limites de detecção. Desta forma, essa tese se preocupou em utilizar a capacitância eletroquímica como sinal transdutor para a detecção de importantes biomarcadores proteicos, bem como aplicar os conceitos da função de imitância no estudo de interação entre biomoléculas, com potencial aplicação em *glycoarray.*

3 JUSTIFICATIVA E OJETIVOS

Atualmente, a maioria dos métodos comerciais utilizados para a análise clínica é fundamentada nos métodos *label based*, que apresentam inconvenientes como alteração da afinidade entre o analito e o elemento de reconhecimento (devido à necessidade de marcação do analito), uso de anticorpos secundários marcados, falta de portabilidade e a necessidade de pessoal treinado para a execução dos ensaios; sendo o método ELISA um dos mais empregados. Muitas técnicas têm sido apresentadas como possíveis alternativas a esse tipo de análise, como QCM e SPR, por realizarem análise sem necessidade de marcação ou uso de espécies secundárias para análise (*label free*). No entanto, essas técnicas não apresentam, até o momento, grande sensibilidade de análise e a capacidade de miniaturização, sendo ineficientes quando se pretende desenvolver dispositivos para análise *point-of-care*. As técnicas eletroquímicas têm se mostrado fortes candidatas para o desenvolvimento de novas abordagens analíticas uma vez que são inerentemente miniaturizáveis, potencialmente multiplexáveis (i.e., mais de um ensaio ao mesmo tempo) e apresentam grande sensibilidade (com limites de detecção na ordem de nmol/L), características desejadas para o desenvolvimento de biossensores. Em especial, a técnica de capacitância eletroquímica tem se demonstrado como potencial abordagem para o desenvolvimento de dispositivos biossensores, apresentando como principal vantagem a possibilidade de realização de ensaios sem a necessidade de adição de espécie eletroativa em solução, necessária na abordagem por impedância faradáica. Neste contexto, esta tese teve como objetivo geral utilizar a técnica de capacitância eletroquímica para a construção de biossensores eletroquímicos por meio da imobilização de anticorpos (i.e., anti-PAP e anti-D dímero) e lectina (ArtinM), para a detecção de importantes biomarcadores de interesse clínico, como a proteína PAP (relacionada ao câncer de próstata), D-dímero (embolia pulmonar e trombose) e glicoproteína (câncer, e também em processos de interação celular).

Não obstante, a possibilidade de aplicar as funções de imitância como sinal transdutor (já utilizadas na detecção de biomarcadores proteicos utilizando anticorpos como elementos de reconhecimento) na interação do tipo lectina-glicoproteína também foi explorada com o

intuito de diminuir o tempo de aquisição (i.e., tempo necessário para a coleta de dados), com potencial aplicação em *glycoarray*.[c]

Como objetivos específicos, podem-se citar:

1. Estudar a formação da monocamada automontada mista de tióis por meio da técnica de voltametria cíclica e capacitância eletroquímica. O uso de monocamada automontada mista ou bifuncional se fez necessário para que fosse possível ancorar a espécie de reconhecimento (tiol contendo grupo carboxílico terminal), ao mesmo tempo em que possibilitasse a transdução de sinal sem a necessidade de adicionar para redox na solução (tiol contendo espécie eletroativa ancorada),
2. Analisar os passos da construção da superfície de reconhecimento, que envolvem a imobilização do elemento biológico (anticorpos para detecção dos biomarcadores PAP e D-dímero ou lectina ArtinM) e bloqueio (com BSA ou gelatina) por técnicas de microbalança a cristal de quartzo (QCM) e espectroscopia de impedância eletroquímica,
3. Construir curvas de calibração por capacitância eletroquímica e obter parâmetros analíticos como limite de detecção, sensibilidade, repetitividade e faixa linear (sinal analítico em função do logaritmo da concentração do biomarcador),
4. Utilizar o modelo da Isoterma de Langmuir para calcular a constante de afinidade entre a lectina ArtinM e a glicoproteína HRP, e comparar com as técnicas utilizadas na atualidade (QCM),
5. Utilizar as funções de imitância como sinal transdutor para o estudo da interação entre ArtinM-HRP, com o intuito de analizar sua potencial aplicação em glicobiologia (i.e., *glycoarray*).

[c] *Glycoarray* é uma técnica de grande importância na elucidação de processos biológicos envolvendo a interação entre proteínas e carboidratos, como os de sinalização e invasão celular.

4 PARTE EXPERIMENTAL

Antes de descrever os procedimentos, convém ressaltar que o cerne deste texto foi dividido em seções que descrevem as aplicações da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica em três vertentes: eletroanálise (seções 5.2 e 5.3), estudo de afinidade lectina-glicoproteína (seção 5.4) e uso das funções de imitância para o estudo da afinidade biomolecular (seção 5.5).

Embora os objetivos de cada seção sejam diferentes, a essência do trabalho não se altera. Por isso, preferiu-se descrever inicialmente a base metodológica utilizada de forma análoga no decorrer de toda a tese, a fim de evitar repetições e oferecer um texto focado nos principais resultados e conclusões.

4.1 Reagentes e soluções

A Tabela 2 resume os reagentes, a procedência e finalidade de cada substância utilizada. Para o preparado das soluções aquosas foi utilizado água Milli-Q do equipamento da Millipore Corp. (Simplicity System, Bedford, MA, US) com resistividade de 18,2 MΩ cm a 25°C.

A solução tampão fosfato salino (PBS) foi preparada dissolvendo, em 1L de solução, 0,20 g de $NaNO_3$, 8,01 g de NaCl, 0,20 g de KCl, 3,58 g de $Na_2HPO_4.12H_2O$ e 0,27 g de KH_2PO_4. Essa solução corresponde a 12 mmol/L de fosfato com pH 7,4 e foi armazenada em geladeira.

A solução de eletrólito de suporte foi preparada dissolvendo 3,42 g de perclorato de tetrabutilamônio (TBA) em 100,00 mL de acetonitrila e diluída até 500,00 mL de solução com água Mili-Q. A solução possui concentração igual a 20 mmol/L de TBA e ∼pH 7 (a 25°C) quando recém-preparada.

Soluções 0,5 M de NaOH e KOH foram preparadas dissolvendo 10,00 g e 15,59 g de NaOH e KOH, respectivamente, em 500,00 mL de água Mili-Q.

Ácido sulfúrico 0,5 M foi preparado pipetando-se 14,0 mL de ácido concentrado e diluindo em água Mili-Q até 500,00 mL de solução.

Tabela 2 - Substâncias, suas procedências e finalidades.

Substância ou fórmula e abreviação	Procedência	Finalidade
Aluminas (diâmetros de 1; 0,3; 0,05 µm)	Buehler	Polimento mecânico dos eletrodos de ouro da METROHM
Acetonitrila (grau HPLC)	Panreac	Solvente para preparação da solução de eletrólito de suporte
Perclorato de tetrabutilamônio (TBA)	Sigma	Eletrólito de suporte
Etanol anidro	Sigma	Solvente para o preparo das soluções de tiol
Anticorpo policlonal para fosfatase ácida prostática humana (Anti-PAP)	Sigma	Eletroanálise
Antígeno da Fosfatase ácida humana (PAP)	Sigma	
Anticorpo monoclonal para D-dímero (Anti-DD)	Sigma	
Antígeno do D-dímero (DD)	Sigma	
ArtinM	Conforme referência [138]	Lectina utilizada como modelo para estudo de afinidade e eletroanálise.
Horseradish peroxidase (HRP) Peroxidase de raiz forte	Sigma	Glicoproteína utilizada para o estudo de afinidade com ArtinM e eletroanálise
Ácido Sulfúrico concentrado (95-98%)	Quemis	Solução aquosa 0,5 mol/L para limpeza eletroquímica dos eletrodos
11-ferrocenil-undecanotiol (11Fc)	Sigma	Tiol contendo espécie eletroativa para transdução de sinal
Ácido 16-mercaptohexadecanóico (16Mhx)	Sigma	Tiol utilizado para ancoragem da espécie receptora via ácido carboxílico
$HS\text{-}(CH_2)_{11}\text{-}EG_3\text{-}OCH_2\text{-}COOH$ (PEG-tiol)	Prochimia	Tiol com característica anti-incrustante utilizado para ancoragem da espécie receptora via ácido carboxílico.
N-hidroxisuccinimida (NHS)	Sigma	Ativação da superfície carboxílica da SAM (obtenção de éster) para ancoragem da espécie receptora
1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC)	Fluka	
Albumina de soro bovino (BSA)	Sigma	Bloqueio de sítios não específicos
Fetuína	Sigma	Proteína presente no sangue utilizada como teste negativo para avaliar a resposta inespecífica
Hidróxido de sódio (NaOH)	Sigma	Solução aquosa 0,5 mol/L para dessorção eletroquímica para limpeza do eletrodo de ouro
Hidróxido de potássio (KOH)	Sigma	Solução aquosa 0,5 mol/L para caracterização da SAM: determinação da densidade molecular superficial (Γ, mol/cm^2)
Hidróxido de amônio	Synth	Limpeza dos cristais de quartzo
Peróxido de hidrogênio	Quemis	
Cloreto de sódio (NaCl)	Sigma	Preparação da solução tampão fosfato-salino (pH 7,4)
Nitrato de sódio ($NaNO_3$)	Sigma	
Cloreto de potássio (KCl)	J.T. Baker	
Monohidrogenofosfato de sódio dodecahidratado ($Na_2HPO_4.12H_2O$)	Sigma	
Dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)	Sigma	
Gelatina	Synth	Bloqueio de sítios não específicos
Soro comercial humano	Sigma	Matriz biológica para eletroanálise

Fonte: autor

Para a formação das monocamadas automontadas, prepararam-se soluções estoque de 6 mmol/L de 11Fc (diluindo-se 2,3 mg 11Fc em 1,00 mL de etanol anidro), 6 mmol/L de 16Mhx (diluindo-se 1,7 mg em 1,00 mL de etanol anidro) e 2,5 mmol/L de PEG-tiol (diluindo alíquota de 1,2 µL em 1,00 mL de etanol anidro).

Para o acoplamento das espécies receptoras (anticorpos e lectina ArtinM) no eletrodo, foram preparadas soluções 0,1 mol/L de NHS (dissolvendo-se 0,0129 g em 1 mL de água Mili-Q) e 0,4 mol/L de EDC (dissolvendo-se 0,0783 g em 1 mL de água Mili-Q).

Para o preparo das soluções de anticorpos e antígenos, diluíram-se alíquotas de concentrações conhecidas fornecidas pelo fabricante com solução PBS até a concentração desejada. No caso dos anticorpos, a imobilização foi realizada com solução 1 µmol/L. As concentrações dos antígenos são diferentes para cada caso e, por isso, estão especificadas do

decorrer desse trabalho. Todas as soluções foram armazenadas em freezer (-18°C) como especificado pelo fabricante. Para a construção das curvas analíticas, os antígenos foram diluídos tanto em PBS como em soro comercial.

Solução estoque da lectina ArtinM foi gentilmente oferecida pelo Laboratório de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, sob responsabilidade da Prof. Dra. Maria-Cristina Roque-Barreira, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP). A concentração utilizada para o processo de imobilização foi de 0,15 mg/mL, dissolvida em tampão PBS. Soluções de HRP (de 0,5-100 nmol/L) foram preparadas em solução PBS. As soluções estoque ficaram armazenadas em freezer (-18°C).

Solução 0,1% de BSA foi preparada diluindo 1 mg da proteína em 1 mL de solução PBS. Solução estoque de Fetuína foi reparada a uma concentração de 20 µg/mL. Ambas as soluções foram armazenadas em freezer (-18 °C).

As soluções de tiol, EDC, NHS e as diluições de anticorpo, antígeno, lectina e glicoproteína eram preparadas imediatamente antes do uso.

4.2 Equipamentos

As medidas de pH foram realizadas utilizando o pHmetro da ION modelo pHB500, que era calibrado antes do uso.

As medidas eletroquímicas foram conduzidas no potenciostato da AUTOLAB (PGSTAT30) com módulo FRA controlado pelo software NOVA. O sistema de medidas se baseou na configuração de três eletrodos, sendo o eletrodo de ouro (2,0 mm de diâmetro e área de 0,03142 cm^2) obtido da METROHM, uma placa de platina como contra-eletrodo e eletrodo de Ag|AgCl (KCl saturado) como eletrodo de referência. Todos os potenciais descritos neste texto são relativos ao eletrodo Ag|AgCl (KCl saturado).

Os resultados das medidas piezelétricas foram obtidos utilizando a microbalança a cristal de quartzo da Q-SENSE, controlado pelo software QSoft. Os cristais de quartzo utilizados (corte AT) possuem 14 mm de diâmetro e frequência fundamental de oscilação de ~5MHz (eletrodos de ouro, modelo QSX-301, com constante de Sauerbrey de $C = 17{,}7\ ng\ cm^{-2}\ Hz^{-1}$). A célula utilizada foi a de fluxo (Modelo QFM-401), que permite utilizar pequenas alíquotas de soluções para estudo (~200 µL). As soluções foram injetadas

na célula por meio de uma bomba peristáltica ISMATEC, modelo de quatro canais, a um fluxo de 100 µL/min. Os valores de massa acoplada ao movimento oscilatório do cristal foram obtidos de acordo com a relação $\Delta m = -C\Delta f$.[11]

Imediatamente antes do uso, os cristais de quartzo eram limpos seguindo o procedimento de três etapas: a primeira consiste em expor a face do eletrodo a ser funcionalizada em uma atmosfera rica de ozônio (UV Ozone proCleaner™) por 10min. Após, os cristais era lavados com água Milli-Q e mergulhados em solução piranha básica (5:1:1 de água Milli-Q, hidróxido de amônio 25% e peróxido de Hidrogênio 30%, v/v/v) a 75 °C por 5 minutos. Finalmente, os eletrodos eram novamente expostos ao ozônio por 10 minutos, lavados com água e secos com nitrogênio.

4.3 Medidas eletroquímicas

Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e voltametria cíclica (VC) foram utilizadas na caracterização de todas as etapas de construção de superfície receptiva. Para a realização dos ensaios, o eletrólito suporte foi uma solução 20 mM de TBA dissolvido em acetonitrila e H_2O (20:80, v/v), borbulhado por 20 min. em nitrogênio antes do uso. Não foi utilizada espécie eletroativa em solução. VC foi realizada na faixa de potencial entre 0,0 - 0,7 V, a velocidade de varredura de 0,1 V/s. Adicionalmente, as medidas de EIE foram realizadas em uma faixa de frequência de 100 mHz a 100 kHz no potencial formal (região redox), obtidos pela média aritmética do potencial de oxidação e redução; com amplitude de perturbação de 10 mV (pico a pico). Medidas de EIE também foram realizadas no potencial de 0,1 V (região de potencial sem atividade redox). Todas as medidas foram realizadas em replicata (no mínimo quatro vezes).

Experimentalmente, os resultados de capacitância ($C^*(\omega)$) foram obtidos convertendo os dados da impedância complexa em função da frequência ($Z^*(\omega)$), utilizando a relação $C^*(\omega) = 1/j\omega Z^*(\omega)$, sendo ω a frequência angular e $j = \sqrt{-1}$. A parte real C' e imaginária da capacitância, C'', foram obtidas utilizando as relações:[23]

$$C'(\omega) = \frac{Z''}{\omega|Z|^2} \tag{14}$$

$$C''(\omega) = \frac{Z'}{\omega|Z|^2} \quad (15)$$

Para determinar as demais funções complexas de imitância utilizadas neste trabalho (admitância, *Y** e módulo, *M**) para o estudo da afinidade entre lectina-glicoproteína, utilizaram-se as seguintes relações (já descritas nas relações 11 e 12 na seção 2):[23]

$$Y^* = j\omega C^* = 1/Z^* \quad (11)$$

$$M^* = j\omega Z^* \quad (12)$$

4.4 Limpeza e caracterização da superfície de ouro para as medidas eletroquímicas

Para a obtenção da superfície para formação da monocamada automontada de tiol (SAM), o eletrodo era primeiramente polido mecanicamente com diferentes tamanhos de alumina, em ordem decrescente de diâmetro (1,0 µm, 0,3 µm e 0,05 µm). No intervalo de cada polimento, o eletrodo era exaustivamente lavado com água e sonicado em água Milli-Q por 5 min. para retirar partículas adsorvidas.

Após esta etapa, processo de dessorção eletroquímica em meio básico era realizado. Para isto, após montar a célula com três eletrodos (sendo o eletrodo de ouro o de trabalho) e utilizando solução 0,5 mol/L de NaOH (recém borbulhada em nitrogênio por 15 min.), aplicava-se potencial de -1,7 a -0,7 V a 100 mV/s (x Ag|AgCl), 400 ciclos. Um exemplo de voltamograma típico é mostrado na Figura 10a. O eletrodo era então retirado da célula, lavado com água e mergulhado em etanol anidro por 20 minutos.[139] Finalmente, o eletrodo era seco e colocado novamente na célula eletroquímica, só que agora aplicava-se um potencial de -0,2 V a 1,5 V, com velocidade de varredura de 100 mV/s (xAg|AgCl) utilizando solução 0,5 mol/L de ácido sulfúrico, 25 ciclos. A área do eletrodo foi calculada de acordo com o trabalho de Oesch e Janata,[140] do qual considera a carga de 482 µC/cm^2 como sendo a necessária para reduzir uma monocamada de óxido de ouro quimicamente adsorvida na proporção de 1:1 entre ouro:oxigênio.[140] Para o cálculo da área ativa do eletrodo, utilizou-se a área do pico de redução em $\sim$ 1,1 V x Ag|AgCl (Figura 10b), sendo que a carga Q é dada pela relação:

$$Q = \frac{1}{v}\int i.V'.dV' \tag{16}$$

sendo i a corrente, V' o potencial do eletrodo *versus* o de referência, e v a velocidade de varreduta (0,1 V/s). A área do eletrodo (A_e, em cm^2) foi calculada utilizando a relação:

$$A_e = \frac{Q}{482x10^{-6}} \tag{17}$$

O fator de rugosidade (F_r) foi obtido dividindo-se a área obtida na relação 17 pela área geométrica do eletrodo (0,03142 cm^2). Apenas os eletrodos com fatores de rugosidade entre 1,1 e 1,5 ($1{,}1 \leq F_r \leq 1{,}5$) foram utilizados neste trabalho, uma vez que a construção de monocamadas compactas e de maior reprodutibilidade é obtida utilizando superfícies com poucos defeitos ou de menor rugosidade.[d]

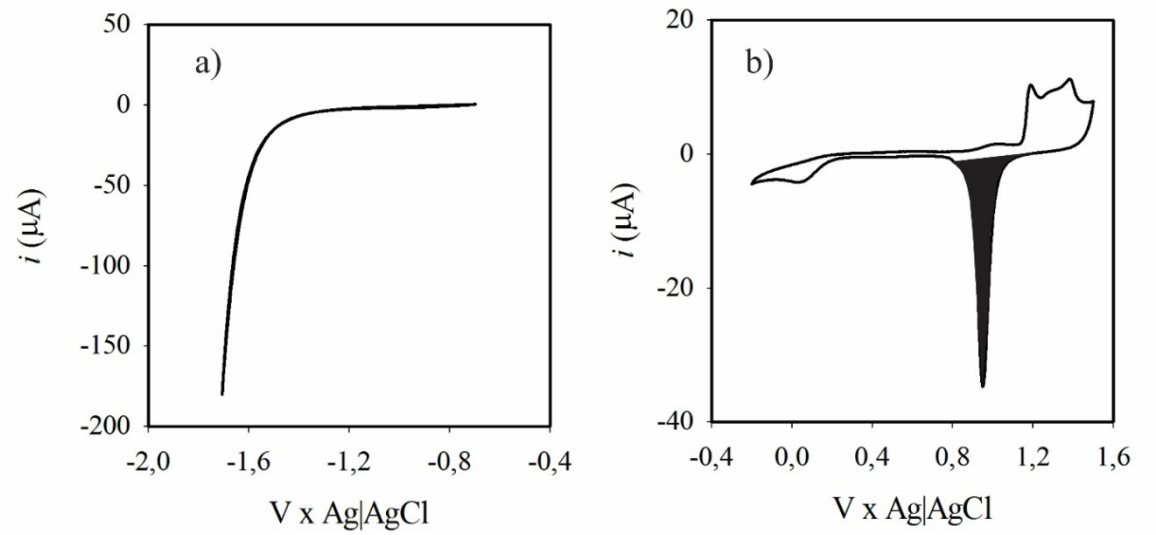


Figura 10 - Voltamogramas típicos para o processo de limpeza do eletrodo de ouro. (a) Voltamograma típico obtido na etapa de dessorção eletroquímica utilizando solução 0,5 mol/L de NaOH. Faixa de potencial -1,7 a -0,7 V (x Ag|AgCl), 100 mV/s, 400 ciclos. (b) Exemplo de voltamograma obtido no processo de limpeza eletroquímica da superfície de ouro (25° ciclo), utilizando solução de H_2SO_4 0,5 mol/L. Faixa de potencial -0,2 a 1,5 V (x Ag|AgCl), 100 mV/s, 25 ciclos. A área hachurada indica a região utilizada para o cálculo da área do eletrodo, $\boldsymbol{A_e}$, conforme relação 17.
Fonte: autor

[d] BENITES, T. A.; RIBEIRO, W. C.; GÓES, M. S.; FERREIRA, A. A. P.; BUENO, P. R. Efeitos da rugosidade nas propriedades de passivação de monocamadas orgânicas automontadas. **Química Nova**, v. 37, n. 9, p. 1533-1537, 2014.

4.5 Formação e caracterização das monocamadas automontadas (SAM)

Após a limpeza do eletrodo de ouro, ele era imediatamente mergulhado em solução recém preparada do tiol por 16h (25 °C), obtida a partir das soluções descritas na seção 4.1 por diluição até a concentração total de 2 mmol/L. Posteriormente, o eletrodo era lavado com etanol, água e seco com nitrogênio.

Para verificar a imobilização do tiol, foram realizadas medidas de voltametria cíclica e impedância eletroquímica. As medidas de voltametria cíclica foram realizadas varrendo o potencial de 0,1 a 0,7 V a uma velocidade de varredura de 0,1 a 1,0 V/s. No voltamograma obtido a 0,1 V/s foi obtido o potencial formal (média aritmética dos potencias de redução e oxidação), bem como a área de pico de oxidação para o cálculo da densidade molecular superficial (Γ, mol/cm^2) do 11Fc na SAM bifuncional. Para este cálculo, o valor da carga foi obtida a partir da relação 16 e, de acordo com equação de oxirredução do 11Fc ($Fc^+ + e^- \rightleftarrows Fc$), apenas um elétron por molécula participa do processo ($n = 1$):

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA_e} \tag{18}$$

sendo F a constante de Faraday (96.485 C/mol) e A_e a área ativa do eletrodo obtida na seção 4.4.

A densidade molecular superficial do 11-ferrocenilundecanotiol (Γ_{11Fc}) também foi determinada utilizando as correntes de pico de cada velocidade de varredura (v), de acordo com a equação 19:[e]

$$i_p = \frac{n^2F^2A_e v\Gamma_{11Fc}}{4RT} \tag{19}$$

Por meio da equação 19 e considerando $n = 1$, observa-se que a intensidade da corrente de pico é diretamente proporcional à velocidade de varredura. Em termos práticos, os dados experimentais plotados na forma $i_p x\ v$ fornece uma reta com coeficiente angular (a) igual a $a = F^2A_e\Gamma_{11Fc}/4RT$. Desta forma, Γ_{11Fc}pode ser estimada como:

[e] ECKERMANN, A. L.; FELD, D. J.; SHAW, J. A.; MEADE, T. J. Electrochemistry of redox-active self-assembled monolayers. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, p. 1769-1802, 2010.

$$\Gamma_{11Fc} = \frac{4RTa}{F^2 A_e} \quad (20)$$

sendo R a constante dos gases ideiais (8,31 J/K.mol), T a temperatura absoluta, F a constante de Faraday e A_e a área ativa do eletrodo.

Para efeito comparativo, Γ_{11Fc}também foi estimado por capacitância redox, de acordo com a relação 9 e reescrita na equação 21:[133]

$$\Gamma_{11Fc} = \frac{4C_r K_B T}{eF} \quad (21)$$

sendo C_r a capacitância eletroquímica (diâmetro do semicírculo do diagrama de Nyquist capacitivo), K_B a constante de Boltzman, T a temperatura absoluta, e a carga elementar (1,6 x 10^{-19} C) e F a constante de Faraday.

A densidade molecular superficial total de tiol (Γ_{SAM}) foi determinada por meio da dessorção eletroquímica em meio básico utilizando solução 0,5 mol/L de KOH (voltametria cíclica realizada na faixa de potenciais de -1,4V a -0,8V; 0,1V/s), visto que as moléculas de tiol se dessorvem da superfície em potenciais negativos de acordo com a relação $RS - Au + e^- \rightarrow RS^- + Au^0$.[139,141] Para o cálculo Γ_{SAM}, foi utilizada a equação 18, com $n = 1$, sendo que a carga foi determinada pela integração do pico de redução obtido nos voltamogramas, como exemplificado na Figura 11.

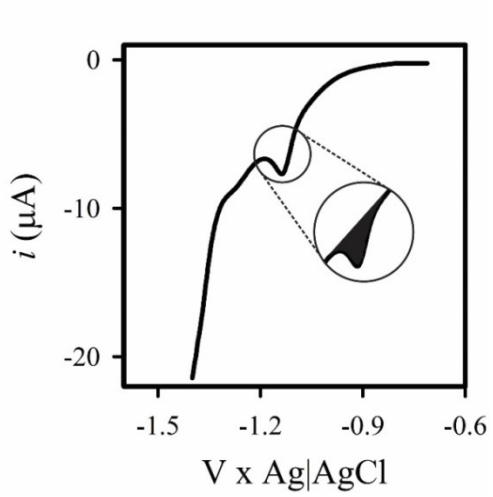


Figura 11 - Voltamograma típico para o processo de dessorção do tiol da superfície de ouro. O pico de redução pode ser utilizado para estimar o valor da densidade molecular superficial (mol/cm^2) da SAM em ouro. Para o cálculo da carga correspondente, utilizou-se a área do pico (equação 16).
Fonte: autor

4.6 Imobilização do material biológico e caracterização da superfície

Após a caracterização da SAM, o filme era ativado com solução aquosa mista contendo EDC/NHS, preparada a partir das soluções descritas na seção 4.1 na proporção de 1:1 de EDC:NHS. Para a ativação, o eletrodo era mergulhado na solução de EDC/NHS por 30 min. Após, o eletrodo era lavado com água e mergulhado em solução do material biológico (i.e., elemento de reconhecimento) a 1 µmol/L (no caso da imobilização dos anticorpos) ou 15 mg/mL (no caso da lectina ArtinM) por 1 hora.

Para o bloqueio dos sítios remanescentes, era utilizada solução de BSA (ensaios com antígenos como analito) ou gelatina (HRP como analito), ambas a 0,1% (m/v).

Medidas de impedância eram realizadas no potencial *in* (potencial formal) obtido anteriormente (seção 4.3) para acompanhar a modificação da superfície com a adição de analito, como descrito na próxima seção.

4.7 Construção das curvas analíticas

Após o bloqueio dos sítios remanescentes do eletrodo com solução a 0,1% de BSA ou gelatina, os eletrodos eram expostos a soluções de diferentes concentrações de analito por 30 min. e, após, medidas de impedância no potencial formal eram realizadas.

O Limite de Detecção (LD) foi calculado de acordo com a norma da IUPAC, que consiste em determinar a concentração de analito com resposta igual ao desvio-padrão do branco (solução sem analito) multiplicado por 3,3, enquanto o Limite de Quantificação (LQ) por 10.[142] O desvio-padrão relativo (DPR) foi calculado pelo quociente entre o desvio-padrão (σ) e a média ($\bar{x}$), $DPR = \sigma/\bar{x}$, e foi utilizado como ferramenta para analisar a repetitividade.

As curvas analíticas foram construídas tendo como sinal transdutor o inverso da capacitância redox ($1/C_r$). Neste caso, a resposta do sinal (S) frente à concentração do analito era calculada como $S = 1/C_{r[analito]} - 1/C_{r(branco)}$ ou, alternativamente, como o porcentual de resposta de $1/C_r$ em relação à resposta do branco: $S_{[analito]}(\%) = 100 * S/(1/C_{r(branco)})$. Para o caso das funções de imitância, foram utilizadas como sinal analítico: |Z|, Z', Z'', |C|, C', C'', |Y|, Y', Y'', |M|, M', M'', Z''/Z', C''/C', Y''/Y', M''/M', 1/C e 1/C''. Portanto, obtiveram-se 18 diferentes parâmetros analíticos para cada frequência de

perturbação. Como forma de normalizar cada sinal de transdução, o sinal relativo (RR) foi utilizado. Desta forma, para certa frequência de perturbação f, o sinal relativo foi definido como (relação 13, seção 2):

$$RR^{f}_{[analito]}(\%) = \left[\left(R^{f}_{[analito]} - R^{f}_{0}\right)/R^{f}_{0}\right] x\ 100 \tag{13}$$

sendo que R^{f}_{0} representa o sinal do branco (amostra sem analito) e $R^{f}_{[analito]}$ o sinal do parâmetro após expor o eletrodo na solução de analito (biomarcador) obtido na mesma frequência f.

4.8 Cálculo da constante de afinidade utilizando o modelo da Isoterma de Langmuir

Considerando o modelo da Isoterma de Langmuir, o equilíbrio entre as moléculas livres de glicoproteína (G) e lectina (L) e o complexo glicoproteína-ligante ($G - L$) pode ser escrito pela equação 22:[143]

$$G + L \rightleftharpoons G - L \tag{22}$$

A constante de afinidade (K_a) para esse processo é dado pela equação 23:

$$K_a = \frac{[G - L]}{[G][L]} \tag{23}$$

sendo que [ ] representa concentração da espécie. Assumindo que porcentual de ocupação da espécie na superfície é dado por θ e o porcentual dos sítios livres por $1 - \theta$, equação 23 pode ser reescrita como:

$$K_a[G] = \frac{\theta}{1 - \theta} \tag{24}$$

Isolando o termo θ da equação anterior, pode-se encontrar:

$$\theta = \frac{K_a[G]}{1 + K_a[G]} \tag{25}$$

Desde que o sinal de transdução S (que pode ser tanto por capacitância eletroquímica, como por funções de imitância, seção 4.7) corresponde à quantidade de ligante adsorvido na superfície (subtraindo a contribuição do sinal do branco), pode-se afirmar que S é proporcional à densidade molecular superficial (Γ, mol/cm^2). Assumindo que $S = \theta S_m$, sendo S_m a máxima resposta da adsorção quando θ se aproxima da unidade, pode-se deduzir que:

$$S = \frac{S_m K_a[G]}{1 + K_a[G]} \tag{26}$$

Que, por conveniência, pode ser reescrita para forma de resposta linear:

$$\frac{[G]}{S} = \frac{[G]}{S_m} + \frac{1}{K_a S_m} \tag{27}$$

Portanto, K_a pode ser obtido pelo quociente entre os coeficientes angular ($1/S_m$) e linear ($1/K_a S_m$) da função $[G]/S$ *versus* $[G]$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação dos ensaios de espectroscopia de impedância eletroquímica

Quando iniciamos o trabalho em pesquisa utilizando uma técnica que nos é desconhecida, geralmente fazemos uso da literatura científica para alicerçar o planejamento experimental. No caso da construção de biossensores eletroquímicos, a procura de protocolos de funcionalização de eletrodos e a busca por parâmetros operacionais da técnica que se pretende utilizar são exemplos dessa preocupação. Entretanto, quando se trabalha com espectroscopia de impedância eletroquímica, geralmente os artigos científicos contêm ricos dados experimentais demonstrando o seu uso para variados fins analíticos, mas não é tratado um ponto fundamental: sua validação. Talvez isso ocorra, pois alguns protocolos, em especial em impedância faradáica (utilizando espécie eletroativa em solução), são muitos comuns e amplamente utilizados e referenciados, sendo desnecessária tal preocupação (ou seja, em algum momento tal procedimento foi validado), ou talvez os dados experimentais sejam na verdade analisados, mas não reportados na literatura. Não obstante, muitos dos protocolos apresentados na literatura podem ser ajustados com circuitos equivalentes, o que de certa forma pode ser evidência de validação de resultados, embora não completamente.

A validação dos resultados de impedância eletroquímica se faz necessária, pois algumas condições ou premissas iniciais devem ser satisfeitas. Nesta técnica, como descrito na seção 2, faz-se o uso de perturbação senoidal de potencial (em torno do potencial DC) em função do tempo (cuja função pode ser escrita como função seno) e analisa-se a resposta de corrente, também senoidal. Dentre as condições que devem ser satisfeitas em função da aplicação do potencial, pode-se citar a causalidade (a resposta deve estar relacionada apenas ao sinal de excitação), linearidade (a resposta é linear quando a perturbação é pequena o suficiente) e estabilidade (o sistema não sofre mudanças quando o ensaio de impedância está sendo realizado). Neste aspecto, se o sistema se altera, os ensaios não serão confiáveis.

O teste de Kronig-Kramers (KK)[f] pode ser utilizado para avaliar se o sistema é estável no tempo (no que se refere ao tempo de análise) e linear, ambas condições necessárias para o ajuste matemático de dados utilizando circuitos equivalentes. Se o sistema se altera no

[f] ESTEBAN, J. M.; ORAZEM, M. E. On the application of the Kramers-Kronig relations to evaluate the consistency of electrochemical impedance data. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 138, p. 67-76, 1991.

tempo, significa que os dados coletados no início do ensaio (realizado em altas frequências) não concordam com os dados no final do experimento (baixas frequências), e o teste KK falha. Nesta avaliação, os dados são ajustados utilizando um circuito especial que satisfaz a relação de Kronig-Kramers (sistema contendo um circuito RC em série) e avalia-se o resultado da soma dos quadrados dos resíduos (χ^2) do ajuste frente aos resultados experimentais. Desta forma, todos os dados coletados no andamento nesta tese foram avaliados utilizando o teste KK, dos quais os resultados foram analisados de acordo com o valor de χ^2, adotando o critério de que valores maiores do que 10^{-4} devem ser recusados.[g] Neste caso, os resultados apresentados nesta tese apresentaram valores menores do que 10^{-4} (exemplo de ajuste utilizando o teste de Kronig-Kramers é mostrado na Figura 12).

Outra forma de analisar o desvio do teste de Kronig-Kramers é avaliar o erro nos parâmetros reais e imaginários em função da frequência (Figura 12c). De fato, pode ser verificado que o erro não foi maior do que 8% para a parte real (em baixa frequência) e do que 4% para a parte imaginária (em alta frequência) da impedância.

Outra forma de analisar a linearidade da resposta de corrente devido ao potencial aplicado é por meio da curva de corrente-potencial ou pelo gráfico de Lissajous[5] (Figura 13). Por meio da curva de corrente-potencial pode ser verificado que a perturbação do potencial, não maior que 15 mV em torno do potencial formal, oferece uma resposta linear de corrente. De fato, os gráficos de Lissajouis apresentam simetria com respeito ao centro do gráfico, característico de sistema de resposta linear (o ângulo de fase não se altera durante o ensaio de impedância na frequência específica, i.e., ângulo de fase constante no intervalo de tempo no *período* da perturbação). Essa análise também foi realizada para os demais dados mostrados nesta tese. Os resultados que não apresentaram os critérios de linearidade (Kronig-Kramers e Lissajous), causalidade e estabilidade (Kronig-Kramers) foram descartados.

[g] O critério de aceitação do teste KK utilizado, bem como informações com respeito ao gráfico de Lissajous, podem ser encontrados no manual do software NOVA, intitulado *NOVA: Impedance spectroscopy tutorial.*

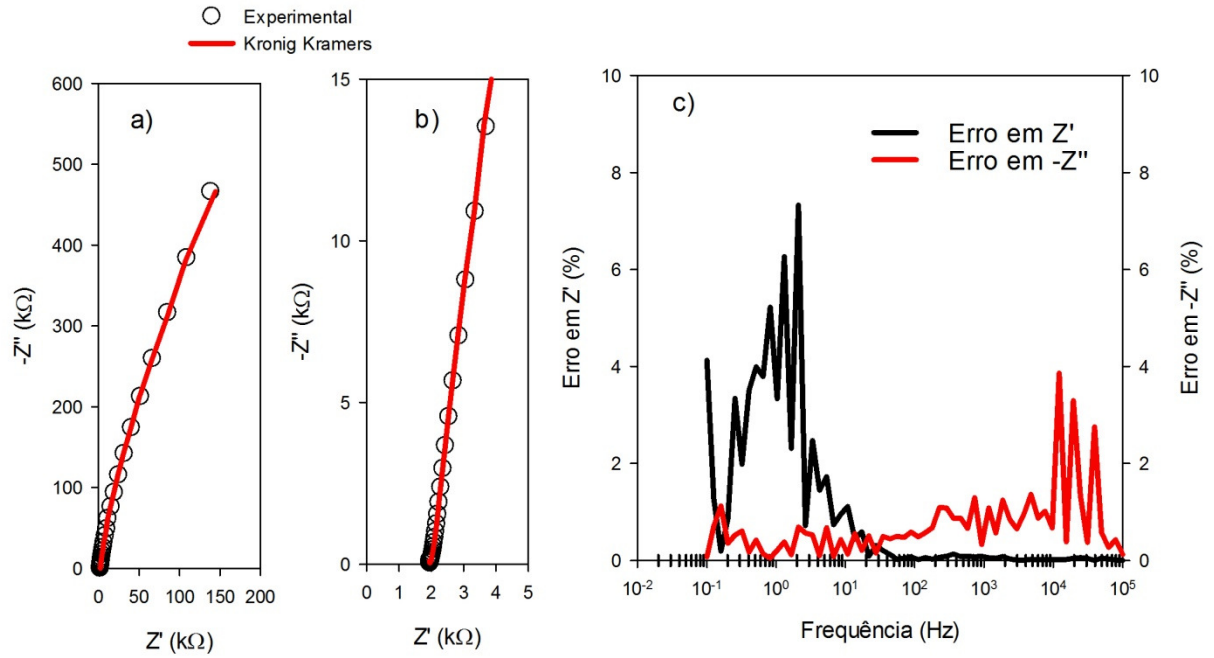


Figura 12 - Curvas referentes ao teste de Kronig-Kramers (KK). (a) Exemplo de teste KK. (b) Detalhe do teste em alta frequência. (c) Erro (%) nas partes reais (Z') e imaginária (-Z'') da impedância. Dados obtidos para os ensaios para a PAP.
Fonte: autor

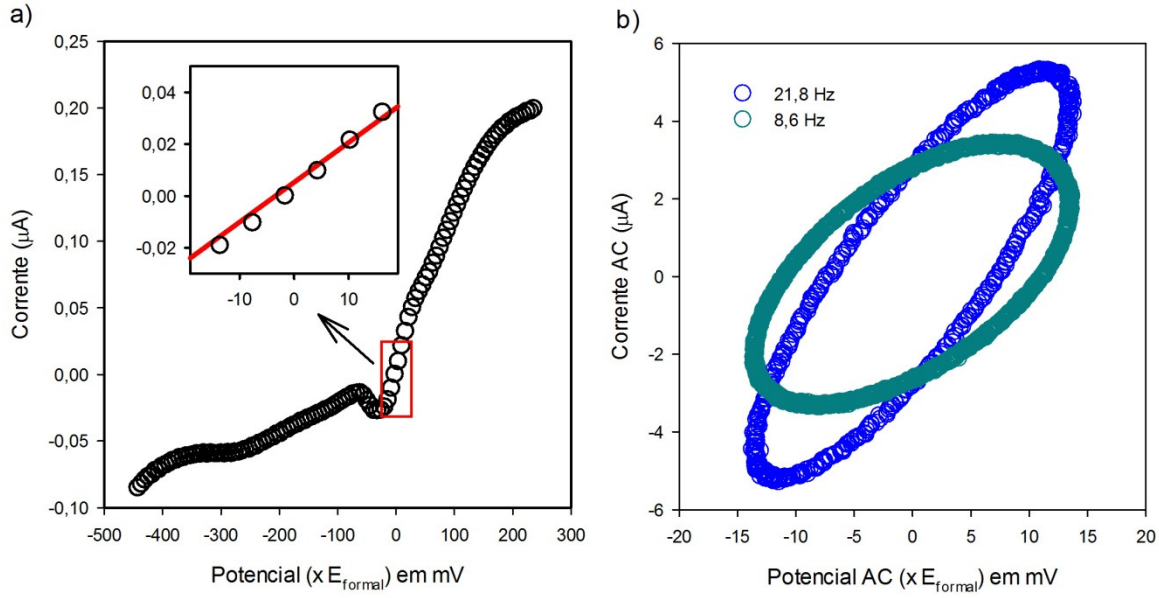


Figura 13 - Curvas para análise da validação dos dados de impedância eletroquímica. a) Exemplo de gráfico de corrente *versus* potencial. O potencial está referenciado ao potencial formal do par Fc^{+}/Fc presente na monocamada. No inserto, é mostrado a região do intervalo de perturbação do potencial (~ 15 mV) com relação ao potencial DC, com regressão linear com R^2=0,99. b) Exemplo de gráficos de Lissajous para duas diferentes frequências, a 8,6 Hz e 21,8 Hz. Observe que as figuras mostram um centro de simetria com relação à origem do gráfico, característico de sistemas com resposta linear de perturbação senoidal. Dados obtidos para o sistema de detecção da PAP.
Fonte: autor

5.2 Um estudo para detecção da PAP: um biomarcador para o câncer de próstata.

Dentre os variados tipos de câncer, o de próstata é apontado como sendo o segundo de maior incidência entre os homens em âmbito mundial.[26] Se não diagnosticado precocemente, ele tende a altos valores de mortalidade uma vez que inexistem tratamentos adequados quando ele se encontra em fase metastática (neste estágio apenas a ablação é recomendada).[144] No Reino Unido, por exemplo, o câncer de próstata possui mortalidade de 13% (do total de homens que morreram de câncer),[145] enquanto no Brasil a taxa chega a 13,7%.[h] Por outro lado, se essa doença é diagnosticada precocemente, é possível realizar monitoramento e tratamentos mais efetivos,[144] como radioterapia e hormônio-terapia, permitindo o controle efetivo da doença.[145]

O câncer de próstata é atualmente diagnosticado pela quantificação dos níveis da proteína PSA (antígeno específico da próstata, do inglês *prostate-specific antigen*) em soro sanguíneo, sendo esta proteína uma protease produzida pelo epitélio prostático.[146-148] Embora a proteína PSA não seja uma espécie biomarcadora para o câncer de próstata (uma vez que um aumento da concentração desta proteína pode ser causado por uma hiperplasia benigna da próstata – BPH[144] e não apenas pelo aparecimento do câncer em questão), ela é atualmente estudada e utilizada para esta finalidade.[148] Níveis de PSA no soro em torno de 2,5-3,0 ng/ml são geralmente considerados como o limite acima do qual uma biópsia da próstata deve ser realizada, embora a especificidade do teste seja pobre quando os valores de PSA são inferiores a 10 ng/ml (cerca de 25-40% dos homens com tais níveis de PSA irão desenvolver a doença).[146]

Devido às limitações da análise de PSA, uma forma interessante de diagnosticar a doença é por meio da quantificação de outro biomarcador, como a PAP (Fosfatase ácida prostática, do inglês *human prostatic acid phosphatase*), que permite fornecer ao clínico maiores evidências do desenvolvimento (ou não) da doença e, consequentemente, sugerir o melhor tratamento de acordo com o estágio da doença.[145] PAP é uma enzima de 100 KDa[149] derivada da prostata[150] abundante no fluido seminal humano. Nos recentes anos, o interesse no uso da PAP como marcador tornou-se crescente,[151] uma vez que a sobre-expressão desta enzima presente no soro sanguíneo (geralmente acima de 3 ng/mL ou 0,03 nmol/L, sendo o

[h] INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Atlas on-line de mortalidade**. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/>. Acesso em: 28 mar. 2017.

valor de *cut-off* de 10 ng/mL ou 0,1 nmol/L)[152] tem sido correlacionado a esse tipo de câncer[153,154] e, em combinação com os testes de PSA, potencializa o diagnóstico da doença.[152,155] Métodos tradicionais de detecção da PAP se baseiam em ELISA, mas, embora apresentem baixo limite de detecção (LD de 3 pmol/L ou 0,3 ng/mL) são demorados e demandam pessoal qualificado.[152]

Neste contexto, o desenvolvimento de novas metodologias para a quantificação da PAP se torna importante para o combate ao câncer de próstata. Desta forma, explorar as técnicas eletroquímicas, visto o potencial intrínseco que elas oferecem para o desenvolvimento de dispositivos biossensores (miniaturização e *point-of-care*, por exemplo), torna-se atraente e promissor. Neste trabalho, desenvolveu-se uma abordagem utilizando a capacitância eletroquímica para a detecção de PAP.

Como comentado na seção 2, a transdução de sinal por meio dessa abordagem ocorre devido à presença de uma entidade redox acoplada a um filme imobilizado sobre o transdutor (eletrodo metálico), que possui uma densidade de estados (DOS) acoplada à densidade de estados eletrônico do metal. Esse acoplamento sofre interferência do ambiente e, em especial, é suscetível à presença de moléculas de antígeno (analito). A alteração da densidade de estados dos grupos redox pode ser avaliada por meio da alteração na capacitância (C_r), com aplicação em transdução de sinal de biorreconhecimento.[2,103]

Além do uso da molécula redox, é necessário uma outra que permita a imobilização do material biológico sobre o eletrodo. Neste caso, foi utilizado o PEG-tiol, que apresenta conhecida propriedade anti-incrustante, ideal para o desenvolvimento de superfícies que repelem proteínas ou células, diminuindo o problema de interação inespecífica quando se pretende utilizar amostra biológica, como soro sanguíneo.[4,156]

A funcionalização dos eletrodos de ouro com filme eletroativo foi realizada mergulhando o eletrodo em uma solução contendo 1,8 mmol/L de 11Fc (tiol contendo espécie eletroativa) e 0,2 mmol/L de PEG (para acoplamento do anticorpo) por 16 h em temperatura ambiente (25°C).

Após a formação das monocamadas, medidas de voltametria cíclica e impedância eletroquímica foram realizadas. Na Figura 14 é mostrado um exemplo das análises eletroquímicas obtidas antes e após a formação da monocamada.

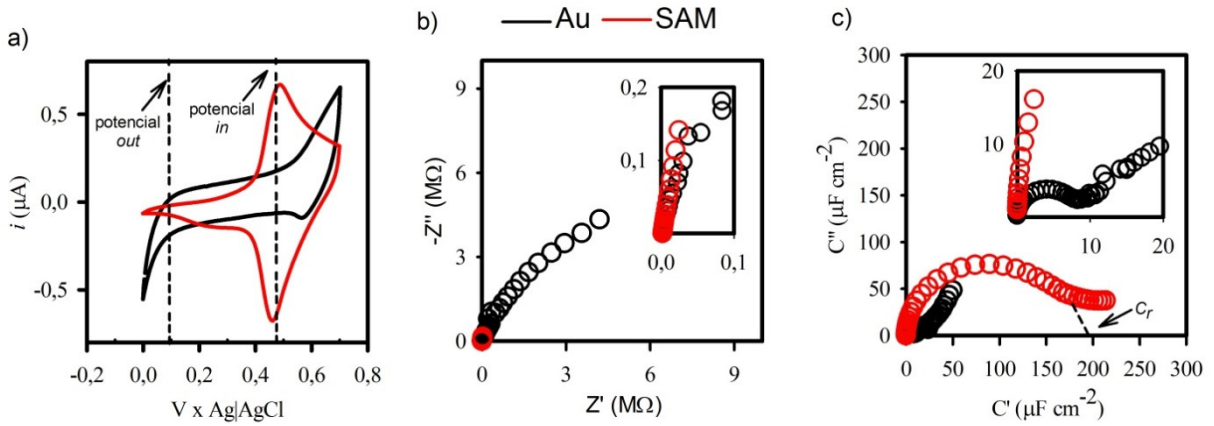


Figura 14 - Resultados de análise eletroquímica obtidos para a modificação do eletrodo de ouro utilizando 11Fc e PEG-tiol. (a) Exemplo de voltametria cíclica obtida antes e após a formação de monocamada a partir de solução etanólica contendo 1,8 mmol/L de 11Fc e 0,2 mmol/L de PEG-tiol. Observe o aparecimento de picos de redução e oxidação do 11Fc imobilizado sobre o eletrodo quando comparado com a voltametria da superfície de ouro. No gráfico, estão indicados os potenciais *in* e *out*. (b) Exemplo de medida de impedância obtida no potencial *in* ($\sim \mathbf{0,47}\ \boldsymbol{V}$) para a superfície em (a). Por meio desses resultados, não é possível estimar os valores de capacitância, o que pode ser facilmente observado ao transformar os dados de impedância para capacitância complexa, como mostrado em (c). Medidas de voltametria realizadas conforme especificado na seção experimental (seção 4). Impedância eletroquímica foi realizada no potencial *in* ($\sim \mathbf{0,47}\boldsymbol{V}$).
Fonte: autor

É importante observar na Figura 14a o aparecimento dos picos de redução e oxidação após a formação da SAM, ausentes no eletrodo de ouro, evidenciando a formação do filme eletroativo. Esses processos estão relacionados com a reação $Fc \rightleftarrows Fc^{+} + e^{-}$. Ainda, na Figura 14a são mostrados as regiões de potencial *out* (potencial no qual não ocorre reação faradáica) e potencial *in* (i.e., potencial formal.Neste caso, $\sim 0{,}47V$). Desse voltamograma, a diferença entre os potenciais de oxidação e redução é $\sim 20\ mV$, e a relação i_A/i_C (quociente entre a corrente de pico anódica e catódica) é ~ 1, evidenciando que o filme apresenta processo redox reversível. Os ensaios de impedância realizados no potencial *in* para o eletrodo de ouro antes e após a formação do filme (Figura 14b), quando convertidas para capacitância (Figura 14c) mostram claramente um aumento dos valores de capacitância, que podem ser obtidos por aproximação do diâmetro do semicírculo: de $\sim 10\ \mu C/cm^2$ (relacionado com a capacitância da dupla camada elétrica) para $\sim 200\ \mu C/cm^2$. Esse aumento de 1900% está relacionado com a capacidade do filme em armazenar energia, ou mais especificamente, com a capacitância relacionada com o processo faradáico, exclusivo do filme contendo espécie eletroativa.

Para determinar a densidade molecular superficial de 11Fc no eletrodo (Γ_{11Fc}), realizaram-se voltametrias cíclicas em diferentes velocidades de varredura (exemplificado na

Figura 15a). Para todas as velocidades, o potencial formal permaneceu praticamente inalterado ($0{,}47 \pm 0{,}03\ V$), e a relação entre as correntes catódica e anódica na faixa de $0{,}9 - 1{,}0$. A relação entre a corrente de pico e velocidade de varredura tem comportamento linear (Figura 15b), com coeficiente de determinação $R^2 = 0{,}99$.

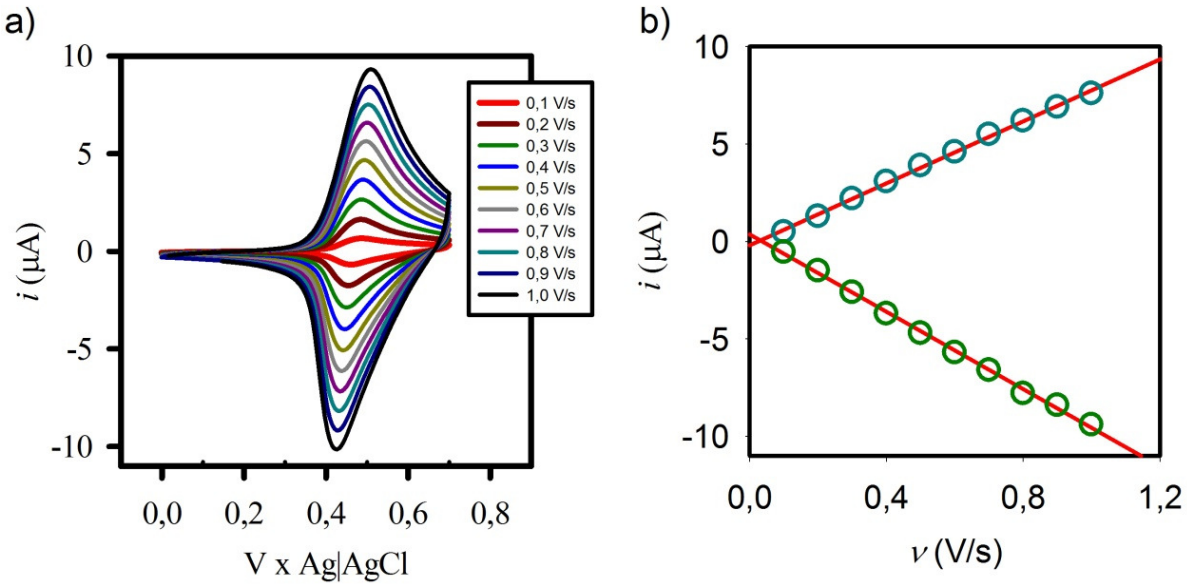


Figura 15 - Voltamogramas e a dependência da intensidade da corrente de pico com a velocidade de varredura obtidos utilizando a superfície modificada com 11Fc e PEG-tiol. (a) Exemplo de voltamogramas obtidos em diferentes velocidades de varredura. A separação entre os potenciais de oxidação e redução variam de $\mathbf{20 - 60\ mV}$. (b) As curvas de corrente de pico anódica e catódica *versus* velocidade de varredura apresentam coeficientes angulares negativo e positivo, respectivamente, neste caso, com módulo igual a $\mathbf{9x10^{-6}}$, com $\boldsymbol{R^2 = 0,99}$.
Fonte: autor

Por meio do cálculo do coeficiente angular da reta de corrente de pico anôdica *versus* velocidade de varredura (equação 20) para diferentes eletrodos ($T = 293\ K$), obtem-se $\Gamma_{11Fc} = (1{,}8 \pm 0{,}1)x10^{-10}$ mol/cm^2. Para efeito comparativo, foram estimadas as densidades moleculares superficais do 11Fc (Γ_{11Fc}) por meio da área de pico de oxidação (anódica), por meio da equação 18 (seção 4) utilizando os voltamogramas obtidos a velocidade de 0,1 V/s em diferentes eletrodos (exemplificado na Figura 15a), obtendo-se o mesmo valor $\Gamma_{11Fc} = (1{,}8 \pm 0{,}2)x10^{-10}$ mol/cm^2. O mesmo resultado foi obtido pelos valores de capacitância eletroquímica obtidos no potencial *in* (exemplificado na Figura 16) utilizando a equação 21 ($T = 293\ K$), $\Gamma_{11Fc} = (1{,}6 \pm 0{,}2)x10^{-10}$ mol/cm^2. A densidade molecular superficial para esta monocamada bifuncional, obtida pela integração do pico de redução dos voltamogramas realizados em meio básico (seção 4.5), é $\Gamma_{SAM} = (4{,}1 \pm 0{,}4)x10^{-10}$ mol/cm^2.

Como comentado anteriormente, estudos têm demonstrado que a capacidade de armazenamento energético do filme é susceptível ao acoplamento receptor-ligante que ocorre nas proximidades da espécie eletroativa.[2,10] Desta forma, esse filme foi utilizado para detectar a proteína PAP diluída em solução tampão PBS.

Para construir o biossensor, o filme obtido anteriormente foi modificado com o anticorpo anti-PAP, específico para o antígeno em questão. O acoplamento foi realizado via o protocolo EDC/NHS (seção 4). Neste caso, o eletrodo foi mergulhado em solução aquosa contendo 0,1 mol/L de NHS e 0,4 mol/L de EDC[78] por 30 min para a ativação do grupo carboxílico terminal do PEG-tiol, formando éster NHS. Após o período mencionado, o eletrodo foi lavado com água e mergulhado numa solução contendo 1 µmol/L de anticorpo por 1 h. Para bloquear os sítios remanescentes, não ocupados pela anti-PAP, foi utilizado solução de BSA 0,1%, mergulhando o eletrodo nesta solução por 30 min.

Os processos de imobilização do anticopo e bloqueio foram avaliados pela espectrocopia de impedância eletroquímica. Na Figura 16 são mostrados os diagramas de Nyquist obtidos no potencial *in* para os processos.

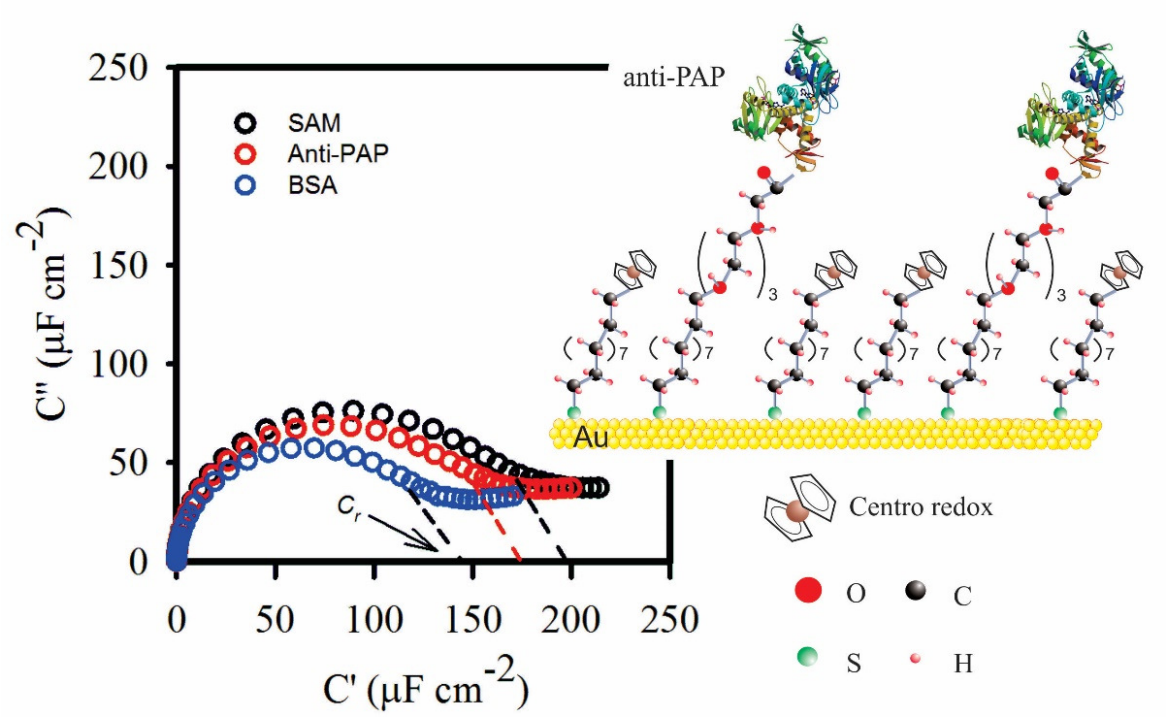


Figura 16 - Diagrama de Nyquist obtidos nos processos de modificação do eletrodo com SAM, anti-PAP e bloqueio com BSA. Ao lado, ilustração da SAM funcionalizada com o anticorpo. Moléculas de BSA não são mostradas.
Fonte: autor

Uma vez que alterações nos valores de capacitância redox estão relacionadas com a modificação da superfície, as variações de C_r observadas na Figura 16, de $200\ \mu F/cm^2$ para a SAM, $170\ \mu F/cm^2$ para imobilização da anti-PAP e $150\ \mu F/cm^2$ para bloqueio com BSA, sugerem que a superfície foi modificada com êxito.

Para avaliar o processo de imobilização do anticorpo, também foram realizadas medidas piezelétricas (seção 4). Neste caso, o cristal de quartzo foi primeiramente funcionalizado com a solução de tiol (1,8 mmol/L de 11Fc e 0,2 mmol/L de PEG-tiol) e ativado com EDC/NHS. Na Figura 17 é mostrado a variação de frequência (3° harmônico) de oscilação do cristal de quartzo ($\Delta f_{n=3}/3$, Hz) e a respectiva massa acoplada ao movimento oscilatório por unidade de área (ng/cm^2) em função do tempo (min).

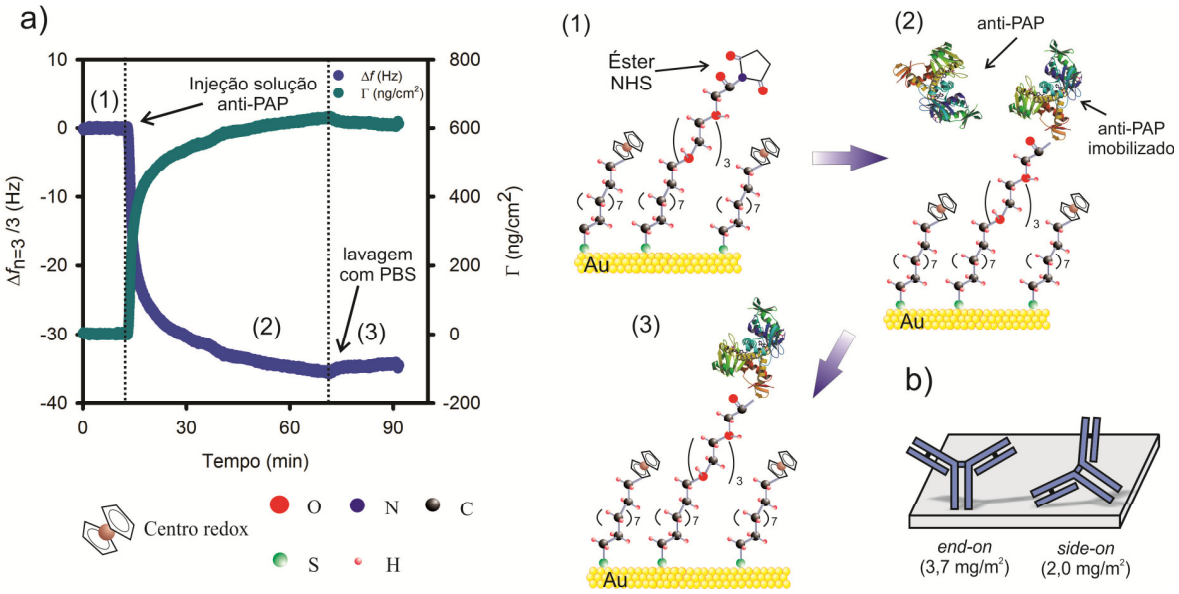


Figura 17 - Exemplo de sensograma obtido no processo de imobilização de anti-PAP. (a) Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo $\boldsymbol{\Delta f}$ (Hz) em função do tempo (min.) para a etapa de imobilização do anticorpo anti-PAP sobre o eletrodo de ouro funcionalizado com SAM contendo grupo carboxílico terminal ativado com EDC/NHS (presença de éster NHS). A etapa (1) corresponde ao período de estabilização da frequência com injeção de PBS. Etapa (2) injeção de solução de anti-PAP e etapa (3) lavagem com PBS. A densidade molecular superficial foi obtida utilizando a relação $\boldsymbol{\Gamma = -C\Delta f}$, sendo $\boldsymbol{C = 17,7\ ng/Hz\ cm^2}$. Fluxo utilizado de 100 $\boldsymbol{\mu L/min}$. Todos os ensaios foram realizados em temperatura ambiente (25 °C). (b) Duas possíveis orientações do anticorpo sobre superfície com a densidade molecular superficial estimada, de acordo com Buijs *et al.*[157]
Fonte: autor

O gráfico da Figura 17 foi divido em três etapas. A primeira (1) corresponde ao período de estabilização da frequência de oscilação do cristal de quartzo (em que $\Delta f_{inicial} \approx 0$ em 10 min.) injetando-se constantemete solução PBS pH 7,4 (fluxo de 100 $\mu L/min$). Após injetar solução 1 µmol/L de anti-PAP a um fluxo de 100 µL/min observa-se uma dimuição brusca de

Δf (i.e., um aumento de massa acoplada) evidenciando a adsorção do anticorpo sobre a superfície do eletrodo, via reação entre o grupo amina presente na proteína e o éster-NHS na região terminal da SAM (2). Importante notar que a variação $\Delta f/min$ no início do processo ($3\ Hz/min$, nos primeiros 10 min.) é muito maior do que nos 10 min. finais, sendo que Δf praticamente permaneceu constante no último caso, com variação (em módulo) menor do que $0{,}09\ Hz/min$. Isto se deve ao fato de que, no início do processo, os grupos éster-NHS estão livres para o acoplamento e reagem facilmente com os grupos amina presentes na proteína. Entretanto, após algum tempo, sendo que uma grande quantidade de anticorpos estão imobilizados no eletrodo, devido ao impedimento estérico, moléculas livres de anticorpo não conseguem alcançar facilmente os grupos éster-NHS livres para o acoplamento, diminuindo consideravelmente a taxa de adsorção, como observado. Após o período de imobilização do anticorpo sobre o eletrodo (1 h), foi utilizado fluxo de PBS (etapa 3) com o objetivo de remover macromoléculas de anticorpo adsorvidas não especificamente sobre o eletrodo (adsorção física). Observe que, após o início da injeção de PBS, uma pequena variação positiva de Δf (0,6 Hz, que corresponde a uma diminuição de massa adsorvida) é observada. Neste caso, sugere-se que macromoléculas de anticorpos que não estavam acoplados quimicamente sobre o eletrodo foram removidas. A variação final de Δf que corresponde à diferença entre o Δf da etapa 3 e Δf inicial ou $\Delta f_{etapa\,1}$ ($\Delta f_{anti-PAP} = \Delta f_{etapa\,3} - \Delta f_{etapa\,1}$), corresponde à massa total que está acoplada ao movimento oscilatório do cristal. Anologamente, variações de massa em função do tempo estão representados no gráfico da Figura 17, obtidas pela relação $\Gamma = -C\Delta f$ (seção 4). Os valores encontrados são $-\Delta f_{anti-PAP} = 31 \pm 4\ Hz$ e $\Gamma_{anti-PAP} = (5{,}4 \pm 0{,}7)x10^{-7} g/cm^2$.

Importante frisar que a massa adsorvida correspondente ao processo de imobilização do anticorpo está relacionada à massa total acoplada ao movimento oscilatório do cristal de quartzo. Isto significa que essa massa corresponde à soma da massa adsorvida de proteína e de água solvatada em torno da macromolécula ou retida em sua estrutura. Esta massa de água corresponde a $\sim 30\%$ do total observado[158] e deve ser considerada para o cálculo da massa superficial de proteína. Höök *et al.*, por exemplo, estudaram o processo de adsorção de várias proteínas variando o pH e levando em consideração essa massa de hidratação.[57,159] Desconsiderando a massa de água, encontra-se o valor estimado da densidade molecular superfical $\Gamma_{anti-PAP} = (3{,}7 \pm 0{,}5)x10^{-7} g/cm^2$ ou $\approx 3{,}7\ mg/m^2$, o que corresponde à

formação de uma monocamada de anticorpos orientados na posição “end-on” (Figura 17b), de acordo com Buijs *et al.*[157]

A etapa de bloqueio com BSA também foi avaliada por QCM (Figura 18). Neste caso, a variação de Δf_{BSA} foi de $-\Delta f_{BSA} = 3{,}0 \pm 0{,}6\ Hz$, o que corresponde a, descontando a massa de água ($\sim 30\%$), $\Gamma_{BSA} = 37 \pm 8\ ng/cm^2$. A variação de Δf para ambas as etapas demonstram que foi possível modificar a superfície de ouro para a construção do biossensor para PAP.

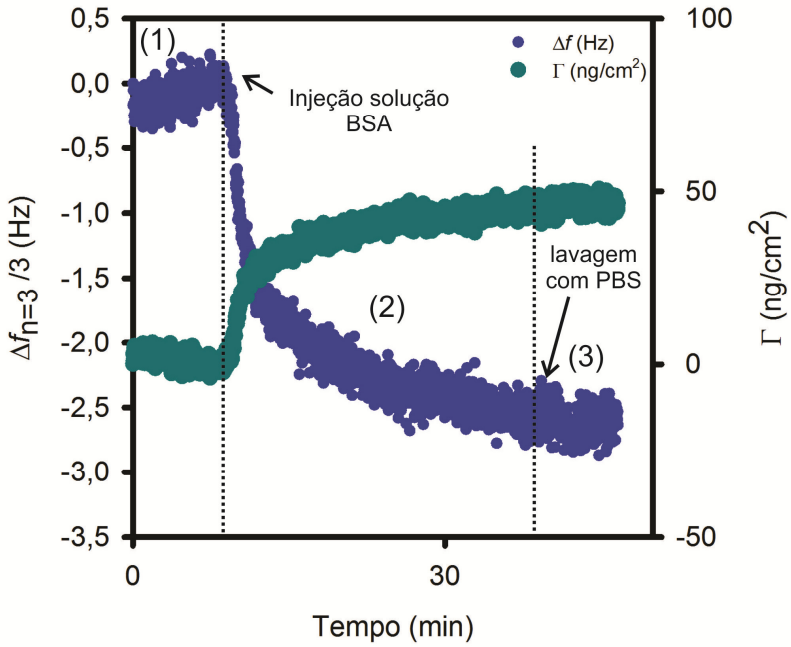


Figura 18 - Etapa de bloqueio durante construção do biossensor para a detecção de PAP por meio da técnica de QCM. A região (1) corresponde ao período de estabilização da oscilação do cristal de quartzo, enquanto a região (2) ao processo de imobilização de BSA (30 min.). Após esse processo, solução PBS é injetada para a remoção de BSA não acoplada especificamente sobre o eletrodo. A frequência de oscilação da região (3) corresponde à massa de BSA (e massa de água de solvatação) imolizada especificamente sobre o cristal de quartzo.
Fonte: autor

Após a modificação do eletrodo de ouro com o anticorpo, avaliou-se por impedância eletroquímica a resposta de capacitância redox frente a diferentes concentrações de analito (PAP), como mostrado na Figura 19. Como já previamente observado em outros trabalhos, os valores das componentes de impedância real e imaginária obtidos no potencial *in*, quando plotados no diagrama complexo (Nyquist), não é possivel verificar alteração nesses parâmetros ao variar a concentração de analito (Figura 19a).[2] De fato, o diagrama de Nyquist apresenta comportamento capacitivo, com uma reta que passa pelos pontos com inclinação

de $\sim 73°$. Por outro lado, quando os dados complexos de impedância em função da frequência $[Z^*(\omega)]$ são convertidos para capacitância $[C^*(\omega)]$, torna-se possível verificar a alteração nos diagramas de Nyquist em função da concentração do analito (Figura 19b). Desta forma, os valores de capacitância eletroquímica (C_r) podem ser obtidos facilmente pelo diâmetro do semicírculo.

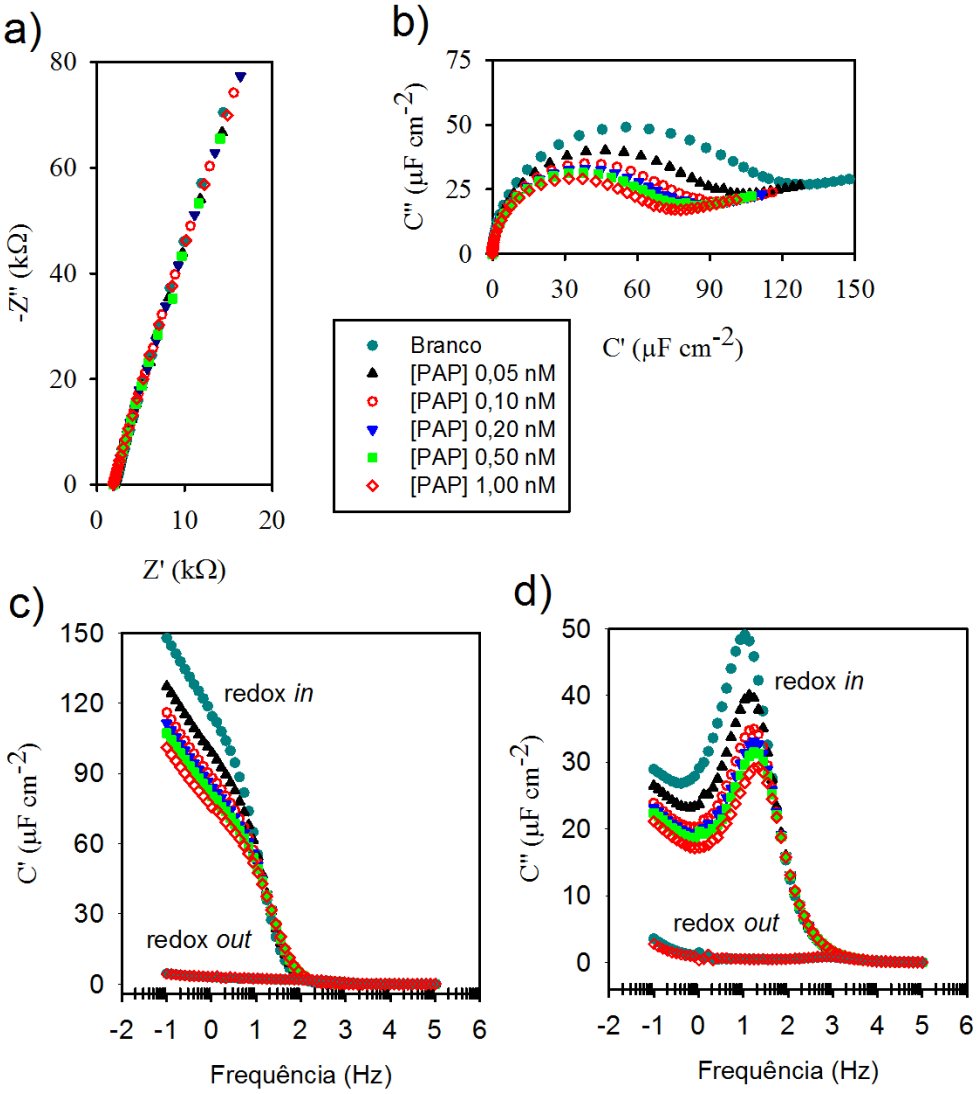


Figura 19 - Análise por espectroscopia de impedância/capacitância obtidos para detecção de PAP. a) Diagrama de Nyquist dos dados de impedância, obtidos variando a concentração de analito. b) Diagrama de Nyquist para os dados de capacitância mostrados no item (a). c) Diagrama de Bode, no qual é mostrado os dados de capacitância real ($\boldsymbol{C'}$) normalizados pela área em função da frequência (o eixo está representado em escala logarítmica e os valores são os índices exponenciais). d) O mesmo que em (c), só que para os dados de capacitância imaginária ($\boldsymbol{C''}$).
Fonte: autor

Importante que se note que os valores de capacitância eletroquímica são sensíveis com a alteração da concentração do analito somente no potencial *in*. Valores obtidos no

potencial *out* (neste caso, a 0,1 V x Ag|AgCl, i.e., região do voltamograma onde não é observado corrente faradáica), mostrados na Figura 19c e 19d, praticamente não se alteram e, de fato, representam menos do que 3% dos valores de capacitância obtidos no potencial *in*.

Os dados de capacitância eletroquímica foram utilizados com o objetivo de se construir a curva analítica utilizando cinco diferentes concentrações de PAP, na faixa clinicamente útil de 50-1000 pmol/L (valores acima de 100 pmol/L evidenciam o aparecimento de câncer de próstata). A curva analítica foi construída tendo como sinal analítico (S) o inverso da capacitância eletroquímica ($1/C_r$), obtido na forma $S = 1/C_{r[analito]} - 1/C_{r(branco)}$. Os dados foram plotados como o porcentual de resposta de $1/C_r$ em relação à resposta do branco, i.e., $S_{[analito]}(\%) = 100 * S_{[analito]}/(1/C_{r(branco)})$.

A curva analítica mostrada na Figura 20a apresenta comportamento linear em função do logarítmo da concentração de PAP na faixa estudada. O parâmetro de correlação linear de Pearson obtido, $R = 0{,}998$, apresenta forte correlação positiva entre o sinal analítico e a concentração de PAP e maior do que o recomendado pelo INMETRO ($R > 0{,}90$).[160] De fato, a reta de regressão apresenta coeficiente de determinação $R^2 = 0{,}99$.

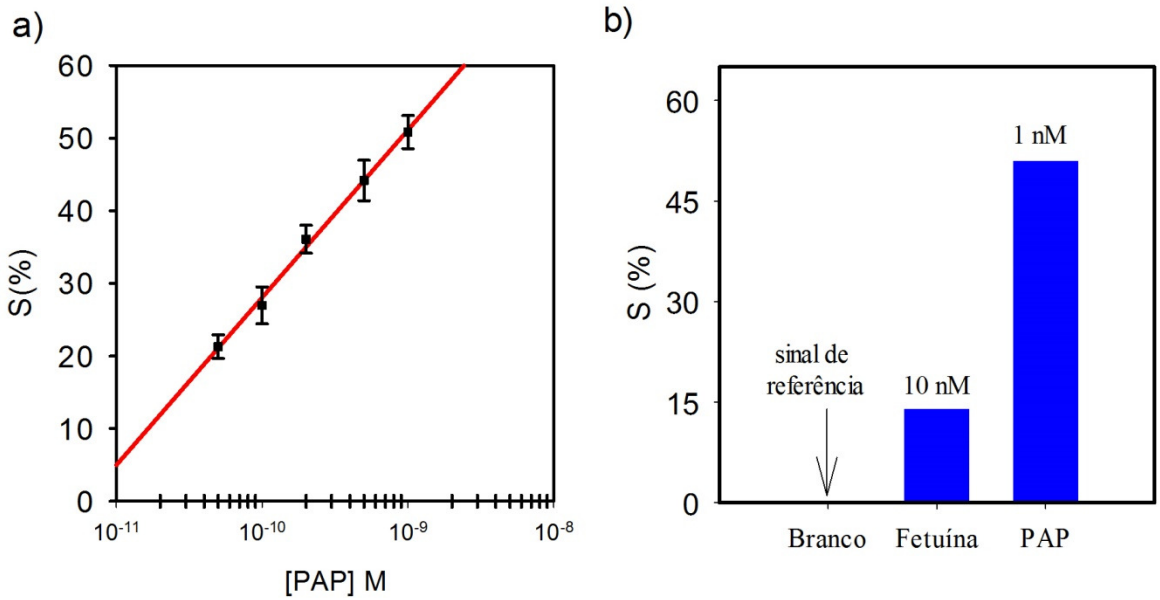


Figura 20 - a) Curva de calibração obtida utilizando a abordagem de capacitância eletroquímica, variando a concentração de PAP de 50-1000 pmol/L. b) Avaliação da especificidade do ensaio utilizando uma proteína não específica (fetuína a 10 nM).
Fonte: autor

As figuras de mérito analítico utilizadas para avaliar o ensaio analítico foram a sensibilidade (entendida como o coeficiente angular da curva de calibração), limite de

detecção (LD), limite de quantificação (LQ), repetitividade em termos do desvio-padrão relativo ($DPR = \sigma/\overline{x}$), e especificidade entendida aqui como a resposta do ensaio frente a uma proteína não específica (neste caso, a fetuína).

A sensibilidade do ensaio encontrada foi de 0,23 por década de concentração do analito, com um LD de 9 pmol/L e LQ de 28 pmol/L, na faixa linear de 50-1000 pmol/L. O LD encontrado apresenta valor na mesma ordem de grandeza daquele encontrado para o ELISA (3 pmol/L) e para capacitância redox (11 pmol/L).[103] Importante notar que o LD obtido se encontra abaixo do cut-off de 100 pmol/L (valor entendido como sendo o limite que evidencia o aparecimento da doença). O desvio-padrão relativo (DPR) apresentou valor menor do que 9,5%. Para avaliar a especificidade, foi utilizado solução de fetuína 10 nmol/L ao invés de PAP, apresentando valor de sinal não maior do que 14%, quando comparado com PAP a 1 nmol/L (~50%) (Figura 20). De fato, o teste de significância para verificar se a média dos valores de sinal obtido para a PAP e fetuína nas condições mencionadas são valores análogos a um nível de significância $\alpha = 0{,}05$, apresentou *valor-p* igual a $p = 0{,}00016$, forte evidência de rejeição de hipótese (i.e., os valores são estatisticamente diferentes com um intervalo de confiança de 95%).

Não obstante, também foram realizadas medidas utilizando soro humano comercial não diluído, ao invés de tampão PBS, para avaliar o efeito de matriz na abordagem desenvolvida. Claramente, sabe-se que o soro humano contém uma variedade de proteínas que interferem no sinal analítico, ocasionando especialmente aumento dos limites de detecção e quantificação do ensaio quando comparados com resultados realizados em tampão. Por exemplo, o soro humano contém quantidade expressiva de albumina (HSA, *human serum albumin*), chegando a níveis de 10^7 ng/mL, enquanto geralmente pretende-se detectar biomarcadores em níveis muito menores (na ordem de 10^{-2} a 10^3 ng/mL).[38] Por esse motivo, optou-se em desenvolver neste caso uma superfície contendo polietileno glicol (PEG), uma vez que pesquisas têm relatado sua propriedade anti-incrustante desejável no desenvolvimento de biossensores.[38] De fato, um estudo conduzido pelo grupo do Prof. Paulo Roberto Bueno do qual estou diretamente envolvido (trabalho de Iniciação Científica desenvolvido pela aluna Melany Isabel Garcia Nicholson), utilizando a técnica de QCM, foi possível analisar essa propriedade (Figura 21).

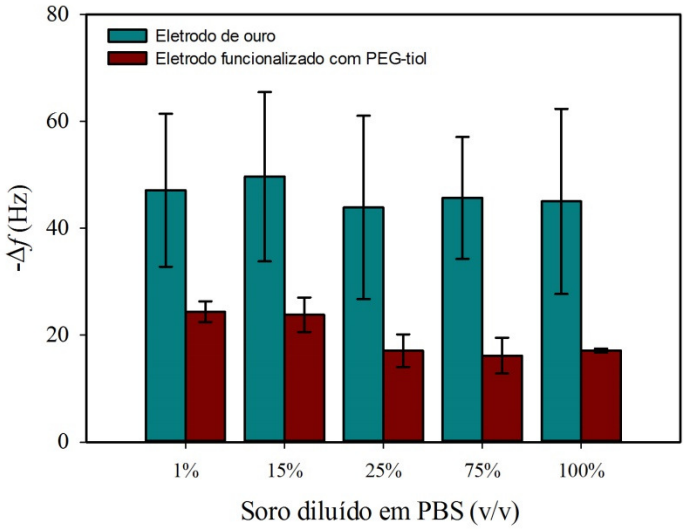


Figura 21 - Avaliação da propriedade anti-incrustrante de superfície funcionalizada com filme contendo polietilenoglicol (PEG-tiol) utilizando diferentes diluições de soro humano comercial em tampão PBS, diminuindo o nível de PBS de 1% a 100%, sendo que 100% corresponde a de soro não diluído. Como superfície de controle, utilizou o eletrodo de ouro. O eixo y corresponde à variação de oscilação (frequência) do cristal de quatzo. Quanto mais negativo, maior a quantidade de proteína adsorvida. As barras de erros mostram o desvio-padrão de ao menos quatro ensaios independentes.
Fonte: autor

Utilizando a superfície funcionalizada com monocamada bifuncinal (contendo espécie eletroativa ancorada [para transdução de sinal] e o PEG-tiol [para efeito anti-incrustante]), realizaram-se ensaios variando a concentração de PAP em soro humano comercial não diluído. O resultado do ensaio é mostrado na Figura 22.

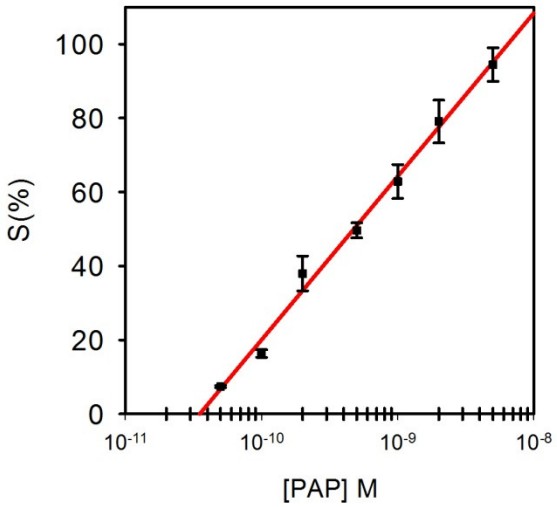


Figura 22 - Curva de calibração para detecção da proteína biomarcadora PAP, utilizando faixa de contração de 50-5000 pmol/L em soro comercial não diluído. R^2= 0,99.
Fonte: autor

De fato, tanto o valor de LD como o de LQ aumentaram quando comparados com os resultados em PBS (Tabela 3). Entretanto, o LD obtido (52 pmol/L) se encontra abaixo do cut-off de 100 pmol/L, evidenciando a viabilidade do ensaio para fins clínicos. Devido ao feito de matriz, a repetitividade (entendida aqui como desvio-padrão relativo) também sofreu aumento, de 9,5% em PBS para 12,4% em soro.

Tabela 3 - Comparação entre os parâmetros analíticos obtidos em solução tampão PBS (pH 7,4) e em soro comercial não diluído para a detecção da proteína biomarcadora PAP.

Parâmetro	PBS	Soro comercial não diluído
LD (pmol/L)	9	52
LQ (pmol/L)	28	132
Sensibilidade (% por década)	23	44
Repetitividade (%)	9,5	12,4
Faixa linear (pmol/L)	50-1000	50-5000

Fonte: autor

5.3 Uma nova abordagem para a detecção femtomolar de D-dímero

D-dímero (DD) é uma proteína presente no sangue oriunda da degradação da fibrina. Esta proteína tem sido empregada nas últimas décadas tanto como ferramenta para diagnóstico clínico como para acompanhamento médico de pacientes. Basicamente, os níveis dessa proteína se alteram quando o paciente sofre determinados tipos de trombose, especialmente embolia pulmonar. Esta doença, de difícil detecção,[161] é também a causa de muitas mortes inesperadas em hospitais.[162] Além disso, a aplicação clínica da proteína D-dímero está se expandindo,[163,164] incluindo a detecção de eventos potencialmente fatais como coagulação intravascular disseminada e aneurisma da aorta,[165] condições clínicas das quais o diagnóstico precoce é desejável para o tratamento clínico adequado. Além do mais, variados estudos apontam a possibilidade de seu uso como ferramenta para o prognóstico de determinadas doenças, como hemorragia gastrointestinal e acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico.[166,167] Portanto, quaisquer formas portáteis e rápidas de determinação desta proteína são de relevância clínica, em especial para a diagnóstico *point-of-care*, que possibilita agregar valor comercial por possibilitar o seu uso tanto em veículos de emergência médica como no próprio consultório médico.

Quantificação da proteína D-dímero em laboratórios de análises clínicas evoluiu desde a sua introdução no ano de 1980.[168] Inicialmente, os ensaios eram realizados com esferas de látex revestidas com anticorpos para essa proteína. A magnitude da aglutinação das esferas, devido à interação antígeno-anticorpo (observada pela leitura visual do operador), era a forma de detecção dessa proteína.[169] Com o advento do método ELISA, este passou a predominar como metodologia padrão.[168]

Atualmente, a combinação de sensores baseados na interação antígeno-anticorpo (comumente conhecidos como imunossensores) utilizando a eletroquímica como plataforma transdutora tem se provado como uma estratégia interessante para o desenvolvimento de nova geração de dispositivos para detecção de D-dímero. Obviamente, esta alta seletividade do biossensor é obtida devido ao uso de anticorpos que permitem, idealmente, somente a interação específica antígeno-anticorpo.[170] Em combinação com esta característica, a plataforma eletroquímica como sinal transdutor possui vantagens frente a outras metodologias analíticas como sensibilidade, simplicidade e a possibilidade de miniaturização, todas desejáveis para a fabricação de dispositivos para diagnóstico *point-of-care*. Algumas

metodologias eletroanalíticas para a determinação do D-dímero podem ser encontradas na literatura, incluindo voltametria cíclica,[171] potenciometria[172] e impedância.[104,173]

A abordagem aqui proposta para detecção do D-dímero é baseada na capacitância eletroquímica (conforme detalhado na seção 2). Basicamente, uma monocamada bifuncional composta por uma entidade eletroativa, o 11-ferrocenilundecanotiol (11Fc), e por outro tiol utilizado para ancoragem do anticorpo anti-DD (ácido 16-mercaptohexadecanóico, 16MHx) foi utilizada como engenharia de superfície para a detecção do D-dímero (Figura 23).

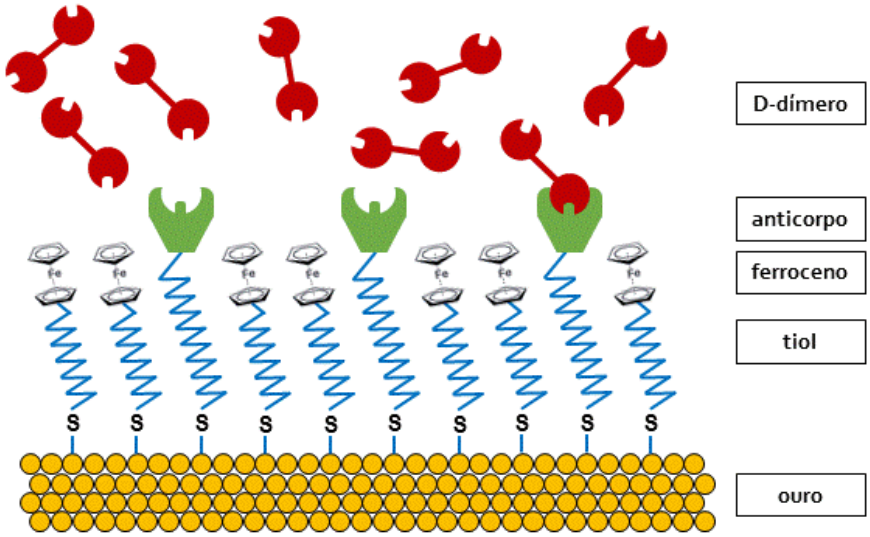


Figura 23 - Representação conceitual da engenharia de superfície desenvolvida para a detecção de D-dímero. Basicamente, a SAM é composta por dois diferentes tipos de tióis. O de 11 carbonos contendo o grupo redox (11Fc) como centro eletroativo para a transdução de sinal, e o ácido 16-mercaptohexadecanóico, para a imobilização do anticorpo. A transdução de sinal ocorre por meio da perturbação do sinal capacitivo devido à interação antígeno-anticorpo.
Fonte: autor, adaptada da referência 174

A transdução de sinal, como comentado anteriormente, é baseada na capacitância eletroquímica. O sinal é obtido por meio da abordagem de espectroscopia de capacitância derivada da impedância, da qual a capacitância C_r pode ser extraída. Sabe-se que alterações no ambiente da entidade redox ocasionadas pelo evento de biorreconhecimento antígeno-anticorpo afetam as características de armazenamento de energia elétrica da monocamada, e, assim, os valores de C_r associados.[2]

A montagem do biossensor para a detecção de D-dímero envolveu o tratamento de superfície do eletrodo, tanto por polimento mecânico, dessorção eletroquímica (voltametria cíclica) e limpeza (como detalhado na seção 4), com posterior formação da SAM e imobilização do anticorpo. Neste caso, a SAM foi obtida utilizando uma mistura etanólica

contendo 2 mmol/L de 11Fc e 0,2 mmol/L de 16 MHx, mergulhando o eletrodo nesta solução por 16 h em temperatura ambiente.

A monocamada bifuncional obtida por meio dessa abordagem possui alto grau de empacotamento, com densidade molecular superficial de $\Gamma_{SAM} = (5{,}1 \pm 0{,}4)x10^{-10}\ mol/cm^2$, obtida por meio da integração de pico de redução da dessorção eletroquímica da SAM em meio básico (Figura 24a), sendo que o valor máximo geralmente reportado na literatura está na ordem de $\Gamma \sim 7{,}5x10^{-10} mol/cm^2$.[175] A densidade molecular superficial do 11Fc correspondente nesta monocamada obtida tanto por voltametria cíclica (integração do pico de oxidação da Figura 18b) como por capacitância (C_r da SAM mostrada na Figura 24c) corresponde a $(2{,}7 \pm 0{,}2)x10^{-10}\ mol/cm^2$. Detalhes da metodologia podem ser encontrados na seção 4.

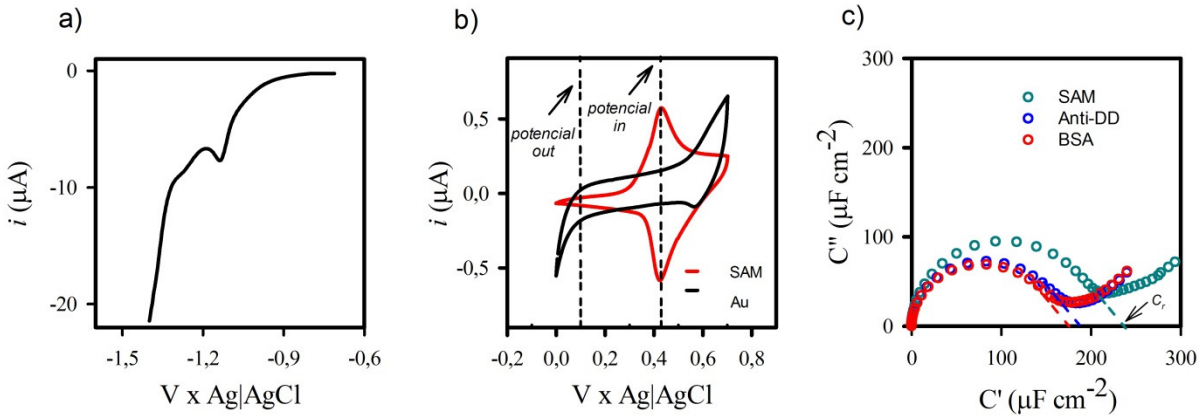


Figura 24 - Análises eletroquímicas (VC e EIE) obtidos para a caracterização da superfície de ouro modificada com 11Fc e 16MHx. a) Voltamograma obtido no processo de dessorção eletroquímica da monocamada bifuncional obtida a partir de solução contendo 2 mmol/L de 11Fc e 0,2 mmol/L de 16MHx, realizado em meio básico (0,5 mol/L de KOH a uma velocidade de varredura de 0,1 V/s). b) Voltamograma cíclico obtido em solução 20 mmol/L de TBA da monocamada bifuncional na velocidade de varredura de 0,1 V/s. No voltamograma, estão especificados os potenciais *in* ($\sim \mathbf{0,42}\boldsymbol{V}$) e *out* ($\mathbf{0,1}\ \boldsymbol{V}$). c) Diagrama de Nyquist obtido no potencial *in* para as etapas de formação da monocamada (SAM), imobilização do anticorpo (anti-DD) e bloqueio (BSA).
Fonte: autor, adaptada da referência 174

Por meio da Figura 24b, é possível verificar que o processo redox da monocamada bifuncional apresenta um comportamento reversível, apresentando a relação entre os picos anódico e catódico igual a 0,98, com separação entre os potenciais de 5 mV.

As etapas de construção do biossensor foram avaliadas por espectroscopia de capacitância eletroquímica realizando as medidas no potencial *in* ($\sim 0{,}42V$), obtido como mostrado na Figura 24b. Os valores de C_r podem ser facilmente estimados pelo diâmetro do semi-círculo,[143] como ilustrado na Figura 24c. Importante notar que o sinal de capacitância

eletroquímica para a monocamada bifuncional, $\sim 222\ \mu F/cm^2$, diminui para $\sim 188\ \mu F\ /cm^2$ como consequência da perturbação do ambiente em torno de grupos redox ocasionado pela ligação dos anticorpos. Após a adição de solução 0,1% de BSA para bloquear sítios não específicos sobre a superfície, uma pequena diminuição em C_r é ainda observada, com valores na ordem de $\sim 174\ \mu F\ /cm^2$. Esses resultados evidenciam que a modificação da superfície de ouro com anticorpo foi alcançada.

A imobilização do anticorpo anti-DD e bloqueio com BSA também foram avaliadas por QCM de forma análoga à abordagem para a detecção da PAP (seção 5.2). Neste caso, após o procedimento de limpeza e funcionalização do eletrodo de ouro com a camada bifuncional, seguida da ativação com EDC/NHS, solução de anticorpo anti-DD foi injetado sobre o eletrodo a um fluxo de 100 $\mu L/min$. Na Figura 25 é mostrado a variação da frequência (3° harmônico) de oscilação do cristal de quartzo quartzo ($\Delta f_{n=3}/3$, Hz) e a respectiva massa acoplada ao movimento oscilatório por unidade de área (ng/cm^2) em função do tempo (min.).

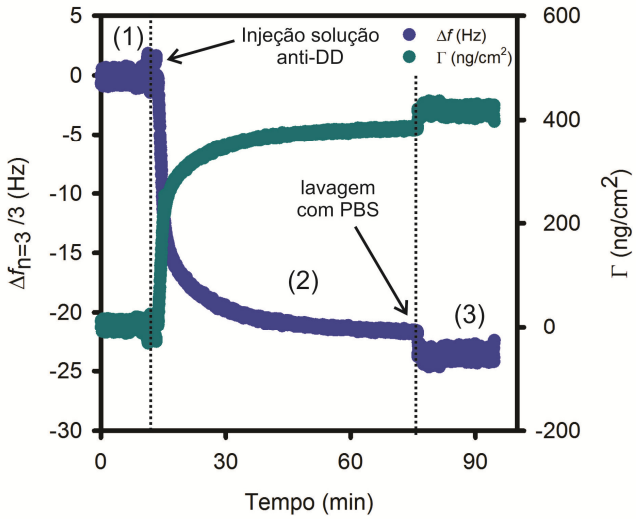


Figura 25 - Exemplo de sensograma obtido no processo de imobilização de anti-DD. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo $\boldsymbol{\Delta f}$ (Hz) em função do tempo (min.) para a etapa de imobilização do anticorpo anti-DD sobre o eletrodo de ouro funcionalizado com SAM contendo grupo carboxílico terminal ativado com EDC/NHS (presença de éster-NHS). A etapa (1) corresponde ao período de estabilização da frequência com injeção de PBS. Etapa (2) injeção de solução de anti-DD e etapa (3) lavagem com PBS. A densidade molecular superficial foi obtida utilizando a relação $\boldsymbol{\Gamma = -C\Delta f}$, sendo $\boldsymbol{C = 17,7\ ng/Hz\ cm^2}$. Fluxo utilizado de 100 $\boldsymbol{\mu L/min}$. Todos os ensaios foram realizados em temperatura ambiente (25 °C).
Fonte: autor

De forma similar ao que foi discutido para o estudo da imobilização da proteína PAP (seção 5.2), o gráfico da Figura 25 foi dividido em três etapas. A primeira (1) corresponde ao

período de estabilização da frequência de oscilação do cristal de quartzo (em que $\Delta f_{inicial} \approx 0$ em 14min.) injetando-se constantemete solução PBS pH 7,4 (fluxo de 100 $\mu L/min$). Após injetar solução 1µmol/L de anti-DD a um fluxo de 100 $\mu L/min$ observa-se uma dimuição brusca de Δf (i.e., um aumento de massa acoplada) evidenciando a adsorção do anticorpo sobre a superfície do eletrodo, via reação entre o grupo amina presente na proteína e o éster NHS na região terminal da SAM (2). Importante notar que a variação $\Delta f/min$ no início do processo ($1{,}7\ Hz/min$, nos primeiros 10 min.) é muito maior do que nos 10 min. finais, sendo que Δf praticamente permaneceu constante no último caso, com variação (modular) menor do que $0{,}04\ Hz/min$. Isto se deve ao fato de que, no início do processo, os grupos éster-NHS estão livres para o acoplamento e reagem facilmente com os grupos amina presentes na proteína. Entretanto, após algum tempo, em que uma grande quantidade de anticorpos são imobilizados no eletrodo, devido ao impedimento estérico, moléculas livres de anticorpo não conseguem alcançar facilmente os grupos éster NHS livres para o acoplamento, diminuindo consideravelmente a taxa de adsorção, como observado. Após o período de imobilização do anticorpo sobre o eletrodo (1 h), foi utilizado fluxo de PBS (etapa 3) com o objetivo de remover macromoléculas de anticorpo adsorvidas não especificamente sobre o eletrodo (adsorção física). A variação final de Δf que corresponde à diferença entre o Δf da etapa 3 e Δf inicial ou $\Delta f_{etapa\,1}$ ($\Delta f_{anti-DD} = \Delta f_{etapa\,3} - \Delta f_{etapa\,1}$), corresponde à massa total que está acoplada ao movimento oscilatório do cristal. Anologamente, variações de massa em função do tempo estão representados no gáfico da Figura 17, obtidas pela relação $\Gamma = -C\Delta f$ (seção 4). Os valores encontrados são $-\Delta f_{anti-DD} = 24 \pm 1\ Hz$ e $\Gamma_{anti-DD} = (4{,}2 \pm 0{,}2)x10^{-7} g/cm^2$.

Como anteriormente discutido, a massa de água corresponde a $\sim 30\%$ do total observado[158] e deve ser considerada para o cálculo da massa superficial de proteína. Desta forma, removendo a contribuição de água encontra-se o valor da densidade molecular superfical $\Gamma_{anti-DD} = (3{,}0 \pm 0{,}1)x10^{-7} g/cm^2\ ou\ \approx 3{,}0\ mg/m^2$, o que corresponde a formação de uma monocamada de anticorpo com composição intermediária entre "end-on" e "side-on". A etapa de bloqueio com BSA também foi avaliada por QCM (Figura 26). Neste caso, a variação de Δf_{BSA} foi de $-\Delta f_{BSA} = 5{,}0 \pm 1{,}5\ Hz$. A variação de Δf para ambas as etapas demonstram que foi possível modificar a superfície de ouro para a construção do biossensor para D-dímero.

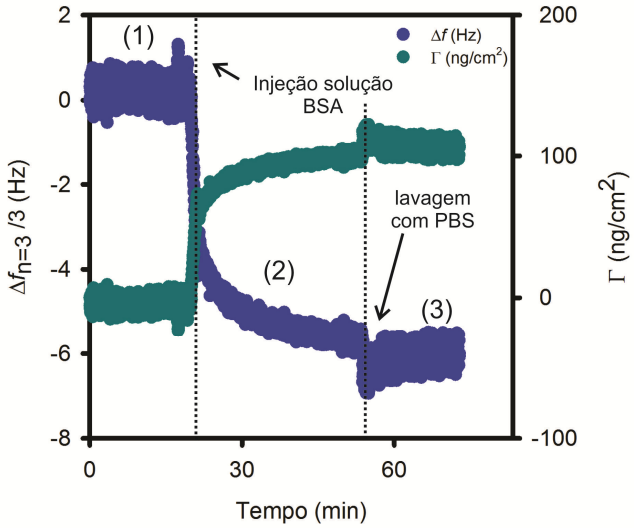


Figura 26 - Etapa de bloqueio durante construção do biossensor para a detecção de D-dímero por meio da técnica de QCM. A região (1) corresponde ao período de estabilização da oscilação do cristal de quartzo, enquanto a região (2) ao processo de imobilização de BSA (30 min.). Após esse processo, solução PBS é injetada para a remoção de BSA não acoplada especificamente sobre o eletrodo. A frequência de oscilação da região (3) corresponde à massa de BSA imolizada especificamente sobre o cristal de quartzo.
Fonte: autor

Como já observado em outros trabalhos, o sinal de capacitância eletroquímica diminui ao se aumentar a concentração do analito (Figura 27a), permitindo correlacionar o inverso do sinal de capacitância ($S = 1/C_{r[analito]} - 1/C_{r[branco]}$) com o logaritmo da concentração do analito.[2] Neste caso, a curva de calibração foi obtida utilizando-se como analito a proteína D-dímero (DD), diluída em solução tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4) na faixa de concentração clínica de 1-1000 ng/mL (mesmo que 5 pmol/L – 5 nmol/L, considerando massa molecular do DD igual a 200 KDa[176]). Para verificar a especificidade do sensor, solução de fetuína a 1000 ng/mL foi utilizada e, como observado, apresenta baixa resposta quando comparada com a do analito (Figura 27b). Geralmente, o sinal de fetuína (a $1\ \mu g/mL$) apresentou valores menores do que $310 F^{-1}cm^2$, quando comparado com sinal obtido para o DD (na concentração de $1 \mu g/mL$), de $1164\ F^{-1}cm^2$. De fato, a avaliação estatística para verificar se as médias são análogas utilizando o teste de hipótese com nível de significância de $\alpha = 0{,}05$, apresenta um *valor-p* de $p = 0{,}0004$, forte evidência de que o sensor responde especificamente ao analito.

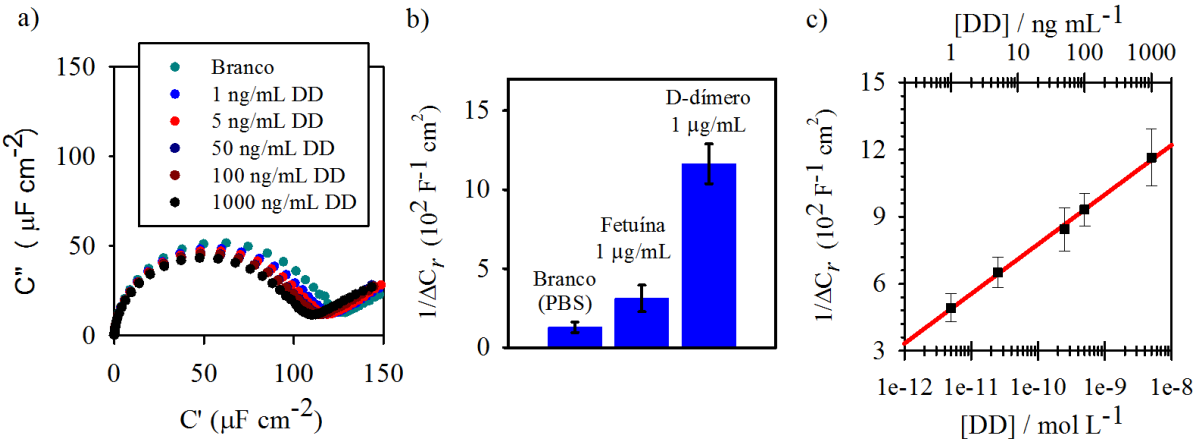


Figura 27 - Análise por espectroscopia de impedância/capacitância para a detecção de D-dímero. a) Diagramas de Nyquist obtidos após expor o sensor a diferentes concentrações de analito diluído em tampão PBS. Observe que os valores de $\boldsymbol{C_r}$ diminuem ao aumentar a concentração do analito. b) A resposta do sensor foi testada utilizando uma proteína não específica, a fetuína. Como observado, o sensor apresentou baixa resposta frente ao analito na mesma concentração. c) Curva analítica para detecção do D-dímero obtida variando a concentração do analito de 1-1000 ng/mL. A reta apresenta bom coeficiente linear, $\boldsymbol{R^2 = 0,995}$. Os ensaios eletroquímicos foram realizados no potencial *in* ($\sim \boldsymbol{0,42V}$ x Ag|AgCl).
Fonte: autor, adaptada da referência 174

Os valores de capacitância obtidos para o potencial *out* em 0,1 V (região do qual não há corrente faradáica) não são sensíveis à concentração do analito e representam apenas valores menores do que 2% em relação à capacitância eletroquímica obtida no potencial *in*, como ilustrado na Figura 28.

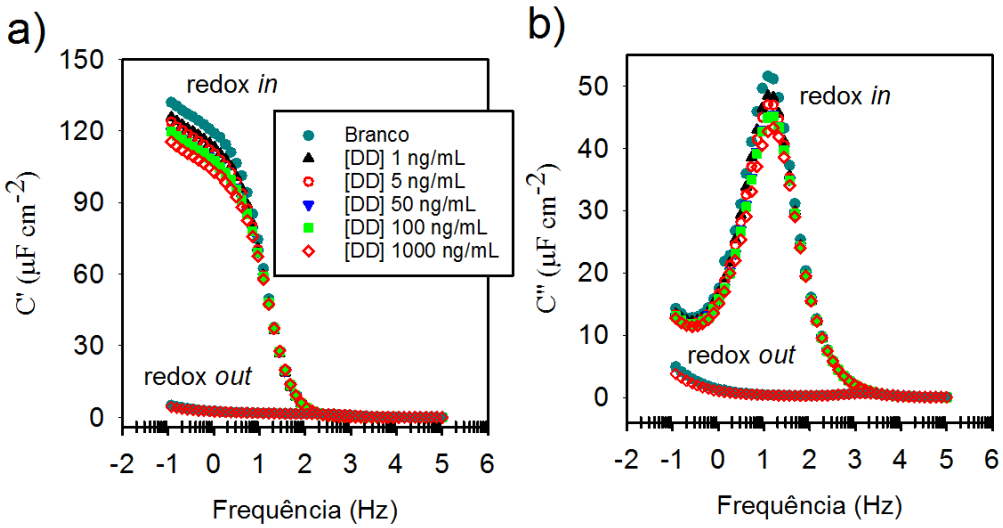


Figura 28 - Gráficos de Bode para os dados de capacitância real (a) e imaginária (b) em função da frequência. O eixo das abcissas está em escala logarítmica, sendo representado no eixo os expoentes.
Fonte: autor, adaptada da referência 174

Os resultados de sinal analítico em função do logaritmo da concentração de DD (Figura 27c) apresentam forte correlação linear positiva (coeficiente de Pearson $R = 0{,}99$, dentro do critério da IUPAC[160]) e coeficiente de determinação $R^2 = 0{,}995$. O coeficiente angular da reta (sensibilidade) encontrado foi de 221 F^{-1} cm^2 por década de concentração do analito. Com relação à repetitividade, avaliada em termos de desvio-padrão relativo a partir de três medidas independentes, foi de 11%.

Importante notar que a faixa linear utilizada se apresenta válida para o diagnóstico de embolia pulmonar e aneurisma cerebral. No caso de embolia pulmonar, o *cut-off* (valor mínimo aceitável ou valor limite) segue uma regra geral que se resume na multiplicação da idade do paciente por 10 ng/mL (exemplo: uma pessoa de 65 anos de idade, deve apresentar concentração de DD na faixa de 650 ng/mL)[177] e, para aneurisma, o valor relacionado é de 500 ng/mL.[178] Além disso, a abordagem aqui apresentada possui um LD clinicamente útil para a detecção de D-dímero, visto que ele está consideravelmente abaixo dos valores limites para ambas as doenças. Neste caso, o LD se encontra na ordem de femtomolar (10 ng/L ou 50 fmol/L, considerando a massa molecular do D-dímero igual a 200 KDa)[176] e o LQ obtido foi de 33 ng/L ou 165 fmol/L. Embora o método ELISA[168] apresente baixo LD (50 ng/mL)[168], ele possui desvantagens como, em especial, a necessidade de pessoas treinadas e não portabilidade, o que restringe o método de análise e não permite o diagnóstico *point-of-care*. Além desse ponto, a metodologia apresentada possui similar LD quando comparado com técnicas eletroanalíticas, como a impedância eletroquímica faradáica (LD de 0,1 ng/L) com a vantagem de não utilizar espécie eletroativa em solução.[104]

Com o intuito de avaliar o biossensor utilizando matriz biológica, os ensaios também foram realizados utilizando soro comercial (o meio sanguíneo é a matriz do qual esta proteína é encontrada). Neste caso, a proteína DD foi dissolvida em soro não diluído, na faixa de concentração de 1-1000 ng/mL. A curva de calibração é mostrada na Figura 29.

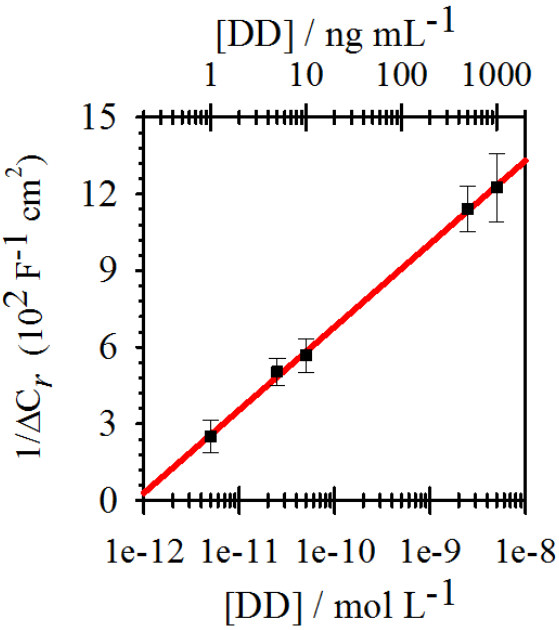


Figura 29 - Curva de calibração obtida utilizando DD diluído em soro comercial não diluído. O coeficiente de determinação obtido foi $\boldsymbol{R^2 = 0,99}$.
Fonte: referência 174

Devido à perturbação da matriz (i.e., uma matriz biológica complexa que contem em sua maioria proteínas como interferentes), o desvio-padrão relativo assumiu valores não maiores do que 14% (frente a 11% encontrado em PBS) e um aumento nos valores de limite de detecção e quantificação (Tabela 4). Neste caso, os valores obtidos são 7 e 21 pmol/L (ou 1,4 µg/L e 4,6 µg/L) para o LD e LQ, respectivamente, o que corresponde a um aumento na ordem de 1000 vezes quando comparado com os resultados em PBS (na ordem de ng/L). Embora houve aumento nestas figuras de mérito, o LD obtido por essa metodologia se encontra mais atraente quando comparado com outras técnicas eletroanalíticas, como amperometria (LD de 25 µg/L em soro).[179]

Tabela 4 - Comparação entre os parâmetros analíticos obtidos em solução tampão PBS (pH 7,4) e em soro comercial não diluído para a detecção da proteína biomarcadora D-dímero.

Parâmetro	PBS	Soro comercial não diluído
LD (pmol/L)	0,050	7
LQ (pmol/L)	0,165	21
Sensibilidade (F^{-1} cm^2 por década)	221	325
Desvio-padrão relativo (%)	11	14
Faixa linear (pmol/L)	5-5000	5-5000

Fonte: autor

5.4 O uso da técnica de capacitância redox como ferramenta para a determinação da constante de afinidade em biointerações: o caso da ArtinM-HRP.

Glicoproteínas são proteínas que possuem cadeias de carboidratos ligadas covalentemente em sua estrutura peptídica. Essas macromoléculas estão presentes em grande abundância na superfície celular e estão envolvidas em processos infecciosos iniciados com adesão celular de bactérias[180] ou outros parasitas. Por exemplo, sabe-se que os protozoários da *Toxoplasma gondii* utilizam lectinas (proteínas que reconhecem carboidratos) para se ancorarem na célula hospedeira via interação com a glicoproteína e iniciar o processo de invasão celular.[181] Além disso, estudos apontam que os processos bioquímicos relacionados ao câncer têm reflexos na glicosilação dessas proteínas (como na alteração no grau de ácido siálico e galactose, por exemplo), que podem ser utilizadas como ferramenta analítica para detectar células tumorais.[182] Neste contexto, justifica-se o desenvolvimento de dispositivos que possibilitem o estudo da interação lectina-glicoproteína[58] (buscando a compreensão de processos infecciosos), bem como em utilizar essa interação para o diagnóstico precoce de câncer.

Com base na importância do estudo da interação entre lectina-glicoproteína, esta seção traz a aplicação inédita da técnica de capacitância eletroquímica como ferramenta para avaliar a afinidade de interação deste tipo de biorreconhecimento, bem como avaliar a possibilidade de sua aplicação em eletroanalítica para detecção de glicoproteína. Como modelo, foi estudado a interação entre a lectina ArtinM e glicoproteína HRP.

ArtinM é uma lectina extraída da semente de jaca e que possui afinidade por estruturas que contém manose, como por exemplo, aquelas presentes em receptores localizadas na membrana celular (trimanosídeo Manα1-3[Manα1-6]Man) e na glicoproteína HRP. Essa lectina possui relevantes propriedades biológicas como ativação celular em processos inflamatórios, regeneração celular e reconhecimento de células leucêmicas.[183]

Como discutido na seção 4, conceitualmente, o equilíbrio químico entre uma espécie receptora e o seu ligante pode ser descrita utilizando o modelo da isoterma de Langmuir, a qual terá a dedução repetida aqui por conveniência (equação 28):[51]

$$ArtinM + HRP \rightleftharpoons ArtinM - HRP \qquad (28)$$

Com base na reação acima, a constante de afinidade (K_a) pode ser definida como (equação 29):

$$K_a = \frac{[ArtinM - HRP]}{[ArtinM][HRP]} \tag{29}$$

sendo que os colchetes [ ] representam concentração da espécie em particular. Assumindo que a fração de ocupação da superfície (i.e., complexo lectina-glicoproteína) seja θ, a disponibilidade de sítios livres (i.e., lectina livre) é $1 - \theta$. Portanto, a equação 29 pode ser reescrita da forma:

$$K_a[HRP] = \frac{\theta}{1 - \theta} \tag{30}$$

Resolvendo a equação 30 para θ, é possível obter a expressão:

$$\theta = \frac{K_a[HRP]}{1 + K_a[HRP]} \tag{31}$$

Como o grau de cobertura (θ) é proporcional à densidade molecular superficial (Γ, em mol/cm^2), é possível assumir que $\Gamma = \theta\Gamma_m$, sendo Γ_m é o máximo grau de recobrimento e ocorre quando θ se aproxima da unidade ($\Gamma = \Gamma_m\,, quando\ \theta \to 1$). Desta forma, a equação 31 pode elaborada em termos de Γ (equação 32):

$$\Gamma = \frac{\Gamma_m K_a[HRP]}{1 + K_a[HRP]} \tag{32}$$

A equação 32 não é uma função retilínea, mas uma curva de crescimento que tende ao valor máximo Γ_m. Por praticidade, a equação 32 pode ser linearizada, tendo como resultado final (equação 33):

$$\frac{[HRP]}{\Gamma} = \frac{[HRP]}{\Gamma_m} + \frac{1}{K_a\Gamma_m} \tag{33}$$

Importante notar que para a obtenção da constante de afinidade da interação biomolecular lectina-glicoproteína por meio da equação 33 (K_a), deve-se conhecer a densidade molecular superficial da glicoproteína em função de sua concentração. Muitos trabalhos têm utilizado diferentes técnicas para estimar esse valor, como a piezelétrica e óptica, [51, 184] em que um sinal transdutor genérico R é função de Γ. Neste trabalho, propomos estimar o grau de cobertura utilizando como sinal transdutor a capacitância eletroquímica, C_r, ou especificamente $R = 1/C_{r[glicoproteína]} - 1/C_{r[Branco]}$, visto que este sinal é sensível à concentração do analito.[2; 10] Desta forma, a equação 33 pode ser escrita como:

$$\frac{[HRP]}{R} = \frac{[HRP]}{R_m} + \frac{1}{K_a R_m} \tag{34}$$

sendo R_m o máximo sinal.

Esta abordagem matemática pode ser utilizada para estimar a constante de afinidade por meio do ajuste dos dados experimentais obtidos na forma $[HRP]/R$ x $[HRP]$ sendo $[HRP]/R$ com unidades de mol L^{-1} F cm^{-2}. O valor de K_a pode ser obtido por meio do quociente entre os coeficientes angular ($1/R_m$) e linear ($1/K_a R_m$) da equação 34.

Com este objetivo, construiu-se uma monocamada bifuncional sobre eletrodo de ouro devidamente limpo e caracterizado (seção 2) utilizando solução etanólica contendo 2 mmol/L de 11Fc (para transdução de sinal) e 0,2 mmol/L de 16Mhx (para acoplamento da lectina ArtinM). Para isso, o eletrodo foi mergulhado nessa solução por 16 h (25°C), sendo lavado com etanol após esse período.

A monocamada bifuncional obtida por meio dessa abordagem possui grau de empacotamento similar ao encontrado anteriormente, com densidade molecular superficial de $\Gamma_{SAM} = (4{,}2 \pm 0{,}4)x10^{-10} mol/cm^2$, obtido por meio da integração de pico de redução da dessorção eletroquímica da SAM em meio básico. A densidade molecular superficial do 11Fc estimada nesta monocamada bifuncional por voltametria cíclica (integração do pico de oxidação) corresponde a $(2{,}0 \pm 0{,}1)x10^{-10} mol/cm^2$, na mesma ordem de grandeza daquela obtida anteriormente (seção 5.3). Os picos de corrente catódica e anódica apresenta relação $ip_c/ip_a \approx 1$, com separação de potencial de 30 mV.

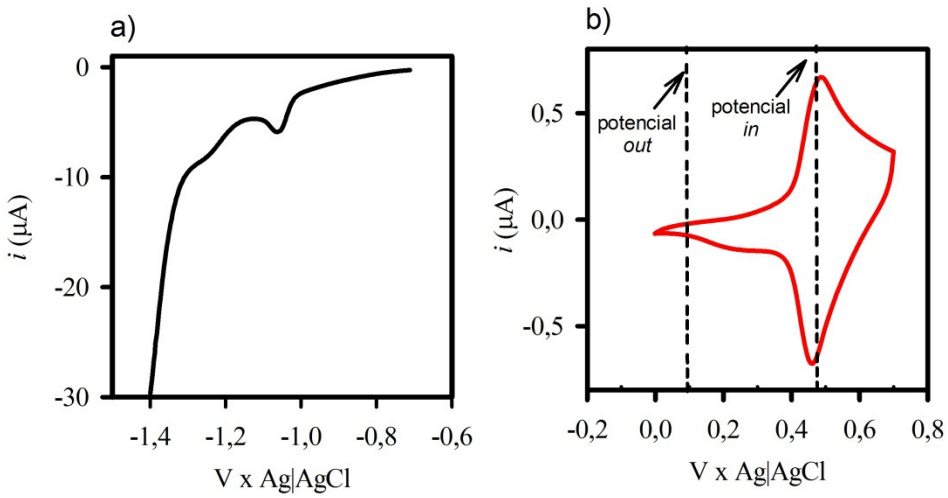


Figura 30 - Caracterização eletroquímica obtida para o eletrodo de ouro modificado com 11Fc e 16MHx para a realização do glico-ensaio. a) Voltamograma obtido no processo de dessorção eletroquímica da monocamada bifuncional obtida a partir de solução contendo 2 mmol/L de 11Fc e 0,2 mmol/L de 16MHx, realizado em meio básico (0,5 mol/L de KOH a uma velocidade de varredura de 0,1V/s). b) Voltamograma cíclico obtido em solução 20 mmol/L de TBA da monocamada bifuncional na velocidade de varredura de 0,1 V/s. No voltamograma, estão especificados os potenciais *in* ($\sim\mathbf{0,48}\boldsymbol{V}$) e *out* ($\mathbf{0,1}\ \boldsymbol{V}$).
Fonte: autor

Medidas de impedância no potencial *in* $(\sim 0{,}48\ V\ vs\ Ag|AgCl)$ foram realizadas utilizando sistema padrão de três eletrodos, com amplitude de 10 mV numa faixa de frequências de 10 mHz a 100 kHz em solução de perclorato de tetrabutilamônio (20 mmol/L dissolvido numa mistura água/acetonitrila de 80/20, v/v) para a superfície funcionalizada com a lectina ArtinM e bloqueada com gelatina 0,1%, como descrito na seção 2. As soluções e HRP foram preparadas em solução tampão PBS (pH 7,4) numa faixa de concentração de 0,5 nmol/L a 100 nmol/L, que corresponde àquelas utilizadas em trabalhos similares.[185]

Importante notar que, como já discutido, o diagrama de Nyquist (Figura 31b) nada fornece de informações do sistema em estudo ao variar a concentração de ligante. Entretanto, ao transformar os dados para o diagrama de capacitâncias, percebe-se nitidamente a diferença de sinal para cada concentração de ligante (Figura 31c). Esta diferença ocorre devido à natureza de transdução de sinal, como já comentado anteriormente (seção 2).

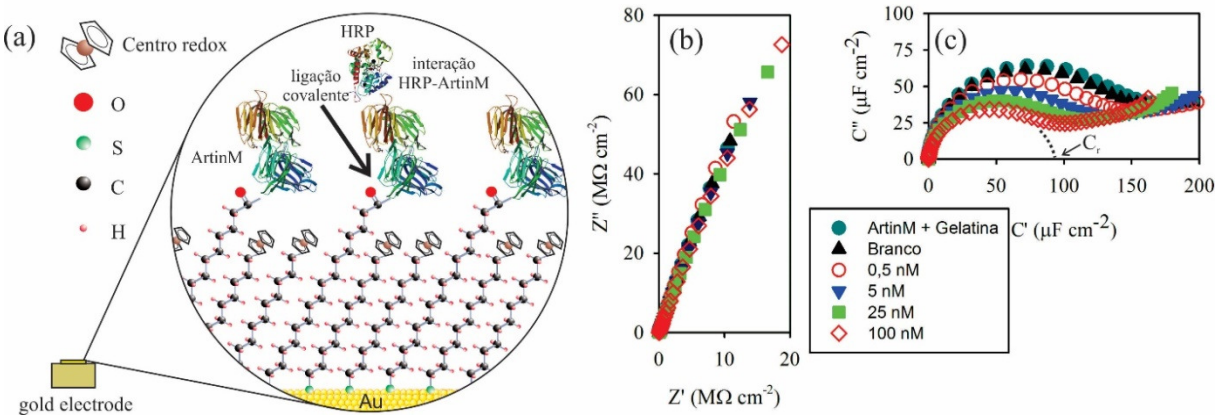


Figura 31 - Análise por espectroscopia de impedância/capacitância para o estudo da interação AntinM-HRP. a) Ilustração da SAM bifuncional obtida a partir da solução contendo 11Fc (para transdução de sinal) e 16MHx para acoplamento da lectina ArtinM. b) Diagrama de Nyquist obtido após interagir a superfície modificada com diferentes concentração de analito (HRP). c) Diagrama de Nyquist para as capacitâncias real e imaginária obtida a partir dos dados do item (b) conforme descrito na seção 2. Fonte: autor, adaptado da referência 143

Utilizando o sinal de capacitância eletroquímica, foi possível construir a curva de saturação (Figura 32a). Neste caso, a curva possui uma única região de máximo recobrimento (80 nmol/L), característico da Isoterma de Langmuir na formação de monocamada. Por meio da linearização dos dados mostrados na Figura 32a, pode-se obter o parâmetro K_a (Figura 32b). O valor encontrado é de (1,6 ± 0,6) x 10^8 L/mol. Para verificar o nível de resposta não específica, foi utilizado solução de BSA (proteína não glicosilada) a 100 nmol/L em PBS (Figura 32c). Como observado, o sinal relativo de resposta, calculado pela relação $R_n(\%) = 100\ (R_n - R_0)/R_0$ (que corresponde, intrinsicamente, com a resposta específica da superfície para a espécie n, HRP ou BSA, com relação à solução tampão), apresenta valores não maiores do que 4% para BSA, em contraste com HRP que apresenta variação de 55%. De fato, o *valor-p* igual a $p = 0{,}007$, a um nível de significância de $\alpha = 0{,}05$, evidencia a rejeição da hipótese de que as médias são iguais a um intervalo de confiança de 95%.

Importante notar que o valor de K_a obtido por essa abordagem é maior do que aquele determinado por QCM para uma mesma interação biológica.[51] Entretanto, é conveniente notar que a faixa de concentração utilizada naquele trabalho situa-se, pelo menos, em nível de 1.500 vezes maior (1,5 x 10^5 – 7,5 x 10^5 nmol/L) do que a faixa utilizada neste trabalho (0,5-100 nmol/L), concentração da qual a HRP pode existir na forma complexada ou em agregados.[186] Esta observação é crucial do ponto de vista do modelo, visto que a isoterma de Langmuir é melhor aplicável em situações das quais a interação ligante-ligante é minimizada, ou seja, em altas diluições. Isto significa que a constante de afinidade obtida nestas condições

melhor satisfaz as premissas do modelo de Langmuir do que em altas concentrações, que inerentemente podem se desviar do modelo.[186]

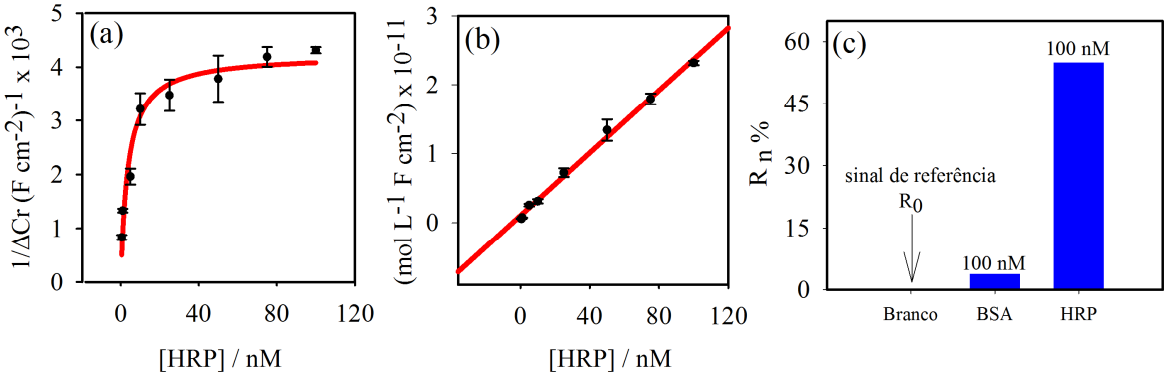


Figura 32 - a) Curva de saturação obtida por meio do sinal de capacitância eletroquímica, que pode ser linearizada, como mostrado em (b). c) Resposta do sensor frente a uma proteína não específica (BSA). Fonte: autor, adaptado da referência 143

Do ponto de vista analítico, a detecção de manose (presente na glicoproteína HRP utilizada como modelo) pode ser obtida utilizando esta abordagem. Como mostrado na Figura 33, o sinal de capacitância eletroquímica também pode ser utilizado como ferramenta para a determinação desta glicoproteína utilizando ArtinM como espécie de reconhecimento, com um LD de 200 pmol/L, LQ de 660 pmol/L, desvio-padrão relativo de 7% e sensibilidade de 1531 F cm^{-2} por década de concentração de HRP e com reta de regressão com coeficiente de determinação $R^2 = 0{,}98$. Importante notar que outros carboidratos podem ser detectados utilizando a mesma abordagem, e nosso grupo de pesquisa já tem trabalhado neste sentido.

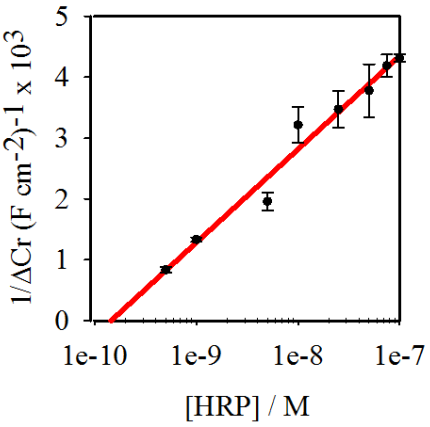


Figura 33 - Curva de calibração para a detecção da glicoproteína HRP utilizando o sinal de capacitância eletroquímica no potencial *in* de $\mathbf{0,48}\boldsymbol{V\ x\ Ag|AgCl}$.
Fonte: autor

5.5 Funções de imitância como transdução de sinal de biorreconhecimento: uma nova abordagem para glycoarray?

Além do tradicional conceito de que os carboidratos são fontes de energia para os seres não-fotossintéticos e de exercerem funções estruturais,[187] na atualidade é muito reconhecido que eles fazem parte de inúmeros processos biológicos como sinalização[188] e invasão celular.[189] Em glicobiologia (ciência que se preocupa em estudar a estrutura, biossíntese e funções dos carboidratos/glicanas)[190] estima-se que mais de 50% das proteínas conhecidas são glicosiladas e que existem cerca de 200 genes que decodificam glicosiltransferases (enzimas relacionadas à glicosilação, processo em que um carboidrato é incorporado a outra molécula orgânica).[34] A glicosilação envolve inúmeros eventos e funções biológicas, tais como na estruturação, estabilidade e tempo de vida de glicoproteínas;[191] sinalização celular, resposta inflamatória e infecção por microrganismos.[192] Sendo a expressão de glicosiltransferases um processo altamente regulado biologicamente, alteração no padrão de glicosilação está relacionada a patologias como diabetes,[193] males neurodegenerativos,[193] câncer e progressão de célula metastática.[19,194] Adicionalmente, na indústria farmacêutica, a variação da glicosilação também tem sido associada à eficácia e segurança de medicamentos a base de proteínas, das quais a sua maioria são glicosilados.[195] Desta forma, a análise da glicosilação (i.e., glicoanálise) desses medicamentos é de fundamental importância para sua aprovação e licenciamento, sendo requerido como controle de qualidade e monitoramento; bem como no estudo de "similaridade" de medicamentos genéricos.[191]

O rigoroso requerimento para a caracterização das glicanas nas glicoproteínas na obtenção de medicamentos não é único motivo que evidencia a importância de desenvolver metodologias rápidas de glicoanálise. Em outras áreas de pesquisa, como no (*i*) estudo da avaliação e compreensão das interações entre as glicanas e proteínas,[196] de vital importância na elucidação de mecanismos de sinalização e invasão celular, e na especificidade de glicosiltransferases (e no estudo de seus inibidores);[192] (*ii*) em pesquisa médica na elucidação de processos patogênicos, em especial o câncer;[19,197] e concomitantemente com (*iii*) o rastreio de novos biomarcadores para o diagnóstico precoce dessa doença, que urgentemente necessita de métodos de alto rendimento (análise de mais de uma amostra ao mesmo tempo) com baixos limites de detecção com alta sensibilidade e especificidade;[13,91,192] (*iv*) na avaliação da especificidade de anticorpos;[196] (*v*) no desenvolvimento de vacinas,[34] e (*vi*)

no estudo de adesão celular,[196] são evidências de como a glicoanálise é essencial em diversas áreas da pesquisa, incluindo a clínica (novas metodologias de detecção de doenças e controle de qualidade de medicamentos a base de proteínas) e médica (compreensão dos mecanismos patogênicos).

Diversas técnicas têm sido utilizadas como ferramentas para a glicoanálise, tais como a espectrometria de massas[198] e espectroscopia de ressonância magnética nuclear.[199] Embora as informações provenientes dessas técnicas podem ser detalhadas e rigorosas, o tempo, especialidade (conhecimento e compreensão da técnica) e custo requeridos para realizar as análises são fatores limitantes para a aplicação cotidiana em glicoanálise. Nas últimas décadas, o desenvolvimento de plataformas que permitem a análise múltipla utilizando vários *spots* (ou "pontos" com diferentes tipos de glicanas, Figura 34) para uma mesma amostra (por exemplo uma lectina a ser investigada), como a ressonância plasmônica de superfície (SPR, *surface plasmon ressonance*),[200,201] tem atraído a atenção como método alternativo. Entretanto, mesmo se apresentando no formato *label-free* e possibilitando o cálculo da constante de afinidade entre glicanas e lectinas,[202] a complexidade na preparação do ensaio e da análise (que geralmente utiliza experimentos de competição com amostras de carboidrato em solução), bem como o alto custo, sensibilidade da técnica na detecção de pequenas moléculas em baixas concentrações (carboidratos/glicanas) e a dificuldade na miniaturização e portabilidade,[203] inibem atualmente a sua consolidação como ferramenta em glicoanálise. O uso da técnica de microbalança a cristal de quartzo (QCM, *quartz crystal microbalance*) recai nas mesmas aplicações e limitações.[204]

O uso de glicolipídios artificiais (NGLs, *neoglycolipids*) obtidos por meio do acoplamento de glicanas a amino-fosforo-lipídios imobilizados em matrizes sólidas (como lâmina de vidro revestida com nitrocelulose)[205] têm sido amplamente utilizados desde 2003 pela comunidade científica como um método para avaliar a interação de proteínas com um grande conjunto de glicanas, possibilitando obter o seu perfil de interação (o que é designado de *glycoarray*).[205] Nessa abordagem, se faz necessário marcar a proteína sendo investigada (geralmente utilizando marcadores fluorescentes para detecção, ou para criar uma região específica na proteína para interação posterior com anticorpos marcados com agentes fluorescentes) para transdução de sinal, sendo a intensidade do sinal de florescência proporcional à quantidade de lectina ligada (Figura 34). Por exemplo, Marchant *et al*.[181] ao investigarem o perfil de interação de lectina de protozoário para a compreensão do processo

de invasão celular por *T. gondii*, primeiramente necessitaram marcar a lectina com histidina (His). A lectina marcada com His foi primeiramente pré-complexada com anticorpos monoclonais anti-polihistidina de camundongo e anticorpo anti-(anticorpo de camundongo) marcados com biotina. Para a avaliação da interação, streptavidina marcada com composto fluorescente foi utilizada. A intensidade do sinal é proporcional à quantidade de lectina ligada à glicana do glicolipídio no "*micro-array*" constituído de 400 diferentes glicanas (i.e., *spots*). Todo o processo descrito acima foi detalhado com o intuito de exemplificar a complexidade e múltipla etapa da análise e, não menos importante, em evidenciar que a proteína a ser estudada deve ser marcada, processo que pode interferir no ensaio de interação.[43] Além desse inconveniente associado à complexidade de obtenção dos NGLs, essa abordagem é realizada apenas no Reino Unido no *Glycosciences Laboratory - Imperial College London* (https://www1.imperial.ac.uk/glycosciences/)[205] que disponibiliza aproximadamente 830 alvos (glicanas). Entretanto, a análise deve ser requisitada via internet [https://glycosciences.med.ic.ac.uk/request.html] e avaliada. Depois de aceito, o ensaio *glycoarray* é realizado e os resultados disponibilizados. Além dessa plataforma, o *Consortium for Functional Glycomins* (CFG) disponibiliza o segundo sistema *glycoarray* utilizando várias glicanas (609 alvos) para a comunidade científica (http://www.functionalglycomics.org/static/index.shtml). Similar ao anteriormente descrito, o protocolo para a construção do *array* é baseado na imobilização de diversos tipos de glicanas contendo grupos amina em superfícies ativadas com N-hidroxissuccinimida (NHS) (a diferença entre as duas abordagens é que a última dispensa o uso de lipídios) e a utilização da proteína (ou espécie sendo investigada) marcada com espécie fluorescente para a avaliação da interação. Como no primeiro caso, o pesquisador que deseja obter o perfil de interação da espécie sendo investigada deve requisitar via internet [http://www.functionalglycomics.org/glycomics/common/jsp/resource/resourceRequest.jsp] e aguardar a aprovação do comitê.

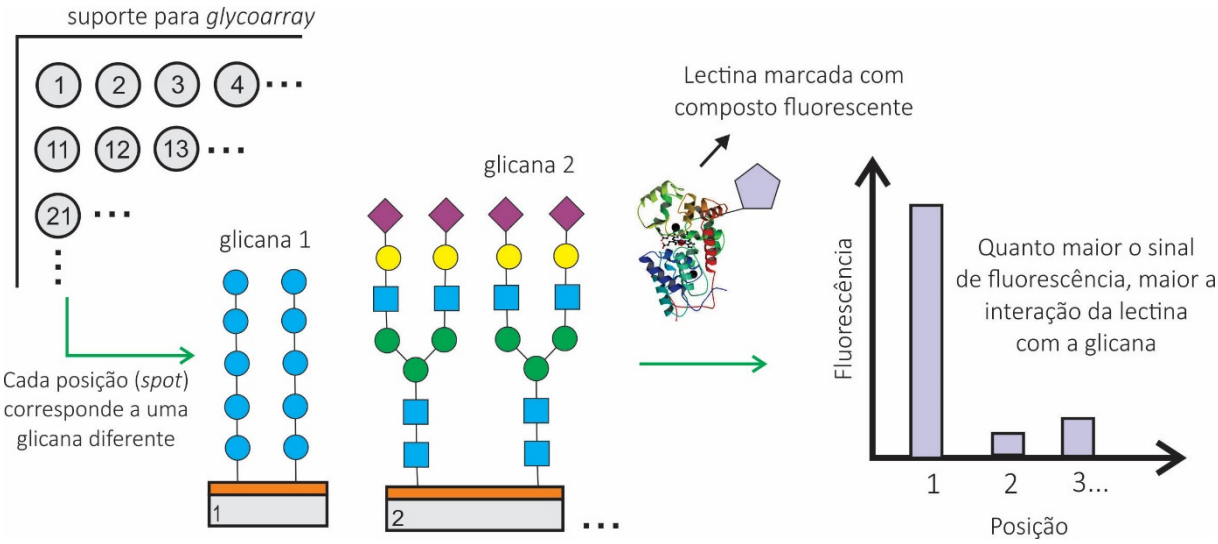


Figura 34 - Exemplo de glycoarray para o estudo da interação entre lectinas e carboidratos.
Fonte: autor

Neste contexto, torna-se evidente a necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias para a glicoanálise que sejam rápidas, miniaturizáveis, sensíveis e de alto rendimento, e que pudessem estar disponíveis tanto para glicobiólogos como para os demais pesquisadores a realizarem suas investigações em seus próprios centros de pesquisa; ou ao menos tecnologias que pudessem fornecer maiores alternativas de glicoanálise para a comunidade científica nacional e internacional, que cada vez mais demandam rapidez na pesquisa.

Uma forma de contornar esse problema envolve o uso de transdutores eletroquímicos que, por apresentarem intrinsicamente maior sensibilidade (em comparação com QCM e SPR) aliada à possibilidade de miniaturização e relativo baixo custo, se apresentam no formato *label-free* (não é necessário utilizar marcadores para avaliar a interação glicana-proteína).[4,191] Em especial, a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) associada com as funções complexas de imitância (impedância [Z*], admitância [Y*], capacitância [C*] e módulo [M*]) tem se demonstrado viável quando aplicadas na otimização do tempo de análise (geralmente em poucos minutos e até segundos) tanto com o uso de espécie eletroativa em solução como ancorada,[23,24] superiores às tradicionais aplicações da EIE.[10,185] Entretanto, até o momento, o uso das funções de imitância na análise de interações entre biomoléculas está restrito no tipo antígeno-anticorpo. Neste contexto, pretendeu-se utilizar as funções de imitância na aplicação do estudo de interações entre glicoproteína-lectina.

Como superfície de reconhecimento, foi construída uma monocamada bifuncional análoga à apresentada na seção anterior, bem como o mesmo modelo de interação lectina-

glicoproteína como forma de comparação de resultados (i.e., SAM composta por 11-ferrocenil-undecanotiol e ácido 16-mercaptohexadecanóico, interação entre a glicoproteína HRP e lectina ArtinM). Após a funcionalização do eletrodo com a lectina e bloqueio com gelatina, os ensaios de reconhecimento biológico foram realizados variando a concentração de glicoproteína HRP dissolvida em tampão PBS pH 7,4, na faixa de concentração de 0,5-100 nmol/L. A resposta relativa de cada parâmetro analítico (funções de imitância e suas relações) é mostrada na Figura 35.

Como forma de obter a melhor frequência de resposta (ou faixa de frequências) em um determinado sinal analítico, alguns critérios foram utilizados, são eles: maximização da sensibilidade, coeficiente de regressão linear $R^2 > 0,95$, forte correlação linear entre sinal *versus* concentração do analito (i.e., coeficiente de Pearson) $|R| > 0,97$ e desvio-padrão relativo (DPR) não maior do que 18% (repetitividade).

Por exemplo, ao analisar o sinal analítico para o parâmetro 1/C'', é possível verificar que a faixa de resposta otimizada está entre 0,1 e 20 Hz (área hachurada na Figura 36). Convertendo os dados de impedância em todos os 18 parâmetros analíticos propostos, é possível verificar a frequência otimizada para cada sinal transdutor (Tabela 5). Todas as curvas analíticas são mostradas na Figura 37. A detecção e sensibilidade para a análise de HRP utilizando o parâmetro 1/C'' na frequência de 7,04 Hz apresenta a de maior sensibilidade (37% pode década de concentração de HRP) com limite de detecção (LD) de 0,4 nmol/L, com mesma ordem de magnitude apresentada na abordagem anterior (seção 5.4, de 0,2 nmol/L). Por outro lado, ao analisar a parte real da admitância (Y'), é possível obter um limite de detecção menor (0,06 nmol/L) em maior frequência (9,24 Hz). Importante notar que todos os sinais não são sensíveis quando se utiliza BSA (proteína não glicosilada) como controle negativo (Figura 38).

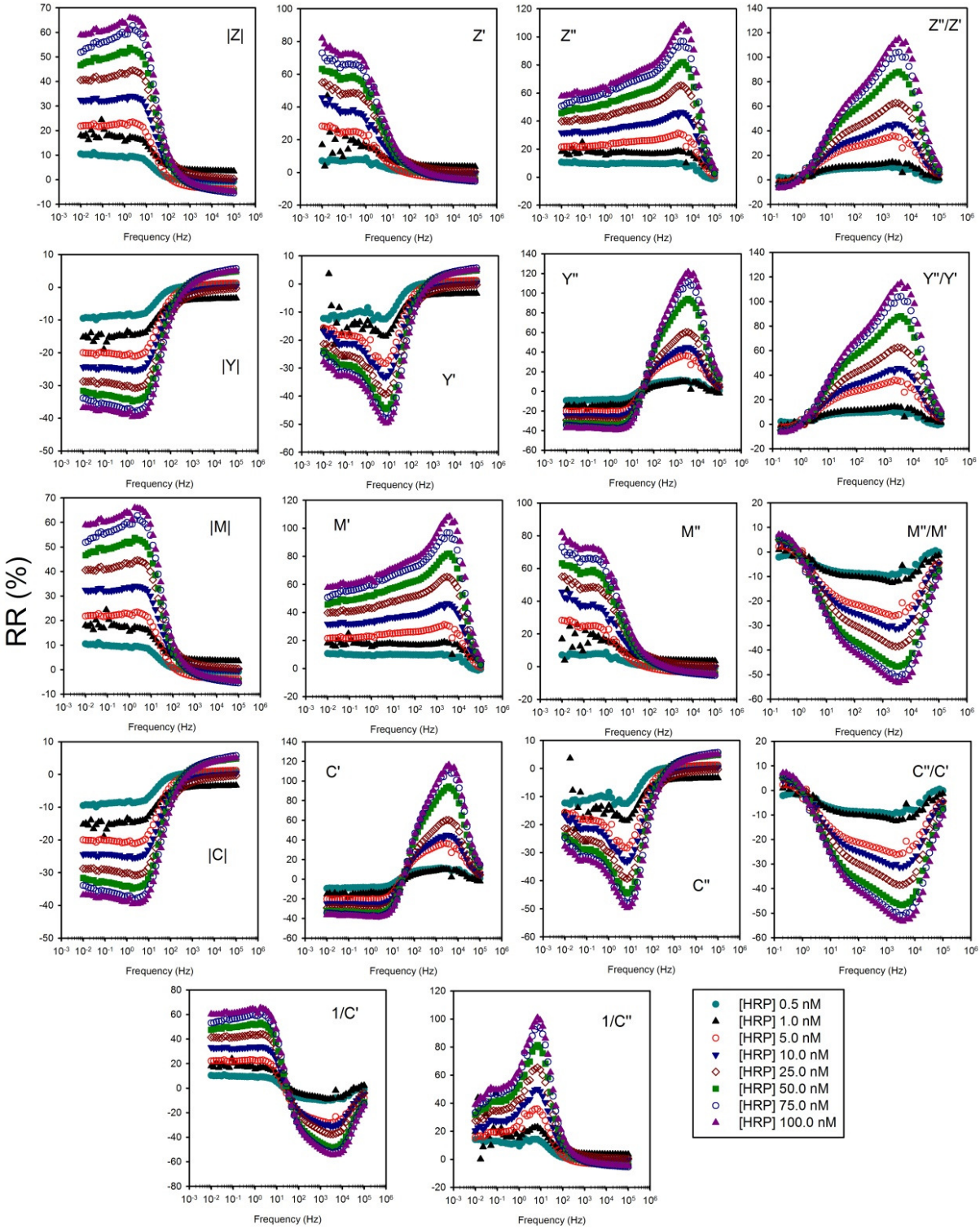


Figura 35 - Resposta relativa (***RR***) dos 18 parâmetros analisados na faixa de frequência de 0,01 – 100,000 Hz variando a concentração de HRP de 0,5 a 100,0 nmol/L. Desde que $\boldsymbol{C}^*$, $\boldsymbol{Y}^*$ e $\boldsymbol{M}^*$ são funções derivadas de $\boldsymbol{Z}^*$, algumas funções apresentam resposta similar. Por exemplo, compare $\boldsymbol{Z}^*$ e $\boldsymbol{M}^*$, $\boldsymbol{C}^*$ e $\boldsymbol{Y}^*$.
Fonte: referência 137

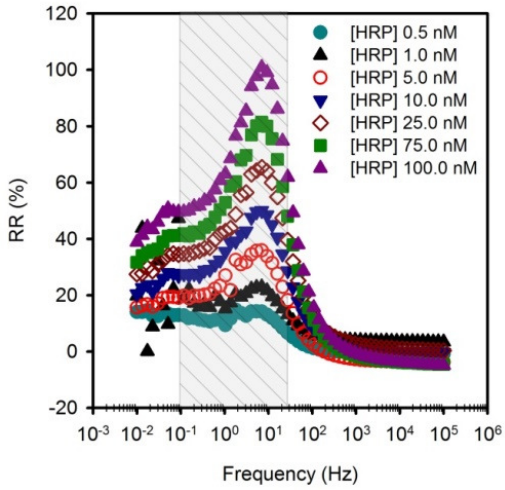


Figura 36 - Resposta de $\mathbf{1}/\boldsymbol{C''}$ em função da concentração de HRP para toda faixa de frequências. A área hachurada demarca a faixa de frequência (0,1 – 20 Hz) que corresponde àquelas que apresentam maior sensibilidade analítica com $R^2 > 0,95$.
Fonte: referência 137

Tabela 5 - Frequências otimizadas de diferentes funções de imitância ($\boldsymbol{ImFs}$) para o estudo da interação ArtinM-HRP. Os valores da constante de afinidade ($\boldsymbol{K_a}$) são similares àquele calculado previamente por capacitância redox (p-valor > 0,09) considerando nível de significância de 5%.

ImF	*Frequência otimizada (Hz)*	R^2	*R (Pearson)*	*Sensibilidade (% decada^{-1})*	*LD (nmol/L)*	K_a $(x10^8\ L\ /mol)$
$\lvert Z\rvert$	2.35	0.96	0.98	24	0.30	1.2±0.4
Z'	0.45	0.96	0.98	26	0.40	1.2±0.3
Z''	0.45	0.96	0.98	22	0.30	1.3±0.4
Z''/Z'	108.12	0.96	0.98	27	1.08	1.1±0.3
$\lvert Y\rvert$	2.35	0.99	-0.99	-13	0.08	2.1±0.7
Y'	9.24	0.99	-0.99	-16	0.06	2.3±0.7
Y''	0.05	0.99	-0.99	-12	0.06	2.3±0.8
Y''/Y'	108.12	0.96	0.98	27	1.08	1.1±0.3
$\lvert C\rvert$	2.35	0.99	-0.99	-13	0.08	2.1±0.7
C'	0.05	0.99	-0.99	-12	0.06	2.3±0.8
C''	9.24	0.99	-0.99	-16	0.06	2.3±0.7
C''/C'	4953	0.98	-0.99	-21	0.30	1.2±0.2
$1/C'$	0.60	0.96	0.98	23	0.30	1.3±0.4
$1/C''$	7.04	0.96	0.98	37	0.40	1.1±0.4
$\lvert M\rvert$	2.35	0.96	0.98	24	0.30	1.2±0.4
M'	0.45	0.96	0.98	22	0.30	1.3±0.4
M''	0.45	0.96	0.98	26	0.40	1.2±0.3
M''/M'	4953	0.98	-0.99	-21	0.30	1.2±0.2
$1/C_r$	-	0.97	0.98	23	0.20	1.8±0.7

Fonte: Adaptada da referência 137

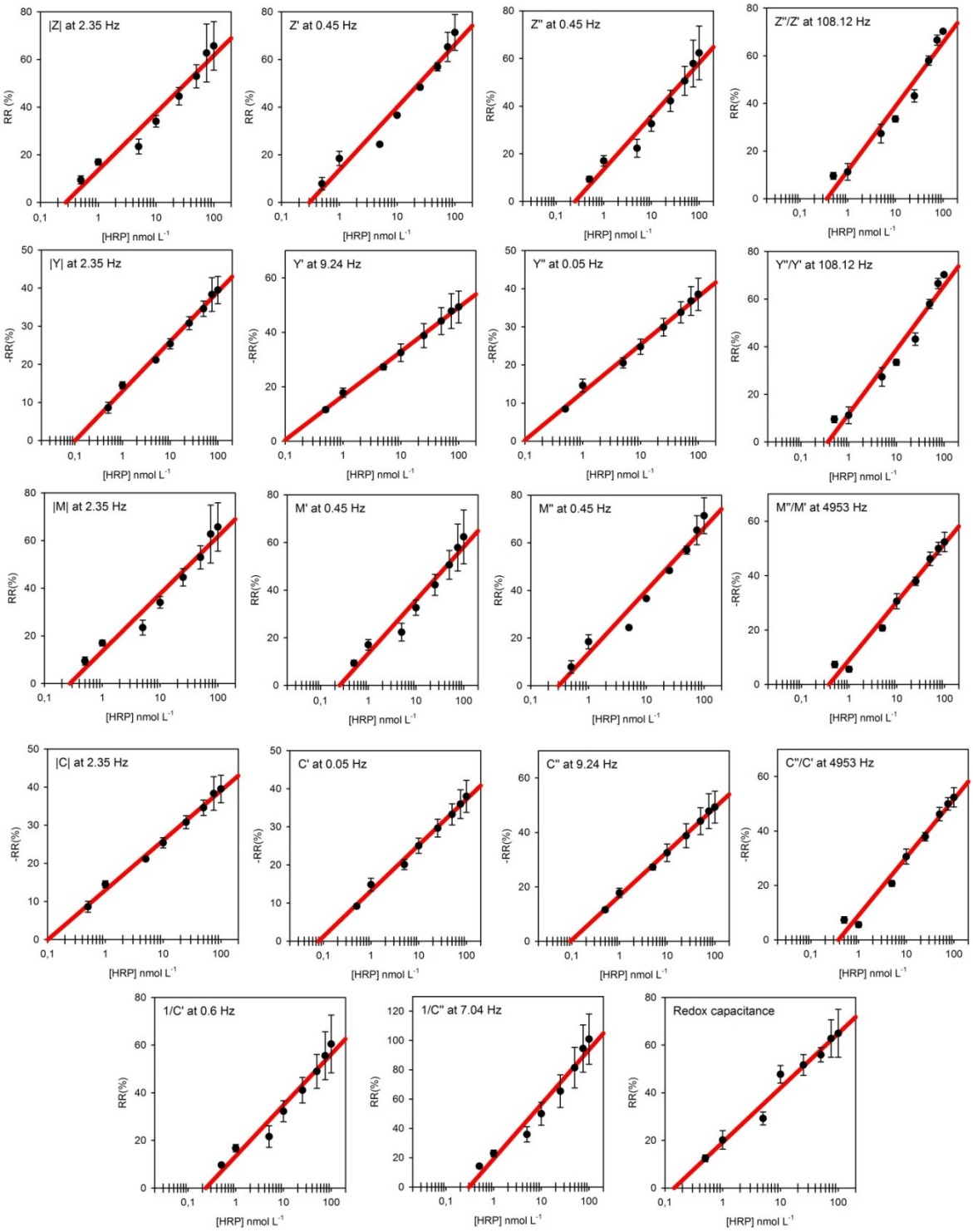


Figura 37 - Curvas analíticas obtidas nas frequências otimizadas para todos os 18 parâmetros analíticos e capacitância eletroquímica como comparação. As barras de erros mostram o desvio em três diferentes eletrodos. Note que $\boldsymbol{RR}$ significa resposta relativa porcentual. O ajuste linear de cada função na frequência otimizada é mostrado nas curvas em vermelho.
Fonte: referência 137

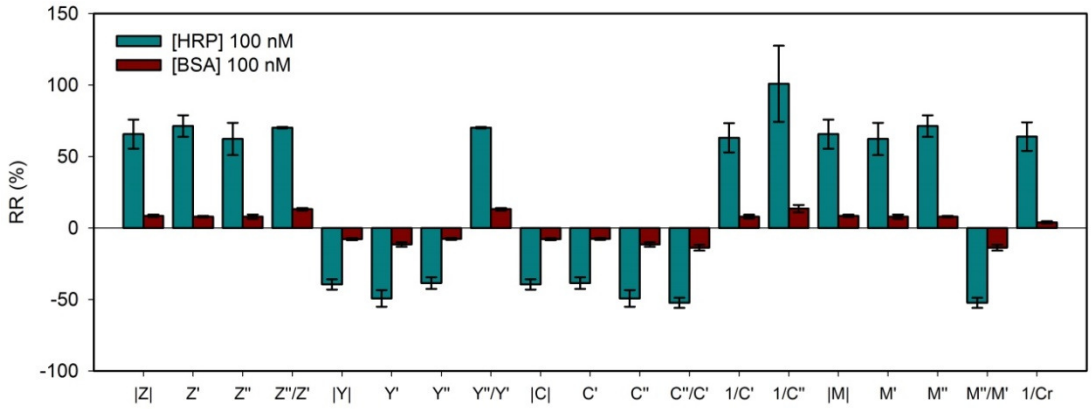


Figura 38 - Controles negativos para diferentes funções de imitância utilizando BSA na maior concentração utilizada para HRP (100 nmol/L). Os valores-p ($\boldsymbol{p < 0,0024}$, $\boldsymbol{\alpha = 0,05}$) evidenciam que a superfície não responde à BSA.
Fonte: referência 137

Interessantemente, a análise mais detalhada do conjunto das funções de imitância claramente demonstra que existe uma faixa ótima de frequências onde a sensibilidade não se altera consideravelmente. Por exemplo, Z'' e M' apresentam sensibilidade constante numa ampla faixa de frequências, de 0,15-962 Hz, com sensibilidade de (26±4)% por década. A maior sensibilidade é 30% por década a 245 Hz, com R^2 = 0,96. Essa observação permite realizar o ensaio numa ampla faixa de frequências ao invés de apenas uma sem perda de sensibilidade. Não obstante, essa faixa de frequências apresenta vantagem frente à metodologias que utilizam uma ampla faixa de frequências (usualmente de 0,01 a 100.000 Hz), desde que no primeiro caso geralmente é necessário apenas 5 minutos, enquanto no último 17 minutos.

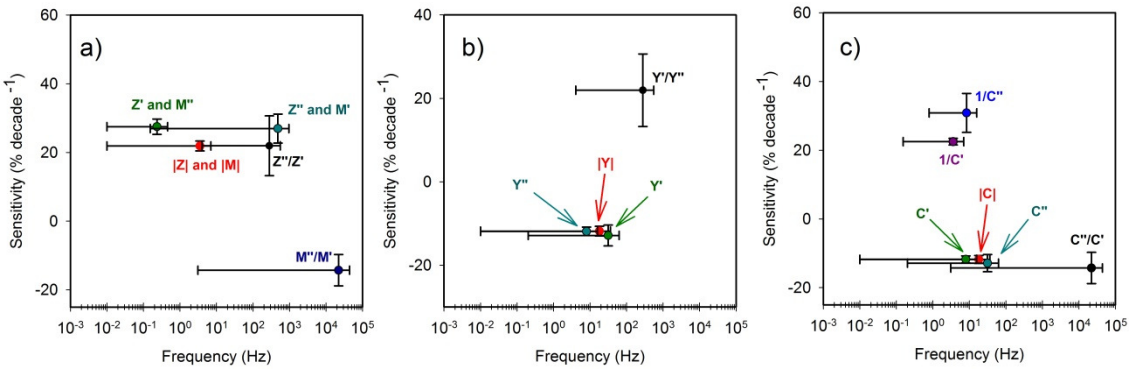


Figura 39 - Sensibilidades para diferentes funções de imitância em função da faixa de frequências. Análise para (a) $\boldsymbol{Z^*}$, $\boldsymbol{M^*}$ e $\boldsymbol{M''/M'}$; (b) $\boldsymbol{Y^*}$ e $\boldsymbol{Y''/Y'}$ e (c) $\boldsymbol{C^*}$, $\boldsymbol{C''/C'}$, $\boldsymbol{1/C'}$ e $\boldsymbol{1/C''}$. Todas as sensibilidades foram obtidas das respectivas curvas analíticas com R^2 > 0,95 numa certa faixa de frequências.
Fonte: referência 137

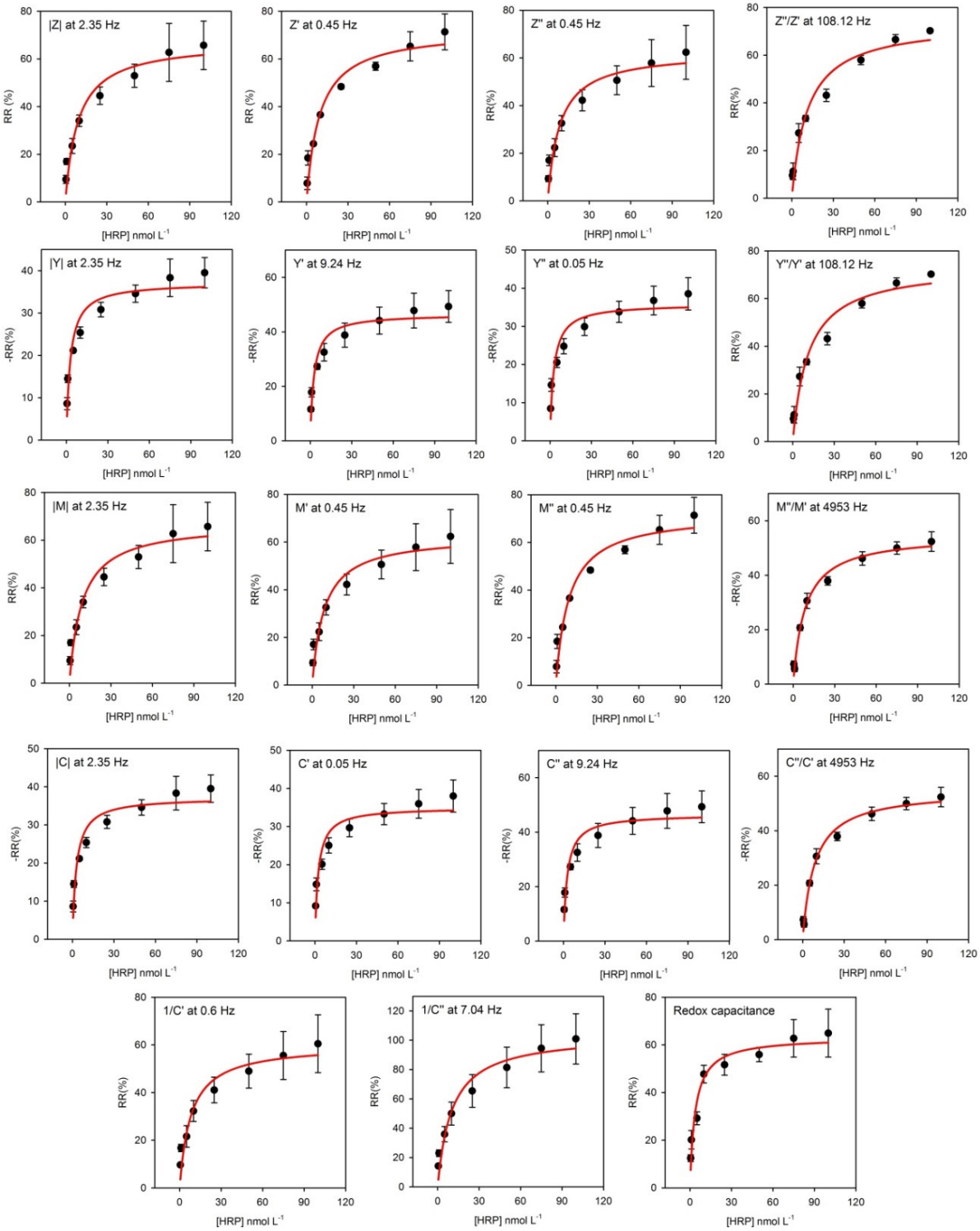


Figura 40 - Curvas de saturação obtidas, na frequência otimizada, para todos os 18 parâmetros analíticos (funções de imitância e suas relações). A curva de saturação obtida por meio da técnica de capacitância redox é mostrada para comparação. As barras de erros mostram os desvios-padrão obtidos para três diferentes eletrodos. Note que RR significa resposta relativa. As curvas em vermelho correspondem ao ajuste utilizando a isoterma de Langmuir.
Fonte: referência 137

Não apenas para fins analíticos essa abordagem pode ser utilizada. Utilizando o modelo da Isoterma de Langmuir (detalhes na seção 2), pode-se determinar a constante de afinidade entre a lectina e glicoproteína. De fato, as curvas de *sinal analítico x concentração* do ligante (também chamada de curva de saturação) típica para isoterma de Langmuir pode ser observada para todas as funções de imitância (e relações) utilizadas neste estudo (Figura 40). Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 5 e, como pode ser observado, é possível obter resultados análogos de K_a utilizando qualquer uma das funções de imitância e relações (p-valor > 0,09, α=0,05). Novamente, o benefício de se utilizar as funções de imitância recai na possibilidade de realizar rápida análise (por exemplo, utilizando o parâmetro 1/C'' a frequência otimizada é 7,04 Hz, que corresponde ao tempo de análise de apenas 4s por concentração de glicoproteína).

6 CONCLUSÕES

A capacitância eletroquímica é um fenômeno que descreve o acoplamento entre a densidade de estados eletrônica do eletrodo e a densidade de estados redox de espécies eletroativas quimicamente ligadas sobre ele. Esta capacitância, de dimensão mesoscópica, é sensível a fenômenos dielétricos e a eventos de ligação do tipo receptor-ligante em sua proximidade, e tem sido utilizado com sucesso em eletroanalítica na detecção de biomarcadores de interesse clínico.

Nesta tese foi abordado o uso da capacitância eletroquímica como sinal transdutor na construção de biossensores para detecção e quantificação de três diferentes biomarcadores. A PAP, utilizada para diagnosticar o câncer de próstata; a proteína D-dímero para confirmar a existência de trombose e glicoproteína como potencial ferramenta em estudos de interação lectina-glicoproteína. Importante notar que os biomarcadores utilizados nesta tese necessitam de novas abordagens para detecção uma vez que os métodos convencionais, como o ELISA, necessitam de pessoal treinado e impossibilitam a análise *point-of-care.* Para todos os biomarcadores, o sinal analítico obtido pelo inverso da capacitância eletroquímica apresentou forte correlação positiva com o logaritmo da concentração do analito, estimado pelo coeficiente de Pearson ($R > 0{,}9$).

As monocamadas bifuncionais construídas para todos os biossensores apresentam alto grau de densidade molecular superficial, na ordem de $4 - 5\ x\ 10^{-10} mol/cm^2$, na mesma ordem de grandeza do valor teórico reportado para o empacotamento denso de tiol em ouro cristalino ($7{,}5\ x\ 10^{-10} mol/cm^2$).

O processo de imobilização da anti-PAP, avaliada por QCM, evidencia que a saturação da superfície é alcançada em aproximadamente 1 h de interação e, por meio da densidade molecular superficial estimada pelo valor de Δf, $\Gamma_{anti-PAP} = 3{,}7\ mg/m^2$, sugere a orientação "*end-on*" dos anticorpos na superfície do eletrodo. Os ensaios eletroanalíticos, utilizando a faixa de concentração de 50-1000 pmol/L de PAP, apresentaram um LD (9 pmol/L) que se encontra na mesma ordem de grandeza de outras abordagens já apresentadas na literatura[103] e LQ de 28 pmol/L. A repetitividade, avaliada em termos de desvio-padrão relativo, foi de 9,5%. Um bom coeficiente de correlação foi obtido ($R = 0{,}99$), dentro do parâmetro recomendado pelo INMETRO ($R > 0{,}90$).[160] Os ensaios mostram-se

promissores para detecção desta proteína, uma vez que o *cut-off* é reportado como 100 pmol/L.[152]

De forma similar ao estudo da construção do biossensor para a PAP, o processo de imobilização do anticorpo para D-dímero foi investigado por QCM, e por meio dos resultados foi possível verificar que a saturação da superfície é alcançada em aproximadamente 1 h de interação, obtendo-se uma densidade molecular superficial de $\Gamma_{anti-DD} = (3{,}0 \pm 0{,}1)x10^{-7} g/cm^2 \; ou \; \approx 3{,}0\, mg/m^2$, o que corresponde a formação de uma monocamada de anticorpo com orientação intermediária entre "*end-on*" e "*side-on*".

D-dímero foi detectado na faixa de concentração 1-1000 ng/mL tanto em solução PBS como em soro comercial não diluído. Os valores de LD e LQ obtidos foram 10 e 33 ng/L (em PBS) e 1,4 e 4,6 μg/L (em soro), respectivamente. O aumento dos valores dessas figuras de mérito está relacionado aos interferentes presentes no soro, que também prejudicaram o ensaio em termos de repetitividade, com aumento de 11% do desvio-padrão relativo em PBS para 14% em soro. Entretanto, a abordagem apresentada se mostrou mais atraente quando comparado com amperometria (LD de 25 μg/L em soro)[179], por exemplo.

A capacitância eletroquímica também foi avaliada como sinal transdutor para o cálculo de constante de afinidade, baseado no modelo de Isoterma de Langmuir. A abordagem apresentada possibilitou construir a curva de saturação utilizando concentração da glicoproteína na ordem de 1.500 vezes menor (nanomolar) quando comparado com a clássica QCM (micromolar), o que torna a abordagem mais apropriada para o cálculo desta constante tendo como base a Isoterma de Langmuir. Para fins analíticos, foi possível detectar HRP na faixa de concentração de 0,5-100 nmol/L com LD e LQ de 200 pmol/L e 660 pmol/L, respectivamente, apresentando desvio-padrão relativo de 7%.

A abordagem de funções de imitância foi utilizada com o propósito de investigar a interação entre a lectina ArtinM e a glicoproteína HRP. Por meio dela, foi possível verificar que todas as funções, numa determinada frequência ou faixa de frequências, apresentaram baixo limite de detecção (na faixa de nmol/L) e com similares constantes de afinidades (valor-p > 0,09; α=0,05), dentro de parâmetros previamente estabelecidos, como R^2 > 0,95; |R|>0,97 e DPR (desvio-padrão relativo) < 18%. A importância dessa evidência recai no fato de que, por meio dessa abordagem, é possível realizar a análise numa frequência otimizada com grande economia de tempo de análise.

Por meio dos resultados obtidos, foi possível observar que tanto o sinal de capacitância eletroquímica como a abordagem por funções de imitância são promissores para o desenvolvimento de dispositivos eletroanalíticos para diagnóstico clínico, uma vez que os biomarcadores investigados nesta tese foram dectados na ordem de $\sim 10^{-15} - 10^{-9}$ mol/L, e com faixa linear que se situa na região clinicamente útel; bem como para ser utilizado como ferramenta para avaliar a constante de afinidade entre biomoléculas, com potencial aplicação em novas tecnologias para *glycoarray*.

REFERÊNCIAS

1 SANTOS, A.; CARVALHO, F. C.; ROQUE-BARREIRA, M.-C.; ZORZETTO-FERNANDES, A. L.; GIMENEZ-ROMERO, D.; MONZÓ, I.; BUENO, P. R. Evidence for conformational mechanism on the binding of TgMIC4 with β-galactose-containing carbohydrate Ligand. **Langmuir**, v. 31, n. 44, p. 12111-12119, 2015.

2 FERNANDES, F. C. B.; GÓES, M. S.; DAVIS, J. J.; BUENO, P. R. Label free redox capacitive biosensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 50, p. 437-440, 2013.

3 KIRSCH, J.; SILTANEN, C.; ZHOU, Q.; REVZIN, A.; SIMONIAN, A. Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and medicine. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 22, p. 8733-8768, 2013.

4 LUO, X.; DAVIS, J. J. Electrical biosensors and the label free detection of protein disease biomarkers. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 13, p. 5944-5962, 2013.

5 MALHOTRA, B. D.; TURNER, A. P. F. **Advances in biosensors:** perspectives in biosensors. Amsterdam: Elsevier Science, 2003. v. 5, 196 p.

6 BOHUNICKY, B.; MOUSA, S. A. Biosensors: the new wave in cancer diagnosis. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 4, p. 1-10, 2011.

7 PINGARRÓN, J. M.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; GONZÁLEZ-CORTÉS, A. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 19, p. 5848-5866, 2008.

8 JUSTINO, C. I. L.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; DUARTE, A. C. Advances in point-of-care technologies with biosensors based on carbon nanotubes. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 45, p. 24-36, 2013.

9 LISDAT, F.; SCHÄFER, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 5, p. 1555-1567, 2008.

10 FERNANDES, F. C. B.; SANTOS, A.; MARTINS, D. C.; GÓES, M. S.; BUENO, P. R. Comparing label free electrochemical impedimetric and capacitive biosensing architectures. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 57, p. 96-102, 2014.

11 SPEIGHT, R. E.; COOPER, M. A. A survey of the 2010 quartz crystal microbalance literature. **Journal of Molecular Recognition**, v. 25, n. 9, p. 451-473, 2012.

12 REDDY, P. J.; SADHU, S.; RAY, S.; SRIVASTAVA, S. Cancer biomarker detection by surface plasmon resonance biosensors. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 32, n. 1, p. 47-72, 2012.

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

14 CANCER RESEARCH UK. **Why is early diagnosys important**? London, 2015. Disponível em: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-symptoms/why-is-early-diagnosis-important/>. Acesso em: 02 fev. 2017.

15 WEBMD. **Prostate cancer survival rates**: what they mean? Atlanta, 2015. Disponível em: <http://www.webmd.com/prostate-cancer/prostate-cancer-survival-rates-what-they-mean/>. Acesso em: 02 fev. 2017.

16 TRANSPARENCY MARKET RESEARCH. **Cancer diagnostics market (tumor biomarker tests, imaging, endoscopy and biopsy)** - global industry analysis, size, share, growth, trends and forecast. Albany, 2014. Disponível em: <http://www.transparencymarketresearch.com/cancer-diagnostics-market.html>. Acesso em: 02 fev. 2017.

17 NUZZO, R. G.; ALLARA, D. L. Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 105, n. 3, p. 4481-4483, 1983.

18 ERICHSEN, H. C.; CHANOCK, S. J. SNPs in cancer research and treatment. **British Journal of Cancer**, v. 90, n. 4, p. 747-751, 2004.

19 ADAMCZYK, B.; THARMALINGAM, T.; RUDD, P. M. Glycans as cancer biomarkers. **Biochimica et Biophysica Acta**: General Subjects, v. 1820, n. 9, p. 1347-1353, 2012.

20 MISHRA, N. Applications of proteomics I: proteomics, human disease, and medicine. In:_____. **Introduction to proteomics**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010. Chap. 6, p. 137-162.

21 DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 970-979, 2004.

22 BUENO, P. R.; FELICIANO, G. T.; DAVIS, J. J. Capacitance spectroscopy and density functional theory. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 17, n. 14, p. 9375-9382, 2015.

23 PATIL, A. V.; FERNANDES, F. C. B.; BUENO, P. R.; DAVIS, J. J. Immittance electroanalysis in diagnostics. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 2, p. 944-950, 2015.

24 FERNANDES, F. C. B.; PATIL, A. V.; BUENO, P. R.; DAVIS, J. J. Optimized diagnostic assays based on redox tagged bioreceptive interfaces. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 24, p. 12137-12144, 2015.

25 HUANG, H.; ZHU, J. J. The electrochemical applications of quantum dots. **Analyst**, v. 138, n. 20, p. 5855-5865, 2013.

26 INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2014**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2014.

27 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Early detection of cancer**. 2015. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/detection/en/>. Acesso em: 06 abr. 2015.

28 DIAS, B. A.; JARDIM, C.; HOVNANIAN, A.; FERNANDES, C. J. C.; SOUZA, R. Hipertensão pulmonar associada ao tromboembolismo pulmonar crônico: limitações diagnósticas. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 7, p. 532-536, 2008.

29 ORRA, H. A. **Trombose venosa profunda**. 2002. Trabalho enviado para a obtenção do título de Membro Titular do Colégio Brasileiro de Cirurgiões. Disponível em: <http://www.clinicadrhussein.com.br/pdf/trombose.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2017.

30 EYRE, H.; KAHN, R.; ROBERTSON, R. M. Preventing cancer, cardiovascular disease, and diabetes: a common agenda for the American Cancer Society, the American Diabetes Association, and the American Heart Association. **Circulation**, v. 109, n. 25, p. 3244-3255, 2004.

31 LOCATELLI, F.; VECCHIO, L. D.; POZZONI, P. The importance of early detection of chronic kidney disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 17, n. 11, p. 2-7, 2002.

32 ALZHEIMER SOCIETY OF CANADA. **Alzheimer's disease**: the importance of early diagnosis. Toronto, 2013. Disponível em: <http://www.alzheimer.ca/~/media/Files/national/Core-lit-brochures/Importance_early_diagnosis_e.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2017.

33 PIERCE, J. D.; FAKHARI, M.; WORKS, K. V.; PIERCE, J. T.; CLANCY, R. L. Understanding proteomics. **Nursing & Health Sciences**, v. 9, n. 1, p. 54-60, 2007.

34 LEPENIES, B.; SEEBERGER, P. H. The promise of glycomics, glycan arrays and carbohydrate-based vaccines. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 32, n. 2, p. 196-207, 2010.

35 GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemica**, v. 113, n. 3, p. 236-247, 2011.

36 MAYEUX, R. Biomarkers: potential uses and limitations. **NeuroRX**, v. 1, n. 2, p. 182-188, 2004.

37 STRIMBU, K.; TAVEL, J. A. What are biomarkers? **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 5, n. 6, p. 463-466, 2010.

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

39 ROSÉN, C.; HANSSON, O.; BLENNOW, K.; ZETTERBERG, H. Fluid biomarkers in Alzheimer's disease - current concepts. **Molecular Neurodegeneration**, v. 8, 2013. doi:10.1186/1750-1326-8-20.

40 WANG, C.; LI, C.; GONG, W.; LOU, T. New urinary biomarkers for diabetic kidney disease. **Biomarker Research**, 2013. doi:10.1186/2050-7771-1-9.

41 ARYA, S. K.; BHANSALI, S. Lung cancer and its early detection using biomarker-based biosensors. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 11, p. 6783-6809, 2011.

42 LARKIN, S. E. T.; ZEIDAN, B.; TAYLOR, M. G.; BICKERS, B.; AL-RUWAILI, J.; AUKIM-HASTIE, C.; TOWNSEND, P. A. Proteomics in prostate cancer biomarker discovery. **Expert Review of Proteomics**, v. 7, n. 1, p. 93-102, 2010.

43 RAY, S.; MEHTA, G.; SRIVASTAVA, S. Label-free detection techniques for protein microarrays: prospects, merits and challenges. **Proteomics**, v. 10, n. 4, p. 731-748, 2010.

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

45 ZHAO, J.; ZHANG, X.; YONZON, C. R.; HAES, A. J.; VAN DUYNE, R. P. Localized surface plasmon resonance biosensors. **Nanomedicine**, v. 1, n. 2, p. 219-228, 2006.

46 ALLEN, B. L.; KICHAMBARE, P. D.; STAR, A. Carbon nanotube field-effect-transistor-based biosensors. **Advanced Materials**, v. 19, n. 11, p. 1439-1451, 2007.

47 HIDESHIMA, S.; HINOU, H.; EBIHARA, D.; SATO, R.; KUROIWA, S.; NAKANISHI, T.; NISHIMURA, S.-I.; OSAKA, T. Attomolar detection of Influenza A virus hemagglutinin human H1 and Avian H5 using glycan-blotted field effect transistor biosensor. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 12, p. 5641-5644, 2013.

48 BERGVELD, P. The development and application of FET-based biosensors. **Biosensors**, v. 2, n. 1, p. 15-33, 1986.

49 TKAC, J.; DAVIS, J. J. Label-free field effect proteinsensing. In: DAVIS, J. J. (Ed.). **Engineering the bioelectronic interface**: applications to analyte biosensing and protein detection. Cambridge: the Royal Society of Chemistry, 2009. Chap. 7, p. 193-224.

50 RAY, S.; MEHTA, G.; SRIVASTAVA, S. Label-free detection techniques for protein microarrays: prospects, merits and challenges. **Proteomics**, v. 10, p. 731-748, 2010.

51 PESQUERO, N. C.; PEDROSO, M. M.; WATANABE, A. M.; GOLDMAN, M. H. S.; FARIA, R. C.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; BUENO, P. R. Real-time monitoring and kinetic parameter estimation of the affinity interaction of jArtinM and rArtinM with peroxidaseglycoprotein by the electrogravimetric technique. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 1, p. 26-42, 2010.

52 FATIBELLO-FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Química Nova**, v. 15, n. 1, p. 28-39, 1992.

53 TURNER, A. F. P; KARUBE, I.; WILSON, G. S. **Biosensors**: fundamentals and applications. New York: Oxford University Press, 1987. 770 p.

54 YAKOVLEVA, M. E.; SAFINA, G. R.; DANIELSSON, B. A study of glycoprotein-lectin interactions using quartz crystal microbalance. **Analytica Chimica Acta**, v. 668, p. 80-85, 2010.

55 LIN, T.-Y.; HU, C.-H.; CHOU, T.-C. Determination of albumin concentration by MIP-QCM sensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 1, p. 75-81, 2004.

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

57 HÖÖK, F.; RODAHL, M.; BRZEZINSKI, P.; KASEMO, B. Energy dissipation kinetics for protein and antibody-antigen adsorption under shear oscillation on a quartz crystal microbalance. **Langmuir**, v. 14, p. 729-734, 1998.

58 PEDROSO, M. M.; WATANABE, A. M.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; BUENO, P. R.; FARIA, R. C. Quartz crystal microbalance monitoring the real-time binding of lectin with carbohydrate with high and low molecular mass. **Microchemical Journal**, v. 89, n. 2, p. 153-158, 2008.

59 SAUERBREY, G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. **Zeitschrift für Physik**, v. 155, n. 2, p. 206-222, 1959.

60 TAI, D.-F.; LIN, C.-Y.; WU, T.-Z.; HUANG, J.-H.; SHU, P.-Y. Artificial receptors in serologic tests for the early diagnosis of dengue virus infection. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 1486-1491, 2006.

61 SU, X.; CHEW, F. T.; LI, S. F. Y. Design and application of piezoelectric quartz crystal-based immunoassay. **Analytical Sciences**, v. 16, n. 2, p. 107-114, 2000.

62 AYELA, C.; ROQUET, F.; VALERA, L.; GRANIER, C.; NICU, L.; PUGNIÈRE, M. Antibody-antigenic peptide interactions monitored by SPR and QCM-D. A model for SPR detection of IA-2 autoantibodies in human serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 12, p. 3113-3119, 2007.

63 CAMPBELL, K.; HUET, A.-C.; CHARLIER, C.; HIGGINS, C.; DELAHAUT, P.; ELLIOTT, C. T. Comparison of ELISA and SPR biosensor technology for the detection of paralytic shellfish poisoning toxins. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 32, p. 4079-4089, 2009.

64 BAI, H.; WANG, R.; HARGIS, B.; LU, H.; LI, Y. A SPR Aptasensor for detection of avian influenza virus H5N1. **Sensors**, v. 12, n. 9, p. 12506-12518, 2012.

65 ENRICO, D. L.; MANERA, M. G.; MONTAGNA, G.; CIMAGLIA, F.; CHIESA, M.; POLTRONIERI, P.; SANTINO, A.; RELLA, R. SPR based immunosensor for detection of Legionella pneumophila in water samples. **Optics Communications**, v. 294, p. 420-426, 2013.

66 MEYER, M. H. F.; HARTMANN, M.; KEUSGEN, M. SPR-based immunosensor for the CRP detection: a new method to detect a well known protein. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 10, p. 1987-1990, 2006.

67 HOMOLA, J.; YEE, S. S.; GAUGLITZ, G. Surface plasmon resonance sensors: review. **Sensors and Actuators B**: Chemical, v. 54, p. 3-15, 1999.

68 RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 5, p. 1747-1763, 2010.

69 BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods**: fundamentals and aplications. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 2001. 864 p.

70 CHENG, A. K. H.; GE, B.; YU, H.-Z. Aptamer-based biosensors for label-free voltammetric detection of lysozyme. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 14, p. 5158-5164, 2007.

71 YAN, F.; WANG, F.; CHEN, Z. Aptamer-based electrochemical biosensor for label-free voltammetric detection of thrombin and adenosine. **Sensors and Actuators B**: Chemical, v. 160, n. 1, p. 1380-1385, 2011.

72 LABORIA, N.; FRAGOSO, A.; KEMMNER, W.; LATTA, D.; NILSSON, O.; LUZ BOTERO, M.; DRESE, K.; O'SULLIVAN, C. K. Amperometric immunosensor for carcinoembryonic antigen in colon cancer samples based on monolayers of dendritic bipodal scaffolds. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 5, p. 1712-1719, 2010.

73 HO, J.-A. A.; CHANG, H.-C.; SHIH, N.-Y.; WU, L.-C.; CHANG, Y.-F.; CHEN, C.-C.; CHOU, C. Diagnostic detection of human lung cancer-associated antigen using a gold nanoparticle-based electrochemical immunosensor. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 14, p. 5944-5950, 2010.

74 GONÇALVES, L. M.; CALLERA, W. F. A.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; BUENO, P. R. Penicillinase-based amperometric biosensor for penicillin G. **Electrochemistry Communications**, v. 38, p. 131-133, 2014.

75 MATHUR, A.; BLAIS, S.; GOPARAJU, C. M. V.; NEUBERT, T.; PASS, H.; LEVON, K. Development of a biosensor for detection of pleural mesothelioma cancer biomarker using surface imprinting. **PLoS One**, v. 8, n. 3, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0057681.

76 ISMAIL, F.; ADELOJU, S. B.; MOLINE, A. N. Fabrication of a single layer and bilayer potentiometric biosensors for penicillin by galvanostatic entrapment of penicillinase into polypyrrole films. **Electroanalysis**, v. 26, n. 12, p. 2607-2618, 2014.

77 TANG, J.; HUANG, J.; SU, B.; CHEN, H.; TANG, D. Sandwich-type conductometric immunoassay of alpha-fetoprotein in human serum using carbon nanoparticles as labels. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, n. 2, p. 223-228, 2011.

78 FISCHER, M. J. Amine coupling through EDC/NHS: a practical approach. In: MOL, N. J.; FISCHER, M. J. E (Ed.). Surface plasmon resonance: methods and protocols. New York: Humana Press, 2010. Chap. 3, p. 55-73.

79 POGHOSSIAN, A.; SCHÖNING, M. J. Label-free sensing of biomolecules with field-effect devices for clinical applications. Electroanalysis, v. 26, n. 6, p. 1197-1213, 2014.

80 CHEN, K.-I.; LI, B.-R.; CHEN, Y.-T. Silicon nanowire field-effect transistor-based biosensors for biomedical diagnosis and cellular recording investigation. Nano Today, v. 6, n. 2, p. 131-154, 2011.

81 GODA, T.; MIYAHARA, Y. Label-free and reagent-less protein biosensing using aptamer-modified extended-gate field-effect transistors. Biosensors and Bioelectronics, v. 45, p. 89-94, 2013.

82 KIM, C.-H.; AHN, J.-H.; KIM, J.-Y.; CHOI, J.-M.; LIM, K.-C.; PARK, T. J.; HEO, N. S.; GU LEE, H. G.; KIM, J.-W.; CHOI, Y.-K. CRP detection from serum for chip-based point-of-care testing system. Biosensors and Bioelectronics, v. 41, p. 322-327, 2013.

83 WANG, L.; KANG, B.; GAO, N.; DU, X.; JIA, L.; SUN, J. Corrosion behaviour of austenitic stainless steel as a function of methanol concentration for direct methanol fuel cell bipolar plate. Journal of Power Sources, v. 253, p. 332-341, 2014.

84 SALEHISAKI, M.; ARYANA, M. Effect of microstructure on corrosion behavior of Ag-30Cu-27Sn alloy in vitro media. Applied Surface Science, v. 297, p. 205-212, 2014.

85 HMAMOU, D. B.; SALGHI, R.; ZARROUK, A.; HAMMOUTI, B.; BENALI, O.; ZARROK, H.; AL-DEYAB, S. S. Studies on the inhibitive effect of potassium ferrocyanide on the corrosion of steel in phosphoric acid. Research on Chemical Intermediates, v. 39, n. 8, p. 3475-3485, 2013.

86 MONTALVILLO, M.; SILVA, V.; PALACIO, L.; CALVO, J. I.; CARMONA, F. J.; HERNÁNDEZ, A.; PRÁDANOS, P. Charge and dielectric characterization of nanofiltration membranes by impedance spectroscopy. Journal of Membrane Science, v. 454, p. 163-173, 2014.

87 BOUBOUR, E.; LENNOX, R. B. Insulating properties of self-assembled monolayers monitored by impedance spectroscopy. Langmuir, v. 16, n. 9, p. 4222-4228, 2000.

88 DANIELS, J. S.; POURMAND, N. Label-free impedance biosensors: opportunities and challenges. Electroanalysis, v. 19, n. 12, p. 1239-1257, 2007.

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

90 ESTEBAN, J. M.; ORAZEM, M. E. On the application of the Kramers-Kronig relations to evaluate the consistency of electrochemical impedance data. Journal of the Electrochemical Society, v. 138, n. 1, p. 67-76, 1991.

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

92 CONTRERAS JIMÉNEZ, G.; EISSA, S.; NG, A.; ALHADRAMI, H.; ZOUROB, M.; SIAJ, M. Aptamer-based label-free impedimetric biosensor for detection of progesterone. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 2, p. 1075-1082, 2015.

93 JOHNSON, A.; SONG, Q.; FERRIGNO, P. K.; BUENO, P. R.; DAVIS, J. J. Sensitive affimer and antibody based impedimetric label-free assays for C-reactive protein. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 15, p. 6553-6560, 2012.

94 JOHARI-AHAR, M.; RASHIDI, M. R.; BARAR, J.; AGHAIE, M.; MOHAMMADNEJAD, D.; RAMAZANI, A.; KARAMI, P.; COUKOS, G.; OMIDI, Y. An ultra-sensitive impedimetric immunosensor for detection of the serum oncomarker CA-125 in ovarian cancer patients. **Nanoscale**, v. 7, n. 8, p. 3768-3779, 2015.

95 RODRIGUEZ, M. C.; KAWDE, A.-N.; WANG, J. Aptamer biosensor for label-free impedance spectroscopy detection of proteins based on recognition-induced switching of the surface charge. **Chemical Communications**, n. 34, p. 4267-4269, 2005.

96 LIU, X.; QIN, Y.; DENG, C.; XIANG, J.; LI, Y. A simple and sensitive impedimetric aptasensor for the detection of tumor markers based on gold nanoparticles signal amplification. **Talanta**, v. 132, p. 150-154, 2015.

97 ZHOU, J.; DU, L.; ZOU, L.; ZOU, Y.; HU, N.; WANG, P. An ultrasensitive electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen detection based on staphylococcal protein A—Au nanoparticle modified gold electrode. **Sensors and Actuators B**: Chemical, v. 197, p. 220-227, 2014.

98 WANG, Y.; ZHANG, Z.; JAIN, V.; YI, J.; MUELLER, S.; SOKOLOV, J.; LIU, Z.; LEVON, K.; RIGAS, B.; RAFAILOVICH, M. H. Potentiometric sensors based on surface molecular imprinting: detection of cancer biomarkers and viruses. **Sensors and Actuators B**: Chemical, v. 146, n. 1, p. 381-387, 2010.

99 CHUA, J. H.; CHEE, R.-E.; AGARWAL, A.; WONG, S. M.; ZHANG, G.-J. Label-free electrical detection of cardiac biomarker with complementary metal-oxide semiconductor-compatible silicon nanowire sensor arrays. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 15, p. 6266-6271, 2009.

100 KARIMIAN, N.; VAGIN, M.; ZAVAR, M. H. A.; CHAMSAZ, M.; TURNER, A. P. F.; TIWARI, A. An ultrasensitive molecularly-imprinted human cardiac troponin sensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 50, p. 492-498, 2013.

101 QURESHI, A.; NIAZI, J. H.; KALLEMPUDI, S.; GURBUZ, Y. Label-free capacitive biosensor for sensitive detection of multiple biomarkers using gold interdigitated capacitor arrays. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 10, p. 2318-2323, 2010.

102 GUPTA, R. K.; PERIYAKARUPPAN, A.; MEYYAPPAN, M.; KOEHNE, J. E. Label-free detection of C-reactive protein using a carbon nanofiber based biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 59, p. 112-119, 2014.

103 LEHR, J.; FERNANDES, F. C. B.; BUENO, P. R.; DAVIS, J. J. Label-free capacitive diagnostics: exploiting local redox probe state occupancy. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 5, p. 2559-2564, 2014.

104 BOURIGUA, S.; HNAIEN, M.; BESSUEILLE, F.; LAGARDE, F.; DZYADEVYCH, S.; MAAREF, A.; BAUSELLS, J.; ERRACHID, A.; RENAULT, N. J. Impedimetric immunosensor based on SWCNT-COOH modified gold microelectrodes for label-free detection of deep venous thrombosis biomarker. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 4, p. 1278-1282, 2010.

105 QU, L.; XIA, S.; BIAN, C.; SUN, J.; HAN, J. A micro-potentiometric hemoglobin immunosensor based on electropolymerized polypyrrole–gold nanoparticles composite. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 12, p. 3419-3424, 2009.

106 AHAMMAD, A. J. S.; CHOI, Y.-H.; KOH, K.; KIM, J.-H.; LEE, J.-J.; LEE, M. Electrochemical detection of cardiac biomarker Troponin I at gold nanoparticle-modified ITO electrode by using open circuit potential. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 6, n. 6, p. 1906-1916, 2011.

107 CHAOCHAROEN, W.; SUGINTA, W.; LIMBUT, W.; RANOK, A.; NUMNUAM, A.; KHUNKAEWLA, P.; KANATHARANA, P.; THAVARUNGKUL, P.; SCHULTE, A. Electrochemical detection of the disease marker human chitinase-3-like protein 1 by matching antibody-modified gold electrodes as label-free immunosensors. **Bioelectrochemistry**, v. 101, p. 106-113, 2015.

108 MYUNG, S.; SOLANKI, A.; KIM, C.; PARK, J.; KIM, K. S.; LEE, K.-B. Graphene-encapsulated nanoparticle-based biosensor for the selective detection of cancer biomarkers. **Advanced Materials**, v. 23, n. 19, p. 2221-2225, 2011.

109 LUO, X.; LEE, I.; HUANG, J.; YUN, M.; CUI, X. T. Ultrasensitive protein detection using an aptamer-functionalized single polyaniline nanowire. **Chemical Communications**, v. 47, n. 22, p. 6368-6370, 2011.

110 LUO, X.; XU, M.; FREEMAN, C.; JAMES, T.; DAVIS, J. J. Ultrasensitive label free electrical detection of insulin in neat blood serum. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 8, p. 4129-4134, 2013.

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

112 YANG, T.; WANG, S.; JIN, H.; BAO, W.; HUANG, S.; WANG, J. An electrochemical impedance sensor for the label-free ultrasensitive detection of interleukin-6 antigen. **Sensors and Actuators B**: Chemical, v. 178, p. 310-315, 2013.

113 TALEAT, Z.; CRISTEA, C.; MARRAZZA, G.; MAZLOUM-ARDAKANI, M.; SĂNDULESCU, R. Electrochemical immunoassay based on aptamer–protein interaction and functionalized polymer for cancer biomarker detection. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 717/718, p. 119-124, 2014.

114 ELSHAFEY, R.; TLILI, C.; ABULROB, A.; TAVARES, A. C.; ZOUROB, M. Label-free impedimetric immunosensor for ultrasensitive detection of cancer marker Murine double minute 2 in brain tissue. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 39, p. 220-225, 2013.

115 RAJESH; SHARMA, V.; TANWAR, V. K.; MISHRA, S. K.; BIRADAR, A. M. Electrochemical impedance immunosensor for the detection of cardiac biomarker Myogobin (Mb) in aqueous solution. **Thin Solid Films**, v. 519, n. 3, p. 1167-1170, 2010.

116 LEE, I.; LUO, X.; CUI, X. T.; YUN, M. Highly sensitive single polyaniline nanowire biosensor for the detection of immunoglobulin G and myoglobin. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 7, p. 3297-3302, 2011.

117 MOREIRA, F. T. C.; DUTRA, R. A. F.; NORONHA, J. P. C.; SALES, M. G. F. Myoglobin-biomimetic electroactive materials made by surface molecular imprinting on silica beads and their use as ionophores in polymeric membranes for potentiometric transduction. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 12, p. 4760-4766, 2011.

118 HAN, J.; ZHUO, Y.; CHAI, Y.-Q.; YUAN, Y.-L.; YUAN, R. Novel electrochemical catalysis as signal amplified strategy for label-free detection of neuron-specific enolase. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 31, n. 1, p. 399-405, 2012.

119 CECCHETTO, J.; CARVALHO, F. C.; SANTOS, A.; FERNANDES, F. C. B.; BUENO, P. R. An impedimetric biosensor to test neat serum for dengue diagnosis. **Sensors and Actuators B**: Chemical, v. 213, p. 150-154, 2015.

120 LI, C.; CURRELI, M.; LIN, H.; LEI, B.; ISHIKAWA, F. N.; DATAR, R.; COTE, R. J.; THOMPSON, M. E.; ZHOU, C. Complementary detection of prostate-specific antigen using In2O3 nanowires and carbon nanotubes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 36, p. 12484-12485, 2005.

121 ZHENG, G.; PATOLSKY, F.; CUI, Y.; WANG, W. U.; LIEBER, C. M. Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 10, p. 1294-1301, 2005.

122 BARTON, A. C.; DAVIS, F.; HIGSON, S. P. J. Labeless immunosensor assay for prostate specific antigen with picogram per milliliter limits of detection based upon an ac impedance protocol. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 16, p. 6198-6205, 2008.

123 OKUNO, J.; MAEHASHI, K.; KERMAN, K.; TAKAMURA, Y.; MATSUMOTO, K.; TAMIYA, E. Label-free immunosensor for prostate-specific antigen based on single-walled carbon nanotube array-modified microelectrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 9/10, p. 2377-2381, 2007.

124 AHMED, A.; RUSHWORTH, J. V.; WRIGHT, J. D.; MILLNER, P. A. Novel impedimetric immunosensor for detection of pathogenic bacteria *Streptococcus pyogenes* in human saliva. Analytical Chemistry, v. 85, n. 24, p. 12118-12125, 2013.

125 SO, H.-M.; WON, K.; KIM, Y. H.; KIM, B.-K.; RYU, B. H.; NA, P. S.; KIM, H.; LEE, J.-O. Single-walled carbon nanotube biosensors using aptamers as molecular recognition elements. Journal of the American Chemical Society, v. 127, n. 34, p. 11906-11907, 2005.

126 MAY, K. L.; VOGT, A.; BACHAS, L.; ANDERSON, K. Vascular endothelial growth factor as a biomarker for the early detection of cancer using a whole cell-based biosensor. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 382, n. 4, p. 1010-1016, 2005.

127 GÓES, M. S.; RAHMAN, H.; RYALL, J.; DAVIS, J. J.; BUENO, P. R. A dielectric model of self-assembled monolayer interfaces by capacitive spectroscopy. Langmuir, v. 28, n. 25, p. 9689-9699, 2012.

128 LIN, J.; MERZLYAKOV, M.; HRISTOVA, K.; SEARSON, P. Impedance spectroscopy of bilayer membranes on single crystal silicon. Biointerphases, v. 3, n. 2, p. FA33-FA40, 2008.

129 ROMANER, L.; HEIMEL, G.; AMBROSCH-DRAXL, C.; ZOJER, E. The dielectric constant of self-assembled monolayers. Advanced Functional Materials, v. 18, n. 24, p. 3999-4006, 2008.

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

131 BÜTTIKER, M.; THOMAS, A.; PRÊTRE, A. Mesoscopic capacitors. Physics Letters A, v. 180, n. 4/5, p. 364-369, 1993.

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

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

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

135 BRYAN, T.; LUO, X. L.; BUENO, P. R.; DAVIS, J. J. An optimised electrochemical biosensor for the label-free detection of C-reactive protein in blood. Biosensors & Bioelectronics, v. 39, n. 1, p. 94-98, 2013.

136 KONDOH, H.; SAITO, N.; MATSUI, F.; YOKOYAMA, T.; OHTA, T.; KURODA, H. Structure of alkanethiolate monolayers on Cu(100): self-assembly on the four-fold-symmetry surface. Journal of Physical Chemistry B, v. 105, n. 51, p. 12870-12878, 2001.

137 SANTOS, A.; BUENO, P. R. 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.

138 OLIVEIRA, R. S. de; DIAS-BARUFFI, M.; THOMAZ, S. M.; BELTRARNINI, L. M.; ROQUE-BARREIRA, M. C. A Neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. **The Journal of Immunology**, v. 153, n. 4, p. 1798-1807, 1994.

139 TKAC, J.; DAVIS, J. J. An optimised electrode pre-treatment for SAM formation on polycrystalline gold. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 621, n. 1, p. 117-120, 2008.

140 OESCH, U.; JANATA, J. Electrochemical study of gold electrodes with anodic oxide films—I. Formation and reduction behaviour of anodic oxides on gold. **Electrochimica Acta**, v. 28, n. 9, p. 1237-1246, 1983.

141 WINK, T.; ZUILEN, S. J. V.; BULT, A.; BENNEKOM, W. P. V. Self-assembled monolayers for biosensors. **Analyst**, v. 122, n. n. 4, p. 43R-50R, 1997.

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

143 SANTOS, A.; CARVALHO, F. C.; ROQUE-BARREIRA, M.-C.; BUENO, P. R. Impedance-derived electrochemical capacitance spectroscopy for the evaluation of lectin–glycoprotein binding affinity. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 62, p. 102-105, 2014.

144 HESSELS, D.; VERHAEGH, G. W.; SCHALKEN, J. A.; WITJES, J. A. Applicability of biomarkers in the early diagnosis of prostate cancer. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 4, n. 4, p. 513-526, 2004.

145 CANCER RESERACH UK. **Prostate cancer**. London, 2016. Disponível em: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/prostate-cancer/>. Acesso em: 06 abr. 2015.

146 RODDAM, A. W.; DUFFY, M. J.; HAMDY, F. C.; WARD, A. M.; PATNICK, J.; PRICE, C. P.; RIMMER, J.; STURGEON, C.; WHITE, P.; ALLEN, N. E. Use of prostate-specific antigen (PSA) isoforms for the detection of prostate cancer in men with a PSA level of 2–10 ng/ml: systematic review and meta-analysis. **European Urology**, v. 48, n. 3, p. 386-399, 2005.

147 CHIRIACO, M. S.; PRIMICERI, E.; MONTANARO, A.; DE FEO, F.; LEONE, L.; RINALDI, R.; MARUCCIO, G. On-chip screening for prostate cancer: an EIS microfluidic platform for contemporary detection of free and total PSA. **Analyst**, v. 138, n. 18, p. 5404-5410, 2013.

148 HEALY, D. A.; HAYES, C. J.; LEONARD, P.; McKENNA, L.; O'KENNEDY, R. Biosensor developments: application to prostate-specific antigen detection. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 125-131, 2007.

149 MUNIYAN, S.; CHATURVEDI, N.; DWYER, J.; LAGRANGE, C.; CHANEY, W.; LIN, M.-F. Human prostatic acid phosphatase: structure, function and regulation. International Journal of Molecular Sciences, v. 14, n. 5, p. 10438-10464, 2013.

150 VIHKO, P. Characterization of the principal human prostatic acid phosphatase isoenzyme, purified by affinity chromatography and isoelectric focusing. Part II. Clinical Chemistry, v. 24, n. 10, p. 1783-1787, 1978.

151 TAIRA, A. V.; MERRICK, G. S.; WALLNER, K. E.; DATTOLI, M. Reviving the acid phosphatase test for prostate cancer. Oncology, v. 21, n. 8, p. 1003-1010, 2007.

152 DIEIJEN-VISSER, M. P. V.; DELAERE, K. P. J.; GIJZEN, A. H. J.; BROMBACHER, P. J. A comparative study on the diagnostic value of prostatic acid phosphatase (PAP) and prostatic specific antigen (PSA) in patients with carcinoma of the prostate gland. Clinica Chimica Acta, v. 174, n. 2, p. 131-140, 1988.

153 SAITO, T.; HARA, N.; KITAMURA, Y.; KOMATSUBARA, S. Prostate-specific antigen/prostatic acid phosphatase ratio is significant prognostic factor in patients with stage IV prostate cancer. Urology, v. 70, n. 4, p. 702-705, 2007.

154 SAITO, T.; KITAMURA, Y.; KOMATSUBARA, S. Prognosis of prostate cancer with elevated prostatic acid phosphatase. Hinyokika Kiyo. Acta Urologica Japonica, v. 52, n. 3, p. 177-180, 2006.

155 SEAMONDS, B.; YANG, N.; ANDERSON, K.; WHITAKER, B.; SHAW, L. M.; BOLLINGER, J. R. Evaluation of prostate-specific antigen and prosttic acid phosphatase as prostate cancer markers. Urology, v. 28, n. 6, p. 472-479, 1986.

156 CHEN, S.; LI, L.; ZHAO, C.; ZHENG, J. Surface hydration: principles and applications toward low-fouling/nonfouling biomaterials. Polymer, v. 51, n. 23, p. 5283-5293, 2010.

157 HLADY, V.; BUIJS, J. Protein adsorption on solid surfaces. Current Opinion in Biotechnology, v. 7, n. 1, p. 72-77, 1996.

158 SAENGER, W. Structure and dynamics of water surrounding biomolecules. Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry, v. 16, n. 1, p. 93-114, 1987.

159 RODAHL, M.; HÖÖK, F.; FREDRIKSSON, C.; KELLER, C. A.; KROZER, A.; BRZEZINSKI, P.; VOINOVA, M.; KASEMO, B. Simultaneous frequency and dissipation factor QCM measurements of biomolecular adsorption and cell adhesion. Faraday Discussions, v. 107, p. 229-246, 1997.

160 VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. Química Nova, v. 32, p. 1278-1287, 2009.

161 BOUNAMEAUX, H.; DE MOERLOOSE, P.; PERRIER, A.; REBER, G. Plasma measurement of D-dimer as diagnostic aid in suspected venous thromboembolism: an overview. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 71, n. 1, p. 1-6, 1994.

162 TSAI, J.; GROSSE, S. D.; GRANT, A. M.; HOOPER, W.; ATRASH, H. K. Trends in in-hospital deaths among hospitalizations with pulmonary embolism. **Archives of Internal Medicine**, v. 172, n. 12, p. 960-961, 2012.

163 HAAPANIEMI, E.; TATLISUMAK, T. Is D-dimer helpful in evaluating stroke patients? A systematic review. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 119, n. 3, p. 141-150, 2009.

164 WAKAI, A.; GLEESON, A.; WINTER, D. Role of fibrin D-dimer testing in emergency medicine. **Emergency Medicine Journal**, v. 20, n. 4, p. 319-325, July 2003.

165 ANTOVIĆ, J. »Point-of-care« D-dimer testing. **Journal of Medical Biochemistry**, v. 29, n. 4, p. 282-287, 2010.

166 GUTIÉRREZ, A.; SÁNCHEZ-PAYÁ, J.; MARCO, P.; PÉREZ-MATEO, M. Prognostic value of fibrinolytic tests for hospital outcome in patients with acute upper gastrointestinal hemorrhage. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 32, n. 4, p. 315-318, 2001.

167 YANG, X.-Y.; GAO, S.; DING, J.; CHEN, Y.; ZHOU, X.-S.; WANG, J.-E. Pasma D-dimer predicts short-term poor outcome after acute ischemic stroke. **PLoS One**, v. 9, n. 2, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0089756.

168 ADAM, S. S.; KEY, N. S.; GREENBERG, C. S. D-dimer antigen: current concepts and future prospects. **Blood**, v. 113, n. 13, p. 2878-2887, 2009.

169 ELMS, M. J.; BUNCE, I. H.; BUNDESEN, P. G.; RYLATT, D. B.; WEBBER, A. J.; MASCI, P. P.; WHITAKER, A. N. Rapid detection of cross-linked fibrin degradation products in plasma using monoclonal antibody-coated latex particles. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 85, n. 3, p. 360-364, 1986.

170 LUPPA, P. B.; SOKOLL, L. J.; CHAN, D. W. Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 314, n. 1/2, p. 1-26, 2001.

171 ROSSIER, J. S.; GIRAULT, H. H. Enzyme linked immunosorbent assay on a microchip with electrochemical detection. **Lab on a Chip**, v. 1, n. 2, p. 153-157, 2001.

172 IBUPOTO, Z. H.; JAMAL, N.; KHUN, K.; LIU, X.; WILLANDER, M. A potentiometric immunosensor based on silver nanoparticles decorated ZnO nanotubes, for the selective detection of d-dimer. **Sensors and Actuators B**: Chemical, v. 182, p. 104-111, 2013.

173 CHEBIL, S.; HAFAIEDH, I.; SAURIAT-DORIZON, H.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; ERRACHID, A.; ALI, Z.; KORRI-YOUSSOUFI, H. Electrochemical detection of d-dimer as deep vein thrombosis marker using single-chain d-dimer antibody immobilized on functionalized polypyrrole. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 2, p. 736-742, 2010.

174 MARQUES, S. M.; SANTOS, A.; GONÇALVES, L. M.; SOUSA, J. C.; BUENO, P. R. Sensitive label-free electron chemical capacitive signal transduction for D-dimer electroanalysis. **Electrochimica Acta**, v. 182, p. 946-952, 2015.

175 LOVE, J. C.; ESTROFF, L. A.; KRIEBEL, J. K.; NUZZO, R. G.; WHITESIDES, G. M. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 4, p. 1103-1169, 2005.

176 WALKER, J. B.; NESHEIM, M. E. The molecular weights, mass distribution, chain composition, and structure of soluble fibrin degradation products released from a fibrin clot perfused with plasmin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 8, p. 5201-5212, 1999.

177 DOUMA, R. A.; LE GAL, G.; SÖHNE, M.; RIGHINI, M.; KAMPHUISEN, P. W.; PERRIER, A.; KRUIP, M. J. H. A.; BOUNAMEAUX, H.; BÜLLER, H. R.; ROY, P. M. Potential of an age adjusted D-dimer cut-off value to improve the exclusion of pulmonary embolism in older patients: a retrospective analysis of three large cohorts. **BMJ**, v. 340, n. 7753, 2010. doi:10.1136/bmj.c1475.

178 LEVČÍK, M.; KETTNER, J.; JABOR, A.; KAUTZNER, J. Utility of plasma D-dimer levels in the diagnosis of acute aortic dissection. **Cor et Vasa**, v. 55, n. 6, p. e510-e514, 2013.

179 GAMELLA, M.; CAMPUZANO, S.; CONZUELO, F.; REVIEJO, A. J.; PINGARRÓN, J. M. Amperometric magnetoimmunosensors for direct determination of D-dimer in human serum. **Electroanalysis**, v. 24, n. 12, p. 2235-2243, 2012.

180 MISLOVIČOVÁ, D.; GEMEINER, P.; KOZAROVA, A.; KOŽÁR, T. Lectinomics I. Relevance of exogenous plant lectins in biomedical diagnostics. **Biologia**, v. 64, n. 1, p. 1-19, 2009.

181 MARCHANT, J.; COWPER, B.; LIU, Y.; LAI, L.; PINZAN, C.; MARQ, J. B.; FRIEDRICH, N.; SAWMYNADEN, K.; LIEW, L.; CHAI, W.; CHILDS, R. A.; SAOUROS, S.; SIMPSON, P.; ROQUE BARREIRA, M. C.; FEIZI, T.; SOLDATI-FAVRE, D.; MATTHEWS, S. Galactose recognition by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 20, p. 16720-16733, 2012.

182 JANKOVIĆ, M. Glycans as biomarkers: status and perspectives. **Journal of Medical Biochemistry**, v. 30, n. 3, p. 213-223, 2011.

183 CARVALHO, F.; MARTINS, D.; SANTOS, A.; ROQUE-BARREIRA, M.-C.; BUENO, P. R. Evaluating the equilibrium association constant between ArtinM lectin and Myeloid Leukemia cells by impedimetric and piezoelectric label free approaches. **Biosensors**, v. 4, n. 4, p. 358-369, 2014.

184 DAY, Y. S. N.; BAIRD, C. L.; RICH, R. L.; MYSZKA, D. G. Direct comparison of binding equilibrium, thermodynamic, and rate constants determined by surface- and solution-based biophysical methods. **Protein Science**: a Publication of the Protein Society, v. 11, n. 5, p. 1017-1025, 2002.

185 BERTOK, T.; KLUKOVA, L.; SEDIVA, A.; KASÁK, P.; SEMAK, V.; MICUSIK, M.; OMASTOVA, M.; CHOVANOVÁ, L.; VLČEK, M.; IMRICH, R.; VIKARTOVSKA, A.; TKAC, J. Ultrasensitive impedimetric lectin biosensors with efficient antifouling properties applied in glycoprofiling of human serum samples. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 15, p. 7324-7332, 2013.

186 GIMÉNEZ-ROMERO, D.; BUENO, P. R.; PESQUERO, N. C.; MONZÓ, I. S.; PUCHADES, R.; MAQUIEIRA, Á. Elucidation of carbohydrate molecular interaction mechanism of recombinant and native ArtinM. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 28, p. 8360-8369, 2013.

187 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. New York: W. H. Freeman, 2012. 1340 p.

188 VARKI, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. **Glycobiology**, v. 3, n. 2, p. 97-130, 1993.

189 BRECHT, S.; CARRUTHERS, V. B.; FERGUSON, D. J. P.; GIDDINGS, O. K.; WANG, G.; JÄKLE, U.; HARPER, J. M.; SIBLEY, L. D.; SOLDATI, D. The toxoplasma micronemal protein MIC4 is an adhesin composed of six conserved apple domains. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 6, p. 4119-4127, 2001.

190 VARKI, A.; SHARON, N. Historical background and overview. In: VARKI, A.; CUMMINGS, R. D., ESKO, J. D.; FREEZE, H. H.; STANLEY, P.; BERTOZZI, C. R.; HART, G. W.; ETZLER, M. E. (Ed.). **Essentials of glycobiology**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor, 2009. Chap. 1, p. 1-22.

191 SÁNCHEZ-POMALES, G.; ZANGMEISTER, R. A. Recent advances in electrochemical glycobiosensing. **International Journal of Electrochemistry**, v. 2011, 2011. doi:10.4061/2011/825790.

192 LIANG, C.-H.; WU, C.-Y. Glycan array: a powerful tool for glycomics studies. **Expert Review of Proteomics**, v. 6, n. 6, p. 631-645, 2009.

193 DIAS, W. B.; HART, G. W. O-GlcNAc modification in diabetes and Alzheimer's disease. **Molecular BioSystems**, v. 3, n. 11, p. 766-772, 2007.

194 SILVA, M. L. S. Cancer serum biomarkers based on aberrant post-translational modifications of glycoproteins: clinical value and discovery strategies. **Biochimica et Biophysica Acta**: Reviews on Cancer, v. 1856, n. 2, p. 165-177, 2015.

195 WALSH, G.; JEFFERIS, R. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 1241-1252, 2006.

196 LAURENT, N.; VOGLMEIR, J.; FLITSCH, S. L. Glycoarrays-tools for determining protein-carbohydrate interactions and glycoenzyme specificity. **Chemical Communications**, n. 37, p. 4400-4412, 2008.

197 RAMBARUTH, N. D. S.; DWEK, M. V. Cell surface glycan–lectin interactions in tumor metastasis. **Acta Histochemica**, v. 113, n. 6, p. 591-600, 2011.

198 KHOO, K. H. From mass spectrometry-based glycosylation analysis to glycomics and glycoproteomics. In: YU, K. R.; SCHENGRUND, C.-L. (Ed.). Glycobiology of the nervous system. New York: Springer, 2014. Chap. 7, p. 129-164. (Advances in neurobiology, v. 9).

199 MEYER, B.; PETERS, T. NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. Angewandte Chemie International Edition, v. 42, n. 8, p. 864-890, 2003.

200 KARAMANSKA, R.; CLARKE, J.; BLIXT, O.; MacRAE, J. I.; ZHANG, J. Q.; CROCKER, P. R.; LAURENT, N.; WRIGHT, A.; FLITSCH, S. L.; RUSSELL, D. A.; FIELD, R. A. Surface plasmon resonance imaging for real-time, label-free analysis of protein interactions with carbohydrate microarrays. Glycoconjugate Journal, v. 25, n. 1, p. 69-74, 2008.

201 SMITH, E. A.; THOMAS, W. D.; KIESSLING, L. L.; CORN, R. M. Surface plasmon resonance imaging studies of protein-carbohydrate interactions. Journal of the American Chemical Society, v. 125, n. 20, p. 6140-6148, 2003.

202 SAFINA, G.; DURAN, I. B.; ALASEL, M.; DANIELSSON, B. Surface plasmon resonance for real-time study of lectin–carbohydrate interactions for the differentiation and identification of glycoproteins. Talanta, v. 84, n. 5, p. 1284-1290, 2011.

203 NICU, L.; LEICHLE, T. Transduction techniques for miniaturized biosensors. In:_____. Micro-and nanoelectrochemical biosensors. Hoboken: John Whiley & Sons, 2014. Chap. 1. doi:10.1002/9781118760857.ch1.

204 LEBED, K.; KULIK, A. J.; FORRÓ, L.; LEKKA, M. Lectin–carbohydrate affinity measured using a quartz crystal microbalance. Journal of Colloid and Interface Science, v. 299, n. 1, p. 41-48, 2006.

205 PALMA, A. S.; FEIZI, T.; CHILDS, R. A.; CHAI, W.; LIU, Y. The neoglycolipid (NGL)-based oligosaccharide microarray system poised to decipher the meta-glycome. Current Opinion in Chemical Biology, v. 18, p. 87-94, 2014.

Analytical & Bioanalytical Techniques

Santos et al., J Anal Bioanal Tech 2014, S7
http://dx.doi.org/10.4172/2155-9872.S7-016

Review Article Open Access

Fundamentals and Applications of Impedimetric and Redox Capacitive Biosensors

Adriano Santos[1], Jason J Davis[2]* and Paulo R Bueno[1]*

[1]Department of Physical Chemistry, Chemistry Institute, São Paulo State University (Unesp), São Paulo, Brazil
[2]Department of Chemistry, University of Oxford, Oxford, United Kingdom

Abstract

Electroanalyses have brought a huge amount to our understanding of interfaces generally. When applied to surfaces which have been specifically engineered so as to recruit targets from an analytical solution, potent sensors can be derived. These may be based on a multitude of different analytical methods all typified by specific requirements and surface configurations. This short review examines the application of amperometric and impedimetric methods to the detection of biomarkers of clinical relevance. Basic principles are introduced with examples at both planar and "nanofunctionalised" interfaces comprising immobilized antibodies/antigens and oligonucleotide receptors. A particular focus is made of new developments in impedance and impedance derived capacitance spectroscopy.

Keywords: Biosensor; Electrochemical impedance spectroscopy; Capacitance spectroscopy; Biomarker; Redox capacitive biosensor

Introduction

Biomarkers can be considered to be chemical or biological molecules present in tissues, blood, or other fluids at quantifiable levels that are relatable to physiological status. In their most practical form they may be used as indicators of trauma, infection, and disease onset or disease progression [1-3]. For this reason alone their reliable assay is of truly enormous healthcare benefit. There is currently a huge amount of interest in the possibility of protein or nucleic acid markers reliably reporting on disease onset many years before patients become symptomatic. An ability to aggressively intervene in disease progression early would be utterly game-changing in the combat of, for example, neurodegeneration and cancer. Although a diverse range of markers have been studied, including glycoproteins (specially for cancer detection [4]) and monocytes [5,6] (associated to bacterial infection), this review will be focused to a consideration of nucleic acid and protein markers specifically.

A wide range of strategies exist that enable the quantified assay of proteins or nucleic acids. These are, broadly speaking (though also see QCM and radioimmunoassays), [7-11] divisible into methods which are optical (Colorimetric, Surface Plasmon Resonance, Optical Microarray, ELISA, Interferometry, etc.) and those which are electrical (amperometric, impedimetric, capacitative, transistor based). If one ignores the very few biomarkers that natively possess well-defined and resolvable optical fingerprints, the majority of optical approaches require either target labeling, the utilization of an appropriate "sandwich" format or rely on specific induced change in excitable surface plasmons [12-15].

A quartz crystal microbalance (QCM) presents a piezoelectric technique able to detect nanogram levels of adsorbate [16,17] and have been applied to the detection of protein [18,19], nucleic acids [20] and biomolecular association constants [21-23]. Although natively label free, methodologies have been reported in which sensitivity has been boosted through nanoparticle modification of a secondary antibody binding agent [7,18]. Surface plasmon resonance methods operate through the sensitive detection of target induced change in refractive index at an appropriately modified sensor surface and, broadly speaking, spans the same general capabilities as presented by QCM [12,13,18,24].

Electrical methods commonly possess a high innate sensitivity and are readily scaleable at low cost. A large number of amperometric approaches to biomarker detection have been detailed in recent years – these include the utilization of "sandwich" assays in which transducing signal is provided by appropriately labeled secondary antibodies or the use of redox tagged capture nucleic acid aptamers [25,26]. The former approach requires two antibodies per target (and, hence, two well-behaved antibody-target binding events per target), two reproducibly exposed non overlapping target epitopes and the use of secondary antibodies that are redox tagged (e.g. nanoparticles [27-31], quantum dots [32]), labeled with enzymes [26,33] or anchored, in multiples to particle surfaces, that generate a redox quantifiable output (Figure 1a). Despite these demands, this approach has been successfully demonstrated in a large number of case studies. For example, Dai and colleagues [33] have reported an electrochemical immunosensor to detect alpha fetoprotein (AFP), an important marker of testicular cancer [34]. The researchers used a prussian blue modified hydroxyapatite or HRP labelled secondary antibodies as signal generators with low limit of detection (LOD) (9 pg/mL). Yao and coworkers have used nanoparticle tethered secondary antibody HRP labels within an amperometric assay quantifying immunoglobulin G [35]. In this configuration, the researchers immobilized anti-IgG above a carbon glassy electrode functionalized with gold nanoparticles (GNPs) and HRP labeled secondary antibodies confined to Au/SiO_2 nanoparticles. In this manner, multiple copies of peroxide generating HRP are brought to

***Corresponding authors:** Paulo R Bueno, Nanobionics research group, Department of Physical Chemistry, Chemistry Institute, São Paulo State University (Unesp), 55 Prof. Francisco Degni Street, ZIP Code 14800-060, Araraquara, São Paulo, Brazil, Tel: +55 16 3301 9642; Fax: +55 16 3322 2308; E-mail: prbueno@iq.unesp.br

Jason J Davis, Department of Chemistry, University of Oxford, South Parks Road, Oxford, OX1 3QX, UK, E-mail: jason.davis@chem.ox.ac.uk

Received May 12, 2014; **Accepted** May 29, 2014; **Published** June 02, 2014

Citation: Santos A, Davis JJ, Bueno PR (2014) Fundamentals and Applications of Impedimetric and Redox Capacitive Biosensors. J Anal Bioanal Tech S7: 016. doi:10.4172/2155-9872.S7-016

Copyright: © 2014 Santos A, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Citation: Santos A, Davis JJ, Bueno PR (2014) Fundamentals and Applications of Impedimetric and Redox Capacitive Biosensors. J Anal Bioanal Tech S7: 016. doi:10.4172/2155-9872.S7-016

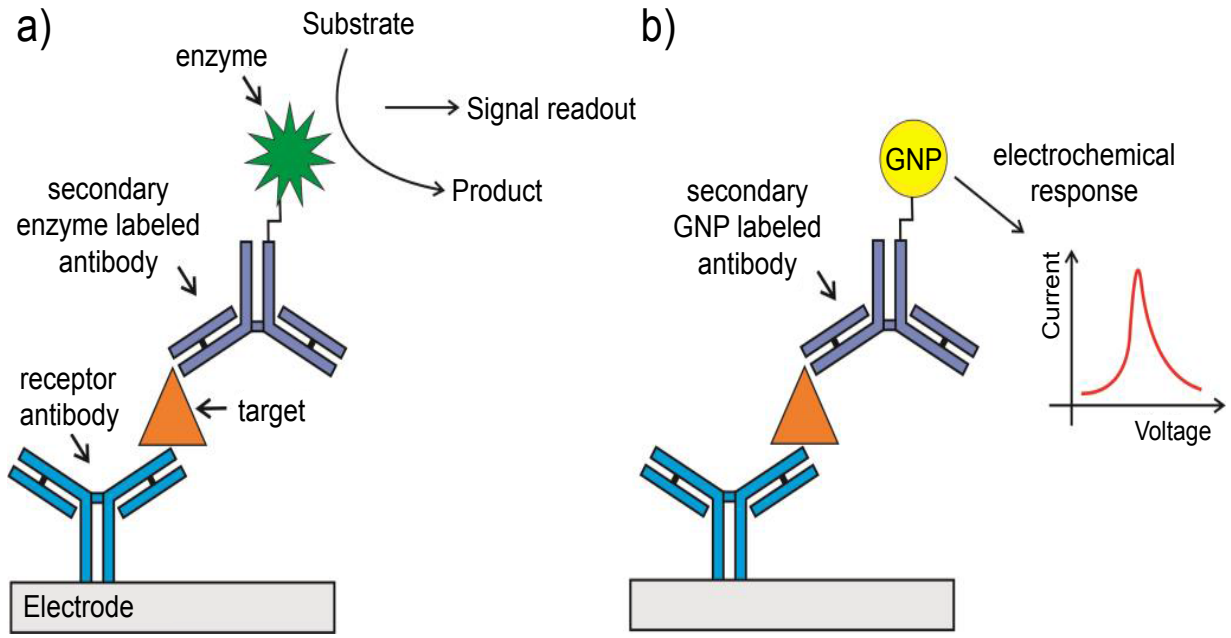


Figure 1: Schematic representation of an electrochemical immunoassay using enzyme (a) or GNP (b) labeled secondary antibodies in an amperometric sandwich methodology. Target presence is quantified by the electrochemical activity brought to the electrode surface by the label. In the most common enzymic case signal is through the reduction of generated H_2O_2 or through mediated electrochemistry of the enzyme itself [33] (mediator not shown). The signal readout in GNP labeled antibody assay is the reduction of a prior oxidised GNP (Oxidation: $Au^0 + 4Cl^- \rightarrow AuCl_4^- + 3e^-$. Reduction: $AuCl_4^- + 3e^- \rightarrow Au^0 + 4Cl^-$ [38,39].

the interface per capture event (and signal amplification increased so that sub ng/ml levels target are quantifiable) [35].

In addition to their use in increasing supporting electrode surface area, [27,30,36,37] GNPs have also been employed in tagging antibodies and aptamers in sandwich assays [30,36] where they are directly responsible for electrochemical signal generation (Figure 1b). Using this methodology, Ho et al. [38] for example, reported an immunosensor to detect a lung cancer biomarker, α-Enolase (ENO1), with a LOD of 2.38 pg/mL. In this case, the receptor antibody was physically adsorbed on a polyethylene glycol modified electrode. After the immunoreaction, antibody tagged GNP adducts facilitated target quantification across a range of 0.001-10 ng/mL [38]. An immunosensor to detect human IgG in a linear range of 10-500 ng/mL was designed by Chen et al. [39] The receptor antibody was adsorbed to a carbon paste electrode and, after antibody – target interaction, colloidal gold particle labeled antibody was used to detect indirectly the target with a limit of detection of 4 ng/mL [39].

The use of redox labeled capture aptamers, in which an electrochemical signal is modulated by a large conformational change associated to a target capture, has been demonstrated in the quantification of both nucleic acids and proteins under specific controllable conditions [25,40,41]. For example, Xiao et al. have reported a sensor to quantify thrombin in blood serum in a linear nanomolar range [42] using methylene blue labeled aptamers on gold electrodes (Figure 2a). In what is now a common format, the methylene blue redox communication with the underlying electrode changes dramatically as thrombin target binds [42]. In most cases, however, communication decreases as the aptamer-target association "rigidifies" the former (turning off the flexibility required in order to bring the redox unit to the electrode surface). This "signal turn off" approach can potentially suffer from "false negatives" (i.e. where signal is lost through processes other than specific target recognition events). To overcome this problem, other approaches have been developed [25,43]. In one of them, ferrocene labeled thiolated aptamers were immobilized on gold surface in a manner such that the ferrocene probe was unable to access the solid surface below [44,45]. The conformational changes associated with target binding this time brings the redox reporter into closer approach to the electrode, yielding a positive amperometric readout signal (Figure 2b). In a related methodology, DNA-duplex probes comprising an anti-thrombin aptamer and a complementary methylene blue labeled nucleic acid component have been used (Figure 2c). In the presence of thrombin, the complementary sequence is liberated while the aptamer sequence binds the target. This event brought the methylene blue tag to the proximity of the electrode surface, generates a "turn on" signal and enables target quantification down to low nanomolar levels [46].

Although methods in which target analyte or secondary antibody are labeled are diverse, and can undoubtedly be potent, there are significant issues associated with the process of labeling, attaining reproducible changes at the surface and in the inherently multistep nature of analyses. Label free approaches benefit considerably from being (potentially) single step, fast and cheap. Unfortunately, the reliance of transduction on a single ("blind") binding process brings with it commonly profound problems associated with nonspecific response. There is, nonetheless, a significant and growing body of work showing that high levels of selectivity can be achieved through controlled interfacial chemistry.

Field effects biosensors can be built on the back of highly evolved microelectronic fabrication principles and operate through an electrostatic modulation of charge carrier mobility in suitably prepared semiconductors. Most normally, this modulation is achieved through

Citation: Santos A, Davis JJ, Bueno PR (2014) Fundamentals and Applications of Impedimetric and Redox Capacitive Biosensors. J Anal Bioanal Tech S7: 016. doi:10.4172/2155-9872.S7-016

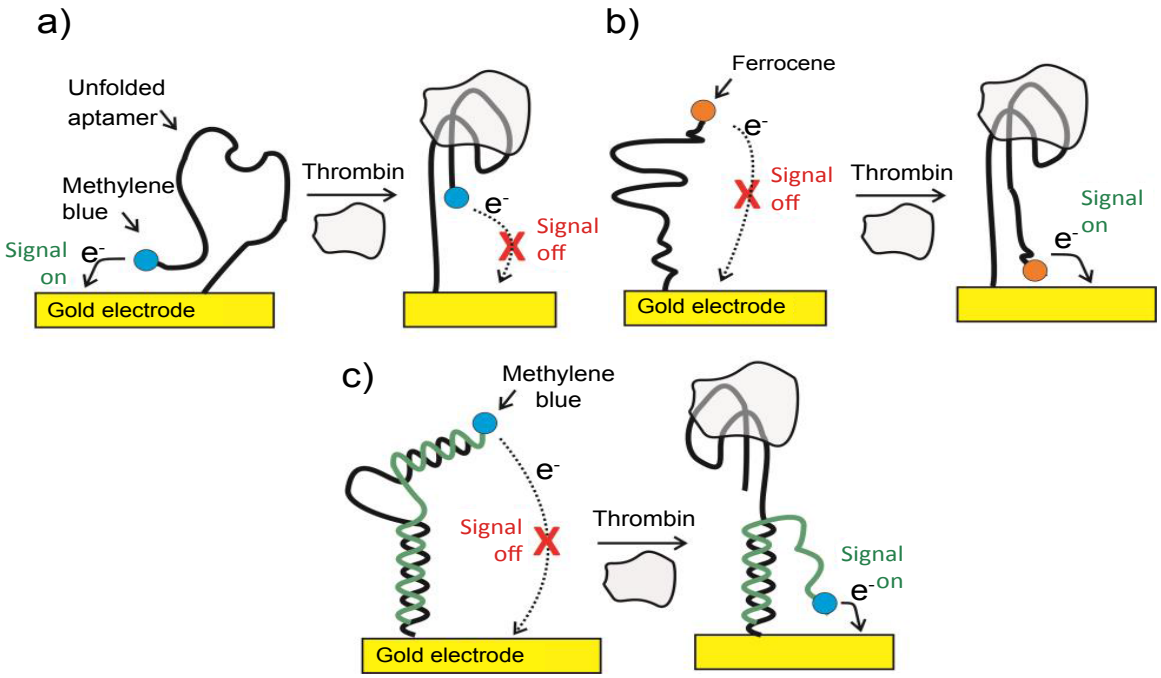


Figure 2: Three methodologies applied in the detection of thrombin using redox labeled aptamers. (a) An unfolded methylene blue labeled aptamer initially enables electron transfer between the probe and the electrode (signal on), a capability removed on target binding (signal off). (b) In an alternative approach, a long aptamer is utilized in which the redox reporter is initially too remote from the underlying electrode (signal off). After targeting binding, the ferrocene label approaches the electrode, increasing the electrochemical signal (signal on). (c) A DNA-duplex probe comprising an anti-thrombin aptamer and a complementary methylene blue labeled nucleic acid. In the presence of thrombin, the complementary sequence is liberated while the aptamer sequence forms a thrombin-binding complex. This event enables the methylene blue tag to access the electrode (signal on).

the use of an integrated "gate electrode". In recent years the use of "electrolyte gating" has been explored where conductance modulation occurs through the electrostatic environment of the semiconductor surface exposed to solution. In some cases this can be at an "extended gate" electrode in order to maximize conductance response to target binding [47]. A derivative of this approach, in which a "nanogap" is mechanically engineered into the space between a gating electrode and the semiconducting channel, has also been applied to protein detection [48].

Surface impedance analyses (electrochemical impedance spectroscopy, EIS) can be low cost, low power, and highly sensitive with minimal hardware demand. Like all electrical approaches scaleability, miniaturization and multiplexing are strong positive points. Closely related capacitive biosensors possess similar features. In *The Recognition Surface* Section of this review we focus on the demands and strategies associated with developing impedimetric or capacitive interfaces that respond selectively to specific biomarkers. In *EIS Based Biosensing* Section, we introduce the fundamentals of EIS and discuss relevant applications. Yet in this section, we show how the same experimental configuration can be used to interrogate the capacitive fingerprints of electrode-confined capture interfaces. We progress from this to a summary of both "classical" capacitive biosensing and new developments of electrochemical capacitance spectroscopy (ECS). Finally, in *ECS Biosensing* Section, we discuss the perspectives and potential applications of the redox capacitive biosensors.

The Recognition Surface

A biosensing configuration is essentially comprised of two components: an immobilized recognition element responsible for selective target recruitment, and a transducer capable of converting the biorecognition event to, ultimately, an electronic or optical signal (Figure 3). For many years now, electrode coupled enzymes have been used to assay a range of low molecular weight specific biomarkers [49,50]. Affinity-based biosensors integrate antibodies, antibody-fragments or aptamers into the transducer surface. Lectins, carbohydrate binding proteins, can also be used as recognition elements supporting the detection of carbohydrates or glycoproteins [51,52].

A consideration of the recognition surface is the first critically important step in biosensor design. Assay efficacy depends sensitively on the receptor-surface integration, issues of receptor availability, orientation, surface density and target binding efficacy. Ideally, the so-prepared interface should also be highly specific in its response. The initial process of bioimmobilization has been explored via a diverse range of strategies [53-61]. For antibodies, a maximum retention of native target binding efficacy is desired as they are integrated into a surface architecture at a density that is also optimized for capture efficiency [62,63]. A broad range of physical adsorption and entrapment methods have been utilized [59,64,65]. Although these can be facile and generate high surface densities on cationic, anionic or hydrophobic interfaces, the resulting biological surface is often typified by instability and low binding efficacy [61,64]. Non-covalent immobilization of untreated antibodies can also be mediated by an intermediate protein directly coupled to an underlying surface (such as presented by protein A and protein G, resulting predominantly in tail-on orientation i.e. anchoring specifically via the Fc region) [53,58]. The high non-covalent affinity between avidin/streptavidin and biotin ($K_d \sim 10^{-15}$ M) has also been very popular [53,66]. In this case, a biotin labeled antibody is immobilized, usually in a tail on-orientation, on a surface previously modified

Citation: Santos A, Davis JJ, Bueno PR (2014) Fundamentals and Applications of Impedimetric and Redox Capacitive Biosensors. J Anal Bioanal Tech S7: 016. doi:10.4172/2155-9872.S7-016

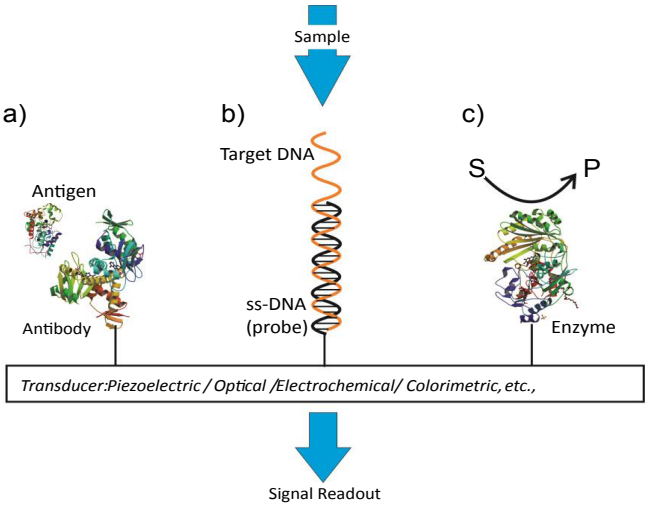


Figure 3: Biosensors are devices that have a recognition element (biological or synthetic) intimately associated with a transducer (piezoelectric, optical, electrochemical, colorimetric, etc.). The recognition element may be an antibody (reporting on an antigen immunoassay, a), ssDNA (DNA detection), b), or an enzyme (detecting/quantifying substrate, S, c).

with avidin/streptavidin protein [53,67] (Figure 4a). Lee et al. [68] for example, reported a survey of experimental conditions needed to achieve the most effective immobilization of biotin labelled IgG mouse antibodies (anti-troponin and anti-NT-proBNP) on avidin modified surfaces in optimizing a fluorescent sandwich assay. Significantly, it was noted that higher antibody densities were associated with a steric hindrance that decreases capture probability and reduces assay sensitivity [56].

Controllable and stable surface immobilization is most often achieved through the use of an intervening, highly chemically tailorable, self-assembled monolayer (SAM) [59,60,69,70]. Where the transducing electrode is metallic, these are very commonly organosulphur based with a range of terminal functionalities [69]. These SAM films may be single component or mixed. In this case, the mixed SAM is obtained from a solution comprising two different thiols with different end-groups and chain lengths. One of the groups is used to covalently tether the receptor while another, usually of reduced chain length, is used to minimize lateral steric hindrance to target recruitment [22,59,71]. In seeking to maximize both biocompatibility and low background (nonspecific surface association – a critical issue in label free assays), highly hydrated PEGylated or polymeric interfaces have been shown to be highly effective [72,73]. Depending on the thiol end group, it is possible to use a variety of protocols to facilitate covalent antibody attachment. For carboxylic terminal SAMs, standard carbodiimide reactions [59,60] using N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (EDC)/N-hydroxysuccinimide (NHS) protocols are ubiquitous in tethering proteins through their solution exposed lysine residues [74-76]. For example, an impedimetric biosensor with picomolar detection of insulin was designed by Xu et al. [72] using polyethylene glycol (PEG) containing thiol $HS–(CH_2)_{11}–(EG)_3–OCH_2–COOH$ to both immobilize antibodies and drammatically reduce nonspecific surface interactions (non target protein-surface interactions). Amino modified surfaces can also be utilized in bioimmobilisation using a glutaraldehyde crosslinker [53,77,78].

Carbon-based electrodes, especially in those of nanoscale such as presented by carbon nanotubes (CNT) [80] and graphene sheets (GS), have received great attention in biosensing due partially to their high transducing surface area and associated enhanced electrochemical analytical signal [81]. Serafín et al. [82] have, for example, reported an amperometric immunosensor for the detection of insulin-like growth factor 1 (IGF1) using a multiwalled carbon nanotubes (MWCNT) and electropolymerized poly(pyrrole propionic acid) modified glassy carbon electrodes (GC). Monoclonal anti-IGF1 receptors were immobilized via EDC/NHSS (NHSS: N-hydroxysuccinimide sulfate) chemistry, and peroxidase labeled polyclonal antibodies applied in detecting the target with a linear range of 0.5 to 1000 pg/mL and LOD of 0.25 pg/mL [82]. Graphene interfaces have also been utilized; a voltammetric immunosensor was designed and reported by Eissa et al. [83] for example, to detect allergen ovalbumin with LOD of 0.83 pg/mL. In this case, the authors immobilized antibodies on aryl diazonium functionalized graphene.

Due to the high surface area and electronic conductivity, associated to the well-organized and featuring packed vertical oriented film, single-walled carbon nanotubes (SWCNT forests) have been explored in design sensitive assays (picogram levels LODs) [84,85], since SWCNT forests can facilitate electron transfer between the underlying electrode surface and immobilized biomolecules [86,87]. Often, carboxylated SWCNTs are assembled on iron hydroxide coated substrate, creating a high ordered vertical SWCNT forest [85-87]. The receptor antibody is then attached covalently to the end of the nanotube and, after immunoreaction between the receptor and target (antigen), an enzyme labeled secondary antibody is added to complex the antigen. The electrochemical signal of the label allows the quantification of the target. Using this approach, Rusling and coworkers [87] developed an amperometric sensor to detect HSA (human serum albumin). The authors immobilized anti-HSA on a SWNT forest via an EDC/NHS protocol. After exposing the sensor to HSA, HRP labeled secondary antibody was used to detect the target in a linear range of 0.075 to

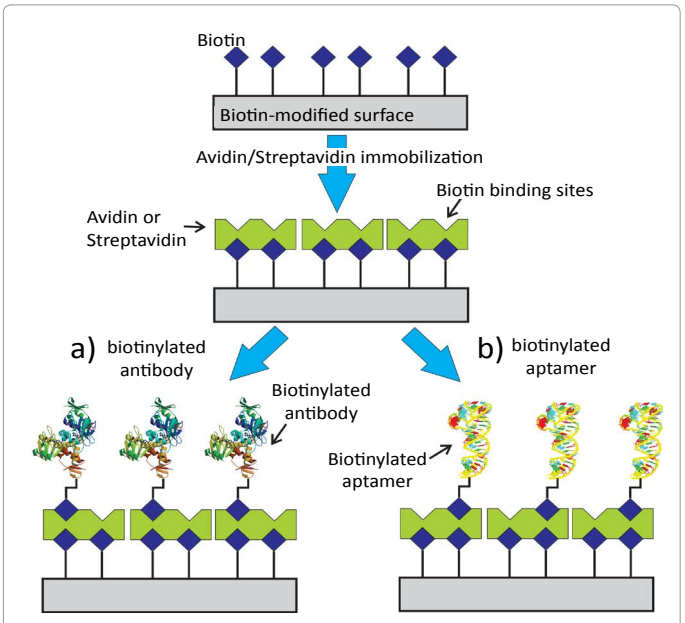


Figure 4: Depictions of receptor attachment via biotin-avidin/streptavidin methodologies. Initially, biotin is physically or covalently immobilized above an appropriate solid support [79] and then further modified with multivalent avidin or streptavidin. A biotin labeled antibody (a) or a biotin labeled aptamer (b) is then attached. The high affinity constant between biotin and avidin or streptavidin facilitates stable film formation.

Citation: Santos A, Davis JJ, Bueno PR (2014) Fundamentals and Applications of Impedimetric and Redox Capacitive Biosensors. J Anal Bioanal Tech S7: 016. doi:10.4172/2155-9872.S7-016

7.5 nM with a LOD of 75 nM (without a mediator) and a better LOD (~1pM) using mediating hydroquinone [87]. Malhotra et al. [88] designed an electrochemical immunosensor to detect interleukin-6 (IL-6), which is a cancer biomarker, immobilizing anti-IL-6 on a SWCNT. Using secondary antibodies attached to HRP decorated carboxylated multiwall carbon nanotubes, the assay was able to detect picogram levels of IL-6 (0.5 pg/mL).

The extensive use of antibodies in biosensor configurations has been accompanied by a concern about cost, stability and reproducibility in surface performance, a concern that amplifies as progress is made towards viable "real world devices" [79]. The development of nucleic acid or peptide nucleic acid receptors has grown exponentially during the past decade in partial combat of this. These aptamers can, additionally, be prepared by low cost, facile *in vitro* preparation (SELEX methods [89]), easily modified with functionalized groups and labels, and have binding affinities that can be comparable to that typically associated with antibodies [25,43]. In many cases aptamers can be integrated with electrode surfaces (native or nanoparticle modified) using terminal thiol functionalities [79]. Alternatively, surface immobilization can be achieved through terminal amine anchoring to pre-carboxylate modified solid surfaces, or through biotin-streptavidin protocols [79]. For example, Yao et al. develop a piezoelectric biosensor to detect IgE, immobilizing a biotin-labeled aptamer above avidin film previously prepared on gold [90]. The authors used 3,3'-dithiodipropionic acid di(*N*-succinimidylester) (DSP) to obtain a SAM on gold and covalently coupled avidin to this through reaction with the activated ester.

A very important issue related to surface design in the development of reliable label free point-of-care devices is the problem of biofouling [91]. Label free techniques for clinical applications suffer, often terminally, when attempts are made to detect low marker concentrations in real samples (blood, blood serum, saliva, plasma, urine, cerebrospinal fluid, etc.). Such samples generate high background signal (noise) specifically because of their high protein content. For example, HSA is present in blood at 10^7 ng/mL levels [92]. When compared to the clinically relevant levels of cardiac biomarkers, such as myoglobin, cTnI (Troponin I) and CRP (C-reactive protein), for example, all at 10^{-2} to 10^3 ng/mL, the demands are clear [93]. One methods of addressing this 10^4-10^9 concentration differential is the use of "blocking" proteins (serum albumin) [91] or the use of polymers coatings, such as polyethylene glycol (PEG) [73,91]. It is known that the latter films form highly hydrated surfaces [94] that have very low levels of protein interaction. The idea is that the introduction of specific capture antibodies (or aptamers) into such surfaces should, ideally, generate an interface that recruits *only* that antibody-specific target. Bryan and colleagues [76] have, for example, developed a faradaic impedimetric biosensor to detect CRP (with a LOD of ~300 pM) in blood serum using receptive antibodies immobilised on a PEG containing thiol film. In a similar approach, Xu et al. [72] reported a faradaic impedimetric immunosensor to detect insulin in a 50% blood serum/buffer (phosphate buffered saline with Tween-20, pH 7.4) with an LOD of 4.77 pM.

Very effective non-fouling surfaces can be achieved using zwitterionic polymers [95-97], such as sulfobetaine methacrylate (SBMA) or poly-(carboxybetaine methacrylate) (PCBMA), and zwitterionic alkanethiolates [98]. These films produce charged but net neutral surfaces that are associated with high levels of hydration [94,96]. Using PCBMA, Yang et al. [99] developed a sensor to detect glucose in both diluted (10% and 50% in PBS) and neat human blood serum. The methodology comprises a hydrogel coating on a conventional amperometric glucose sensor, yielding an approach to detect glucose in a linear range of 4-20 mM. Luo et al. [100] applied chemisorbed zwitterionic polymer supports (PCBMA) in underpinning the detection of insulin in neat blood serum. In this case, CBMA monomer was pre-immobilized at the electrode surface and a mixture of CMBA, ethylene glycol dimethracrylate and 2-hydroxy-2-methylpropiophenone irradiated (λ=254 nm) to initiate the polymerization across the surface. The antibody was then covalently tethered. Using this approach, the non-faradaic immunosensor was able to detect insulin in a linear range of 0.1-200 pM with a staggering LOD of 42.6 fM [100]. A SPR biosensor using a zwitterionic coating on SiO_2/Au surfaces to detect activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM – a cancer marker) was developed by Yu and coworkers [101]. The authors immobilized the antibody covalently above the zwitterionic polymer without "blocking" agents, yielding a sensor able to detect the biomarker in nanogram levels (64 ng/mL) in undiluted human serum [101]. Miyahara and coworkers developed a one-step synthesis of a zwitterionic alkanethiolate using 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) as a building block [98]. The authors functionalized one mercapto group in 1,6-hexanedithiol with MPC via Michael-type addition, allowing the remaining mercapto group to chemisorb to a gold surface. This methodology yielded a non-fouling protein and cell resistant SAM [98].

Once a suitably selective interface has been prepared, there exist a variety of methods by which target recruitment can be quantified (as noted above). Of the electroanalytical methods available, those based on EIS are the most sensitive of those applicable in a label free format. These may or may not utilize an initial pre-doping of the analytical solution with redox probe and accordingly are faradaic or otherwise. Though the vast majority of published works utilize changes in charge transfer resistance, capacitive approaches (faradaic or not – see below) can also be powerful [72,74,102-104] (Table 1). In the next sections, we will discuss the principles and applications of these approaches [105-118].

EIS Based Biosensing

Fundamentals of EIS

EIS is a powerful interfacial analytical tool and has been applied extensively to corrosion studies [119-121], the characterization of charge transport across membranes [122] and battery development [123-125]. Its utility in detection interfacial binding events has been known for some two decades [126-129].

The impedance of an interface is generally determined by applying a sinusoidal voltage perturbation whilst tracking the current response [130]. To obtain a linear voltage-current response, which is essential to impedimetric measurements, only small (~10 mV peak to peak) [126] perturbations are typically applied. The linearity of the voltage-current response in the range of frequencies studied can be evaluated by fitting the experimental data using a special equivalent circuit comprising a series of resistance and capacitance in parallel (described by Kronig-Kramers relations [131]). It is, additionally, worth noting that small amplitudes are non perturbatory in terms of underpinning receptive film chemistry and biochemistry.

A typical experimental set up configuration in impedance measurements consists of three electrodes. The current response is measured at the working electrode, at which the receptive film is constrained [129]. A reference electrode, such as Ag/AgCl (KCl saturated or 3 M) or calomel is used to maintain a fixed and reproducible

Citation: Santos A, Davis JJ, Bueno PR (2014) Fundamentals and Applications of Impedimetric and Redox Capacitive Biosensors. J Anal Bioanal Tech S7: 016. doi:10.4172/2155-9872.S7-016

Target	Associated disease or state	Impedance approach	Linear range	Limit of Detection	Ref.
Alpha-synuclein autoantibody	Parkinson's disease	Faradaic	75 - 1500 ng/mL	8.2 ng/mL	[105]
Antibodies against hemmaglutinin (HA)	Influenza A (virus H5N1)	Faradaic	0.004 - 0.020 ng/mL	0.002 ng/mL	[106]
C-reactive Protein (CRP)	Cardiac events and inflammation	Non-faradaic	0.025 - 25 ng/ml	0.032 ng/mL	[107]
		Faradaic	59-1180 ng/mL	31 ng/mL	[74]
		Redox-capacitive	5.9-11800 ng/mL	3.3 ng/mL	[108]
D-dimer	Thrombosis	Faradaic	0.0001 - 2000 ng/mL	0.0001 ng/mL	[109]
Human epidermal growth factor receptor-3 (HER-3)	Tumor breast and non-small-cell lung carcinoma	Faradaic	0.0002 - 0.0014 ng/mL	N/A	[110]
Human hepatocellular carcinoma cells (Bel-7404)	Liver cancer cell	Faradaic	1000-1000000 cells/mL	234 cells/mL	[111]
Immunoglobulin A	Immune system disorders	Faradaic	0.01 - 100 ng/mL	0.01 ng/mL	[112]
Insulin	Diabetes	Non-faradaic	0.0006 - 1.20 ng/mL	0.0003 ng/mL	[100]
		Faradaic	0.029-290 ng/mL	0.007 ng/mL	[72]
Interleukin-6 (IL-6)	Cancer and inflammation	Faradaic	0.00000001 - 0.0001 ng/mL	0.00000001 ng/mL	[113]
		Non-faradaic	0.025 - 25 ng/ml	0.32 ng/mL	[107]
Human breast adenocarcinoma cell line (MCF-7)	Breast cancer	Faradaic	100 – 10000 cells/mL	N/A	[114]
Murine double minute 2 (MDM2)	Brain tumor	Faradaic	0.001 – 1000 ng/mL	0.00029 ng/mL	[115]
Myoglobin	Acute myocardial infarction	Faradaic	10 - 650 ng/mL	5.2 ng/mL	[116]
Prostate specific antigen (PSA)	Prostate cancer	Faradaic	0.001 - 0.1 ng/mL	0.001 ng/mL	[117]
Prostatic acid phosphatase (PAP)	Prostate cancer	Redox-capacitive	5-1000 ng/mL	1 ng/mL	[108]
Streptococcus piogenes cells	Bacterial infection	Faradaic	10 – 10000 cells/µL	N/A	[118]
Tumor necrosis factor-alpha (TNFα)	Cardiac events and inflammation	Non-faradaic	0.025- 25 ng/ml	0.32 ng/mL	[107]

Table 1: Examples of impedance and redox capacitive biosensors.

absolute electrical potential [132]. A counter electrode (a platinum plate with area typically ten times larger than the working electrode [129,133]) allows electron flux between it and working electrode [126]. The instrumentation is essentially composed of a potentiostat/galvanostat and a frequency response analyzer (FRA). The FRA sends a sine wave of a particular AC amplitude voltage to the potentiostat and, simultaneously, imposes a command voltage and measures the current response [126,127].

Mathematically, the complex impedance (Z^*) is the ratio between the voltage time-function ($V(t)=V_0 \sin(\omega t)$) and the resulting current-time response function ($I(t)=I_0 \sin(\omega t+\varphi)$) (Eq. 1):

$$Z^*(\omega)=\frac{V(t)}{I(t)}=\frac{V_0\sin(\omega t)}{I_0\sin(\omega t+\varphi)}=\frac{1}{Y^*} \quad (1)$$

Where V_0 and I_0 are the maximum voltage and current signals, ω is the angular frequency ($\omega = 2\pi f$), f is the frequency, t the time, φ is the shift phase and Y^* is the complex admittance (related to the conductance). The impedance is generally determined at different frequencies, obtaining an impedance spectrum ($Z^*(\omega)$). The Z^* function is described as a complex number, $Z^*(\omega) = Z'+jZ''$, where $j=\sqrt{-1}$, Z' and Z'' are the real and imaginary parts, respectively. The Z^* value can be represented by the modulus $|Z|$, the phase shift φ, Z' and Z'' (Figure 5). To interpret the impedance results, the data can be analyzed in two different ways: a Blode plot, which plots log $|Z|$ and φ as a function of log f, or a Nyquist plot that plots $-Z''$ versus Z' (by convention in electrochemistry they just referred as Z'' versus Z' plot and the minus signal in $-Z''$ is implicit).

The impedance characteristics of a modified electrode interface can be innate or probed through the addition to solution of a diffusing redox probe. For example, electrochemical reactions on metallic surfaces can be monitored by an alternating current that is forced to pass through the interface metal/solution. A redox probe, such as an iron or cobalt complexe [91,127], are oxidized or reduced on the surface depending on the applied potential. A change in the interfacial

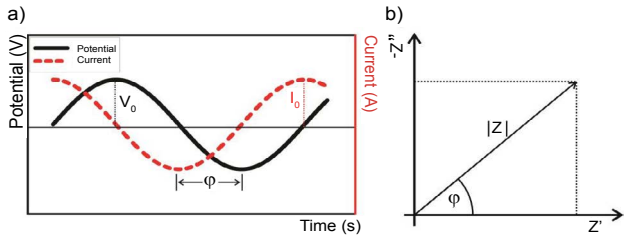


Figure 5: (a) Time domain measurements of an impedance analysis at a single frequency. A sinusoidal voltage perturbation (amplitude V_0) and the sinusoidal current response with amplitude I_0 has a phase angle φ. (b) The impedance value associated to the data from (a) can be described as the modulus $|Z|$, φ and the real Z' and imaginary Z'' parts, respectively $|Z|=\sqrt{(Z')^2+(Z'')^2}$.

properties, such as that caused by adsorption of a specific target analyte, will disturb the electrochemical reaction and a more resistive behavior (higher impedance) can be expected. Alternatively, innate capacitive/dielectric features of the interfaces can be used analytically [128]. The association of a biomolecule with a bare of modified solid electrode surface will lead to a displacement of water and hydrated ions from the immediate region, changes detectable through associated change in capacitance and, consequently, the impedance [128]. The former approach, which is by far the more common, is known as "faradaic" and includes an amplification of any changes at the interface as sensed (sterically or electrostatically) by the solution probe [91,126,129]. The latter "capacitive" approach does not require the pre-doping of analytical solution with a large excess (usually several mM) of redox probe is the "non-faradaic" approach [91,126,128]. Though somewhat less predictable in terms of change expected on target recruitment from solution, this approach can also be exceedingly sensitive [128,134]. As described in Table 1 both approaches have been successfully applied to the sensitive detection of clinically relevant targets.

Citation: Santos A, Davis JJ, Bueno PR (2014) Fundamentals and Applications of Impedimetric and Redox Capacitive Biosensors. J Anal Bioanal Tech S7: 016. doi:10.4172/2155-9872.S7-016

Faradaic impedance

In all forms of impedance, as noted above, the data acquirement is that of current as a function of time as the voltage waveform is applied. The relationship between applied oscillating voltage and observed oscillating current is analyzed by considering the experimental configuration (that is, the surface and its associated solution) to be composed of circuitry elements (an "equivalent circuit" of resistors and capacitors, typically called the Randles circuit – (Figure 6b)). Four elements are used to understand the relationship between current and voltage: the current impediment in an AC potential. These are solution resistance (R_S), double layer capacitance (C_{dl}), electron transfer resistance (R_{ct}) and Warburg impedance (Z_w) [126,127,129,135,136]. The solution resistance is related to the conductivity/mobility of the redox probe in solution and is not affected by biorecognition events at the electrode surface [91]. The double layer capacitance is an intrinsic feature of polarized electrodes immersed in electrolyte solution. Depending on the potential applied to the electrode, ions of opposite charge will approach the surface, forming a separated double layer [126]. The capacitive element is usually replaced by a constant phase element (CPE) to reflect the non-ideality of the surface capacitance [126]. The electron transfer resistance quantifies the electrostatic and/or steric barrier presented to the redox probe at the surface (Figure 6). The Warburg impedance, which is not used for analytical proposes, represents the unperturbed diffusion of the redox probe in bulk solution towards the electrode, down a diffusion gradient [127].

The capacitive element (double layer capacitance) in the Randles circuit is well described by the Gouy–Chapman–Stern (GCS) theory [132]. In this approach, the electrode immersed in a solution containing ions (modeled as spherical charges embedded in a solvent dielectric continuum) raises a capacitance that is a series combination of two capacitances: the Helmholtz capacitance (C_H) and diffuse-layer capacitance (C_D) (Eq. 2):

$$\frac{1}{C_{dl}} = \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_D} \quad (2)$$

This "native" double layer capacitance is affected by an introduction of a monolayer film (dielectric layer) between the electrode and the solution, generating a new term, the monolayer capacitance C_m [137] (Eq. 3):

$$\frac{1}{C_m} = \frac{1}{C_b} + \frac{1}{C_{dl}} \quad (3)$$

where C_b is the capacitance of the film without ionic ingress in the monolayer and is primarily composed of field induced dipoles. Additional ingress of ions into the film creates new charging elements and two terms, R_t and C_t, used to quantify the SAM dipolar relaxation characteristics [137]. Since $C_m > C_b$ (C_b dominates the capacitive interfacial response) [137], the capacitive response in the Randles circuit can be replaced to a series resistive (R_t) and capacitive (C_t) terms in parallel to C_m (Figure 7).

As noted, the R_{ct} parameter is predominantly used in faradaic impedance sensors to signal transduction. Elshafey et al. [115] for example, have reported an impedimetric immunosensor with a low LOD (0.29 pg/mL in buffer and 1.3 pg/mL in mouse brain tissue homogenate) for Murine double minute 2 protein (cancer

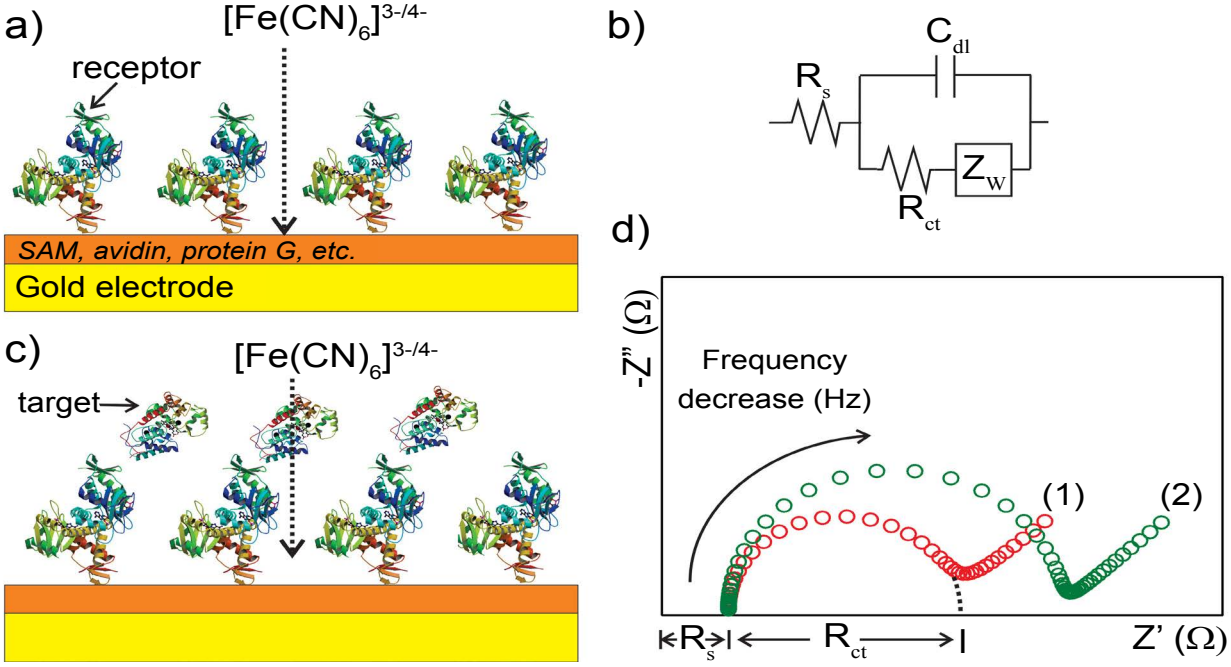


Figure 6: Schematic representation of an faradaic impedance measurement. a) A sensing surface compromising a receptor attached above the gold electrode. A redox probe (here $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$) has to approach the surface to exchange electrons and is faced with a barrier, quantified by R_{ct}, generated by the receptive film, any bound target and the supporting chemistry. The electrochemical behavior of the system (solution with the redox probe and sensing electrode) can be described by the Randles equivalent circuit, as shown in (b). When targets are recruited from the solution (receptor-target interaction) the additional layer formed at the surface further increases the blocking effect and R_{ct} (situation 2 in Figure 6d). Change in R_{ct} can thus be used as a direct reporter of specific target presence. In Figure 6d, a hypothetical Nyquist plot for items a and b is shown. In the abscissa is shown the resolution of R_s and R_{ct} from experimental data.

Citation: Santos A, Davis JJ, Bueno PR (2014) Fundamentals and Applications of Impedimetric and Redox Capacitive Biosensors. J Anal Bioanal Tech S7: 016. doi:10.4172/2155-9872.S7-016

biomarker). Within this work the authors immobilized the antibody on a polycrystalline gold electrode functionalized with cysteamine via a cross-linking agent. The measurements were carried out using PBS solution containing $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ probe redox. The target associated R_{ct} increase yielded a linear relation with logarithm of concentration.

Johnson et al. [138] have reported a faradaic impedimetric biosensor to detect CRP (a cardiovascular marker) in serum. In this work, a carboxylate terminal thiol film on gold was used to tether specific receptive protein affimers or antibodies, with, again, R_{ct} determined by the equivalent circuit shown in Figure 7b [137]. Using a similar approach, Bryan et al. [76] constructed an impedimetric sensor for CRP quantification in dilute blood serum with an LOD at picomolar concentration levels. Fernandes et al. [74], in physically immobilizing anti-CRP at a mixed SAM functionalized electrode, designed an impedimetric sensor to quantify CRP in a linear range of 0.5-10 nM and LOD of 0.3 nM [74].

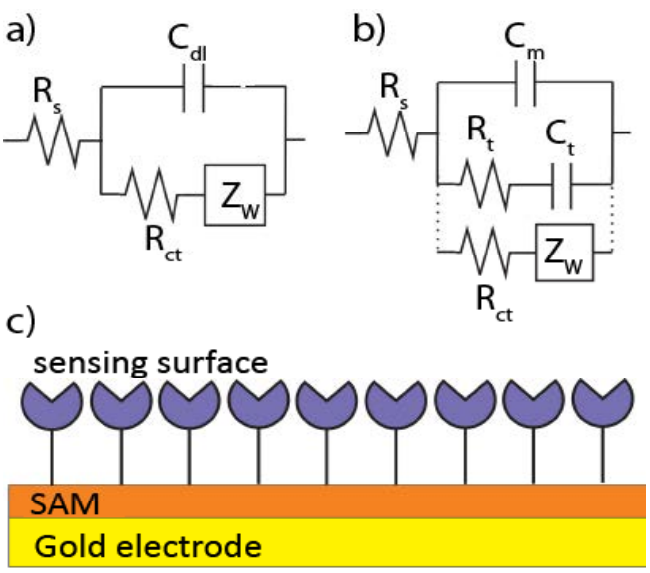


Figure 7: a) Randles equivalent circuit and an (b) alternative picture considering the SAM (dielectric layer) contributions in the capacitive response of a system comprising electrolyte (not shown), a sensing surface and the SAM (c).

Barton et al. [117] developed a sensitive faradaic impedimetric assay for prostate specific antigen (PSA) detection (the most commonly utilized prostate cancer marker; at 4-10 ng/ml, there is a documented ~20% cancer probability, with this rising to ~70% when levels exceed 10 ng ml^{-1}) [139,140]. Here, the authors immobilized biotin anti-PSA using the previously outlined biotin/avidin protocol and, achieved target detection with a linear range of 1-100 pg/mL and a LOD of 1 pg/mL [117]. Chiriacò et al. [141] using a different immobilization approach, reported two different impedimetric arrays to quantify free and complexed forms of PSA. In this work anti-free PSA or anti-total PSA capture agents were electrode immobilized via protein A, itself pre-immobilized on a functionalized carboxylic thiol electrode. The authors reported assays with a linear range of 1-10 ng/mL and LOD of 1 ng/mL.

A sensor to detect thrombin was developed by Xu et al. [142] using a histidine labeled thrombin aptamer (His-TBA). For this work, the authors electrogenerated a poly(pyrrole- nitrilotriaceticacid) film at a Pt electrode surface prior to recruiting the aptamer through its HIS-tag mediated copper ligation (this methodology also allows facile surface regeneration using imidazole). The sensor developed an LOD of 4.4 pM and a linear range of 4.7 pM-0.5 nM. Ocaña and del Vale designed a faradaic impedimetric sandwich type biosensor to detect thrombin even more sensitively (LOD of 0.2 pM) [143]. In the first step, they immobilized the biotin labeled aptamer (AptThrBio1) onto an electrode functionalized with avidin and blocked unspecific sites with poly(ethylene glycol). After incubation with target, the sensors were exposed to a second biotin labeled aptamer (AptThrBio2) with subsequently reaction with gold-streptavidin nanoparticle and silver enhancement via catalytic reduction. This approach yields a sensitive sensor to thrombin in a linear range of 0.1-100 pM.

Although the summary in Table 1 is necessarily only a representative survey of faradaic EIS sensor examples, the vast majority of R_{ct} signal transductions are associated with an (conceptually expected) increase in this parameter with target surface recruitment. However, Rodriguez et al. [41] reported an assay in which biorecognition is associated with

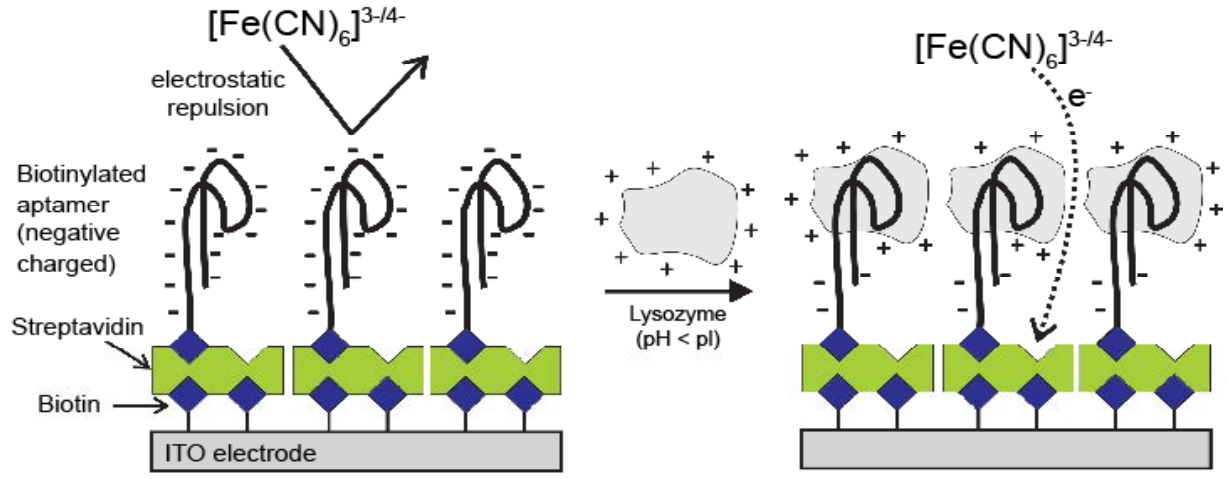


Figure 8: In an approach reported by Rodriguez et al. [41], biotin labeled aptamers were immobilized at an electrode previously functionalized with streptavidin. The initial high levels of electrostatic repulsion are attenuated when cationic target lysozyme (added in µg/mL levels) is recruited from solution.

Citation: Santos A, Davis JJ, Bueno PR (2014) Fundamentals and Applications of Impedimetric and Redox Capacitive Biosensors. J Anal Bioanal Tech S7: 016. doi:10.4172/2155-9872.S7-016

a decrease in R_{ct}. The basis of this was the strong electrostatic repulsion initially set up between the recognizing nucleic acid aptamer capture agent and the anionic ($Fe[CN)_6]^{3-/4-}$) solution probe. The capture of a cationic target (where experimental conditions are such that pH<pI) attenuate the repulsive charge, and, consequently, R_{ct} [41]. Here an effective assay of lysozyme was achieved [41] (Figure 8).

In addition to its extensive application to the quantification of proteins, EIS has been used successfully to detect cells, including bacteria [118] and cells related to specific disease states [114]. Impedimetric biosensors have, for example, been applied to the detection of monocytes with $CD14^+$ and $CD16^+$ expression [6]. Monocytes are a type of white blood cell responsible for organism defense against infectious pathogens and inflammation [144]. An increase in the blood level of monocytes with $CD14^+$ and $CD16^+$ expression represents evidence of severe bacterial infection [5]. In achieving an effective assay, Montrose et al. [6] immobilized the anti CD14 or CD16 antibodies at a protein G functionalized gold electrode prior to running a relatively standard faradaic EIS assay.

In an application to cancer cell detection, Hu et al. [111] immobilized concanavalin A (Con A), a mannose specific lectin, on gold electrode prior to a faradaic assay. The device was able to detect selectively human hepatocellular carcinoma cells (Bel-7404, a liver cancer cell) in a linear range of 10^3-10^6 cells/mL with LOD of 234 cells/mL [111]. Seven et al. [114] designed an impedimetric immunosensor to detect MCF-7 cells (10^2 – 10^4 cells/mL) with overexpressed c-erbB-2 receptors (markers of breast cancer). In this case, experimental R_{ct} data were obtained using hydroquinone as a redox probe after incubation with cell samples, with an achieved limit of quantification (LOQ) of 100 cell/mL.

Interdigitated array microelectrodes (IDAM) have also been applied to impedance based biosensing. These electrodes present several advantages, such as the rapid establishment of steady-state, facile rapid reaction kinetics, and associated increases in sensitivity (although equivalent circuits can be somewhat more complex than those typically associated with single planar electrodes) [112,145,146]. In one application, Ohno et al. [112] used a gold interdigitated electrode to build a label-free human immunoglobulin A (IgA) immunosensor. The electrodes were first functionalized with 3-mercaptopropionic acid, the antibody covalently tethered and the surface then backfilled with BSA solution. A linear response in R_{ct} was obtained for a concentration range of 0.01-100 ng/mL, yielding an assay with LOD of 0.01 ng/mL. Bhansali and coworkers [145] developed an assay to detect cortisol (a stress-related biomarker) in saliva by an immobilizing a monoclonal antibody covalently onto a gold electrode previously functionalized with dithiobis(succinimidyl propionate) (DTSP) self-assembled monolayer, and then used glycine/ethanolamine solution mixture to block unspecific sites. The assay was able to detect cortisol in a linear range of 1 pM to 10 nM and LOD of 1 pM [145]. In another example, Xu et al. [147] designed an interdigitated gold electrode assay to detect IgE. In this case, the authors immobilized an IgE thiol-modified aptamer, consisting of single-stranded DNA containing a hairpin loop, directly on gold surface. This methodology was able to detect IgE in a linear range of 2.5-100 nM with LOD of 0.1 nM.

Non-faradaic impedance

The main difference between non-faradaic and faradaic impedance approaches is the need for a redox active probe. In non-faradaic impedance, transduction occurs not through changes in the impediment presented to a solution phase probe but to surface dielectric, charge distribution or local conductance, most commonly assessed through capacitance [128]. The capacitance arises when an electrode is immersed in an electrolyte solution and a certain potential is applied. In this condition, charged species and dipoles will be oriented on the interface electrode/solution, generating the previously mentioned electrical double layer capacitance, a physically measureable quantity potentially very sensitive to interfacial change. This change may be induced when a protein target binds to the receptor, previously attached in the electrode, displacing water and ions from the surface [148], or due a changing in protein conformation [128].

The capacitance of a biorecognition surface in non-faradaic approach can be described as a combination of two capacitances (Figure 9). The first capacitance consists of an insulating layer, comprised by a SAM on gold and double layer (C_m). The second capacitance (C_{rec}) is related to the formation of a receptor biofilm (biorecognition layer). The binding event (target-receptor biorecognition) generates a third layer, (C_a). The total capacitance (C) obtained by the combination in series of these three components: (Eq. 4)

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_m} + \frac{1}{C_{rec}} + \frac{1}{C_a} \quad (4)$$

From Eq. 4, the total capacitance is dominated by the lowest component and this observation is important in capacitance sensor design, in which the capacitance of the insulating layer has to be high as possible to allow detect changes in the system caused by target binding [128]. This means that the insulating layer has to be impermeable to ions from solution, otherwise this will lead to a decrease or absence of the signal [128].

The total capacitance can be experimentally obtained by two methodologies: electrochemical impedance spectroscopy (EIS) or potential step amperometry. The EIS, as discussed previously in *Fundamentals of EIS* Section, measures the current response due an application of a perturbative sinusoidal voltage. The range of frequencies commonly used is around 10 kHz [128]. In the potential step amperometry, it is measured the response current due a potential perturbation step (around 50 mV) in a same frequency [128]. Measuring the current in low electrolyte concentrations, condition where the time constant ($\tau = R_S C$) is high and hence measurable, the current response is given by: (Eq. 5)

$$i(t) = \frac{U}{R_S} \exp\left[\left(\frac{-t}{CR_S}\right)\right] \quad (5)$$

Where $i(t)$ is the current in the circuit in function of time, U the

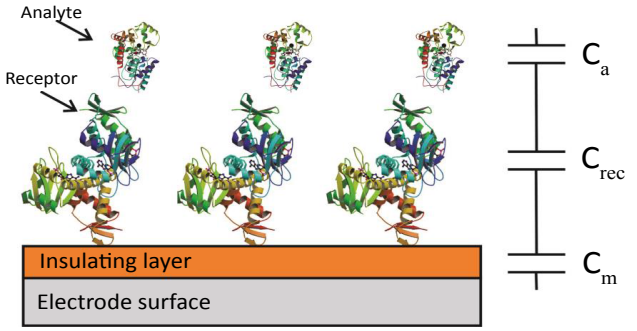


Figure 9: Schematic representation of a capacitive biosensor. The capacitive behavior can be described by an association of three capacitors: the capacitance due the insulating layer, C_m (SAM and double layer), C_{rec} represents the capacitance of the receptive layer and C_a is the capacitance related to the biorecognition film.

Citation: Santos A, Davis JJ, Bueno PR (2014) Fundamentals and Applications of Impedimetric and Redox Capacitive Biosensors. J Anal Bioanal Tech S7: 016. doi:10.4172/2155-9872.S7-016

pulse potential (the magnitude) applied, R_S the solution resistance, t the time elapsed after the potential step application and C the total capacitance (in other words, the equivalent capacitance) measured at the working electrode/solution interface [128]. This function can be easily linearized as follows: (Eq. 6)

$$\ln i(t) = \ln\frac{U}{R_S} - \frac{t}{CR_S} \quad (6)$$

Then, C and R_S can be extract from the slope and intercept of the linear least-square fitting of ln $i(t)$.

Capacitive approaches have invested in the use of both aptamers and antibodies as recognition elements [149-152]. For example, Dijksma et al. [153] immobilized a specific antibody (MD-2) above SAM modified gold electrode to detect interferon-γ (biomarker for autoinflammatory and autoimmune disease). The authors used a flow cell, injecting controlled amounts of target followed by buffer washes (PBS). The methodology adopted was able to detect the target across a range of 0-0.00000014 ng/mL and LOD of 0.00000002 ng/mL [153].

Thavarungkul and coworkers [151] compared the target recruiting performance of covalently tethered anti-alpha-fetoprotein at thiourea, thioctic acid and 3-mercaptopropionic acid SAM interfaces. The three interfaces exhibited the same linear range (0.01-10 μg/mL) with very comparable sensitivities and detection limits [151]. Using a similar thiourea SAM gold modified electrode, Limbut et al. [152] developed an immunosensor able to detect carcinoembryonic antigen (cancer biomarker) in a linear range of 0.01-10 ng/mL and LOD of 10 pg/mL with an apparent ability to be extensively reused.

Lin et al. [154] developed a sensitive impedimetric non-faradaic EIS assay to detect two cardiac biomarkers (CRP and myeloperoxidase) in human serum. The configuration consists of a gold electrode surface coated with a nanoporous silica membrane, the later forming nanowells. The underlying gold surfaces were functionalized with a dithiobis-(succinimidyl propionate) crosslinker, streptavidin, then biotinylated antibody. The immunoreaction was monitored by analyzing the change in capacitance associated with double layer perturbation within the nanowells. Using this approach, the researchers claimed to be able to detect both biomarkers in pg/mL levels in human serum [154].

Antifouling surfaces for capacitive biosensing approach are possible using zwitterionic polymers previously mentioned. For example, Luo et al. [100] developed a sensitive non-faradaic impedance biosensor to detect insulin in neat blood serum. In this work, the receptor (anti-insulin antibody) was immobilized on a non-fouling zwitterionic polymer (carboxybetaine methacrylate, PCBMA). Biorecognition was sensitively (at fM levels) tracked through change in phase between the input voltage and the output current, an ability retained in serum [100].

There are, then, interesting examples of capacitive biosensors capable of quantifying important biomarkers with low limits of detection (picogram levels). In addition, from a practical point of view, the absence of a redox couple in solution during the analysis makes the associated non-faradaic approach more translatable to point-of-care devices. In the next section, we will discuss a new approach to develop sensitive biosensors (LOD in picomolar levels) that is unnecessary adding redox probe: the capacitance redox biosensing.

ECS Biosensing

When a voltage polarized metallic interface is placed in an

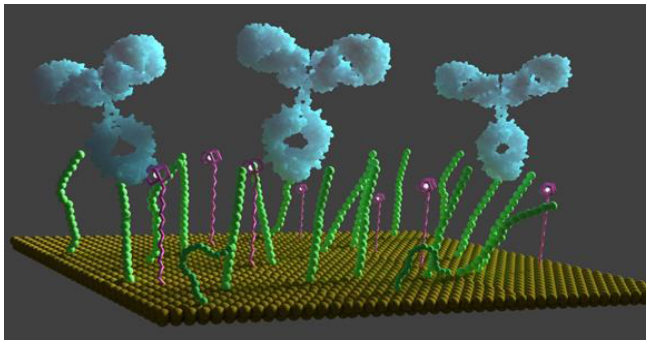


Figure 10: An electrode surface confined redox group contributes to a substantial potential dependent interfacial charging that can be sensitively probed and frequency resolved by impedance derived capacitance spectroscopy, i.e. ECS approach. In utilising the sensitivity of this charging fingerprint to redox group environment one can seek to generate derived sensory configurations. Generally, exemplified through the generation of mixed molecular films comprising ferrocene and antibody receptors to clinically important targets, the surface engineered with the specific purpose to use C_r as transducer signal is very sensible for biosensoring. Reprinted with permission from J. Lehr, F. C. B. Fernandes, P. R. Bueno and J. J. Davis, Analytical Chemistry, 2014, 86, 2559-2564. Copyright (2014) American Chemical Society.

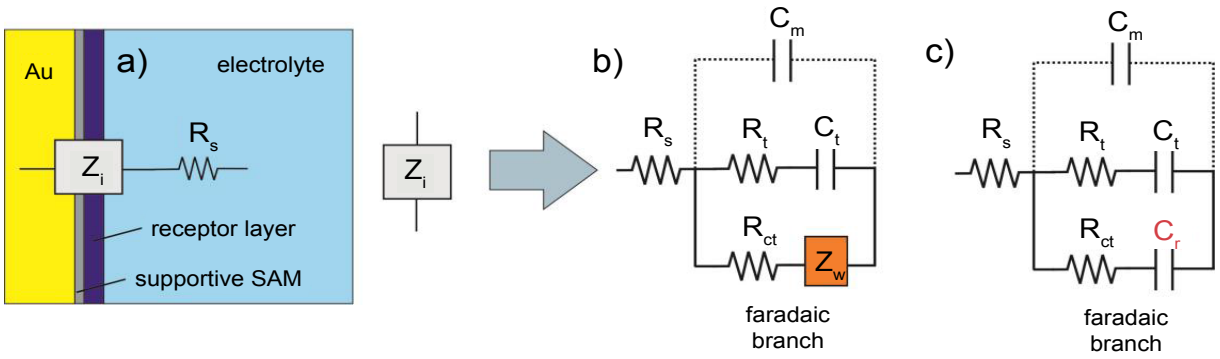


Figure 11: a) Schematic representation of the interfacial impedance of the receptive interfaces used in biosensoring. b) The equivalent circuit capable of modelling impedimetric biosensor data where redox probe is present in solution phase. The Warburg element (Z_w) accounts for the bulk diffusion characteristics of the redox probe and R_{ct} is the redox charge transfer resistance. The electrolyte resistance (R_s) is modelled in series with the above total interfacial impedance (see (a)) and generally it is not important in the prevaling analysis once it does not vary. c) Is the appropriate equivalent circuit capable of modelling electrochemical capacitive biosensors. Note that interfacial capacitance of a monolayer dielectric modified electrode is defined by two series capacitances, those of the monolayer (C_m) and of the double-layer (C_{dl}) where $C_{dl} >> C_m$, meaning C_m dominates in analyses and is, therefore, the only capacitance represented in the equivalent circuit showed in these equivalent circuit models. Furthermore, $C_m << C_t$ in a way that R_t and C_t control the monolayer dielectric (non-faradaic) response [137,160-163]. Reproduced with permission from reference [74].

Citation: Santos A, Davis JJ, Bueno PR (2014) Fundamentals and Applications of Impedimetric and Redox Capacitive Biosensors. J Anal Bioanal Tech S7: 016. doi:10.4172/2155-9872.S7-016

electrolyte, there is established, as previously noted, a double layer capacitance (storage). This is modified in the presence of a molecular film but is retained in some form. If a film is present which includes an entity which can be faradaically charged i.e. is redox active then an additional charging element is present – this has commonly been termed (in electrochemical literature) pseudocapacitance. The relative magnitudes of these two storage contributions depend sensitively on the surface and solution composition but, in general, pseudocapacitance is markedly higher.

Very recently we have shown that the loosely described pseudocapacitance associated with surface confined redox events represents a specific manifestation of the general mesoscopic capacitance principles introduced by Marcus Büttiker [155]. We have specifically referred to this as redox capacitance (C_r) and detailed its origin as exactly that which arises due to the communication of the metal density of states [$g_m(E)$] to a redox site molecular density of states [$g_r(E)$] [156,157]. This capacitance is measured through impedance-derived electrochemical capacitance spectroscopy, ECS. We have further shown that this experimentally resolved capacitance (without the contribution the non-faradaic components as described previously) is, in fact, comprised of two distinct contributions thus: (Eq. 7)

$$\frac{1}{C_r} = \frac{1}{C_e} + \frac{1}{C_q} \tag{7}$$

where $C_e = dq/dV$ is the electrostatic or geometrical capacitance arising from charge separation in the normal (classical) way and C_q is the quantum capacitance, arising very specifically from the chemical potential changes associated when charging a nanoscale mesoscopic entity [155]. C_q is specifically defined as [156]: (Eq. 8)

$$\frac{1}{C_q} = \frac{1}{e^2}\left(\frac{1}{g_m(E)} + \frac{1}{g_r(E)}\right) \tag{8}$$

Since $g_m(E) >> g_r(E)$, i.e. the electronic density of states in the metal is much higher than that of molecular redox states chemically attached over the electron reservoir, this reduces to $C_q = e^2 g_r(E)$ [156]. Statistically, for a distribution of states, above absolute room temperature, $g_r(E)$ is given (meaning experiment observed) by a Gaussian redox density of states defined as [158]: (Eq. 9)

$$g_r(\mu_e) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{(E_r - \mu_e)^2}{2\sigma^2}\right] \tag{9}$$

Where σ is the standard deviation (and σ^2 the variance) of the multiple energetic states possibles.

In recent work we have shown that this resolved C_r charging element can be very effectively used as a transduction of biological recognition events [74,102,108]. These are label free assays and do not require any pre-doping of the analytical solution with redox probe (in effect, the redox probe is constrained at the electrode surface and analysed through its highly potential dependent charging, Figure 10). This approach benefits from the fact that the transducing signal is cleanly separated from background through its specific frequency and voltage dependence and requires that a mixed surface film is prepared, that is, one which comprised a redox capacitance unit and a recognition element (Figure 12).

The C_r signal itself is obtained from $Z^*(\omega)$ which is converted mathematically to capacitance using the relationship $C^*(\omega)=1/i\omega Z^*(\omega)$, in which ω is the angular frequency and $i = \sqrt{-1}$ (more details can be found in references [137,158]). A complete circuit description of these interfaces (or those more generally associated with a dielectric component and a redox active component) and more detailed comparison between EIS and ECS approaches and responses are shown in Figure 11 [137,160-163].

It is important to note that any change in the environment of the redox tethered sites causes a change in the storage capability of the molecular layer with a consequent change in C_r. This was initially demonstrated in an assay of CRP [102] using a mixed SAM compromising a tethered redox probe (11-ferrocenyl-undecanethiol) and pentadecanethiol on which the receptive antibodies were physisorbed. Assay performance was comparable to that reported in previous work [76,138].

An improvement in assay capability was subsequently by Lehr et al. [108] using a different mixed SAM. In this case, the film comprised a thiol-PEG-CO_2H (to antibody covalent attachment) and 11-ferrocenyl-undecanethiol (probe redox). Within the same work, the authors used a similar approach to establish a sensitive immunoassay for PAP (besides CRP), a prognostic marker for prostate cancer. Both markers were quantifiable across their clinically relevant ranges and in following redox capacitive changes as shown in Figures 13 and 14.

Conclusion

A diverse range of interfacial strategies exist which can support the sensitive detection of proteins, small molecules and specific cells. Of the methods which are quantifiable and sensitive without requiring pre-labelling of the analytes, those based on electroanalyses are undoubtedly the most flexible in format and capability whilst, additionally, being both cheap and scaleable. In this short review, we have introduced some of the principles associated with electroanalytical detection of biomarkers, most specifically soluble protein markers. We have introduced general principles, exemplified with a range of examples and discussed the fundaments of the impedance and impedance-derived capacitive approaches. Impedimetric approaches can be both straightforward and highly sensitive and have largely been faradaic. One major challenge has been to translate a capability in highly controlled buffered aqueous solution to more complex samples and we have given examples of where recent strategies have enabled exactly this. Capacitive methods can be exceptionally sensitive without

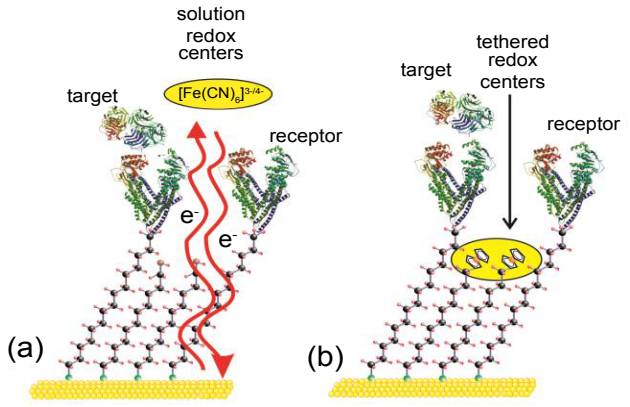


Figure 12: Comparative schematic representations of (a) faradaic EIS and (b) capacitive ECS biosensing [74]. (a) The faradaic impedimetric surface engineering is based in the electron transfer resistance (R_{ct}) of the redox probe in solution to metal surface. (b) The capacitive approach does not need a redox probe in solution, but an electrode tethered one. The environmental sensitivity of this charging capability is used as the reporter of neighboring biorecognition. The associated equivalent circuits are presented in Figures 11a and 11b respectively. Reproduced with permission from reference [74].

Citation: Santos A, Davis JJ, Bueno PR (2014) Fundamentals and Applications of Impedimetric and Redox Capacitive Biosensors. J Anal Bioanal Tech S7: 016. doi:10.4172/2155-9872.S7-016

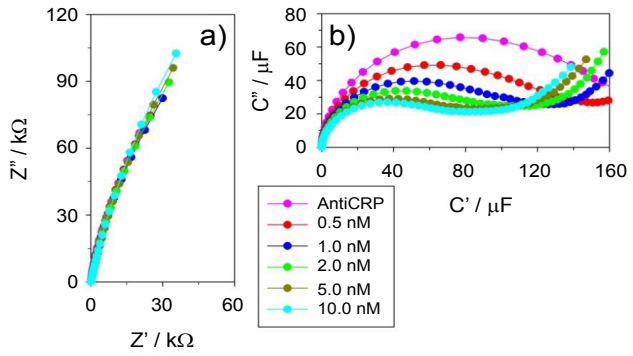


Figure 13: a) Nyquist impedimetric plot of Z'' *versus* Z' for a redox active, CRP-receptive film, where only minimal sensitivity to target binding is evident. The analogous capacitive response to CRP binding is shown in b) where a sensitive modulation in response to CRP is observed (C_r itself is obtained from the semicircle diameters). All plots are average curves obtained from three different working electrodes. Reproduced with permission from reference [102].

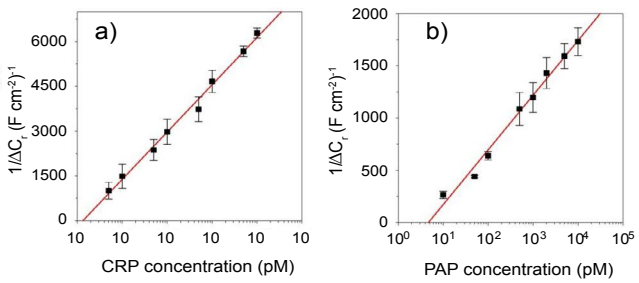


Figure 14: Analytic capacitive curves reporting C_r for (a) CRP to CRP receptive interfaces and (b) PAP to PAP receptive interfaces. Plotted data points represent means and standard deviations across three measured interfaces in each case. Errors reported at 95% confidence. R^2 (for CRP) is 0.994 and R^2 (for PAP) is 0.990, where R^2 is the coefficient of determination. Reprinted with permission from J. Lehr, F. C. B. Fernandes, P. R. Bueno and J. J. Davis, Analytical Chemistry, 2014, 86, 2559-2564. Copyright (2014) American Chemical Society.

any pre-dosing of the analytical solution with a reporting "probe". This sensitivity can, however, be accompanied by a struggle to either predict observations or to make them reproducible. We have discussed a new analytical methodology based on impedance derived capacitance spectroscopy and shown, not only that this is potent in analyzing dielectric films generally but also that it can be combined with surface tethered redox reporters in establishing highly sensitive label free assays based on "capacitive charging" (redox capacitance).

References

1. Mayeux R (2004) Biomarkers: potential uses and limitations. NeuroRx 1: 182-188.
2. Strimbu K, Tavel JA (2010) What are biomarkers? Curr Opin HIV AIDS 5: 463-466.
3. Biomarkers Definitions Working Group. (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Ther 69: 89-95.
4. Ruhaak LR, Miyamoto S, Lebrilla CB (2013) Developments in the identification of glycan biomarkers for the detection of cancer. Mol Cell Proteomics 12: 846-855.
5. Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Ströbel M, et al. (1993) The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. Blood 82: 3170-3176.
6. Montrose A, Cargou S, Nepveu F, Manczak R, Gué AM, et al. (2013) Impedimetric immunosensor for the detection of circulating pro-inflammatory monocytes as infection markers. Biosens Bioelectron 49: 305-311.
7. Su X, Chew T, Li SFY (2000) Design and application of piezoelectric quartz crystal-based immunoassay. Analytical Sciences 16: 107-114.
8. Speight RE, Cooper MA (2012) A survey of the 2010 quartz crystal microbalance literature. J Mol Recognit 25: 451-473.
9. Wu AHB (2006) A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry. Clinica Chimica Acta 369: 119-124.
10. Berson SA, Yalow RS (2006) General principles of radioimmunoassay. 1968. Clin Chim Acta 369: 125-143.
11. Safi MA (2010) An overview of various labeled assays used in medical laboratory diagnosis. Immune and non-immune assays. Saudi Med J 31: 359-368.
12. Homola J (2008) Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. Chem Rev 108: 462-493.
13. Šípová H, Homola J (2013) Surface plasmon resonance sensing of nucleic acids: a review. Anal Chim Acta 773: 9-23.
14. Haab BB (2003) Methods and applications of antibody microarrays in cancer research. Proteomics 3: 2116-2122.
15. Ray S, Mehta G, Srivastava S (2010) Label-free detection techniques for protein microarrays: prospects, merits and challenges. Proteomics 10: 731-748.
16. Vashist SK, Vashist P (2011) Recent Advances in Quartz Crystal Microbalance-Based Sensors. Journal of Sensors 2011.
17. Cooper MA, Singleton VT (2007) A survey of the 2001 to 2005 quartz crystal microbalance biosensor literature: applications of acoustic physics to the analysis of biomolecular interactions. J Mol Recognit 20: 154-184.
18. Uludag Y, Tothill IE (2012) Cancer biomarker detection in serum samples using surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance sensors with nanoparticle signal amplification. Anal Chem 84: 5898-5904.
19. Garai-Ibabe G, Grinyte R, Golub EI, Canaan A, de la Chapelle ML, et al. (2011) Label free and amplified detection of cancer marker EBNA-1 by DNA probe based biosensors. Biosens Bioelectron 30: 272-275.
20. Wang D, Chen G, Wang H, Tang W, Pan W, et al. (2013) A reusable quartz crystal microbalance biosensor for highly specific detection of single-base DNA mutation. Biosens Bioelectron 48: 276-280.
21. Giménez-Romero D, Bueno PR, Pesquero NC, Monzó IS, Puchades R, et al. (2013) Elucidation of carbohydrate molecular interaction mechanism of recombinant and native ArtinM. J Phys Chem B 117: 8360-8369.
22. Pesquero NC, Pedroso MM, Watanabe AM, Goldman MH, Faria RC, et al. (2010) Real-time monitoring and kinetic parameter estimation of the affinity interaction of jArtinM and rArtinM with peroxidase glycoprotein by the electrogravimetric technique. Biosens Bioelectron 26: 36-42.
23. Pedroso MM, Watanabe AM, Roque-Barreira MC, Bueno PR, Faria RC (2008) Quartz Crystal Microbalance monitoring the real-time binding of lectin with carbohydrate with high and low molecular mass. Microchemical Journal 89: 153-158.
24. Reddy PJ, Sadhu S, Ray S, Srivastava S (2012) Cancer biomarker detection by surface plasmon resonance biosensors. Clin Lab Med 32: 47-72.
25. Song S, Wang L, Li J, Fan C, Zhao J (2008) Aptamer-based biosensors. TrAC Trends in Analytical Chemistry 27: 108-117.
26. Kimmel DW, LeBlanc G, Meschievitz ME, Cliffel DE (2012) Electrochemical sensors and biosensors. Anal Chem 84: 685-707.
27. Omidfar K, Khorsand F, Darziani Azizi M (2013) New analytical applications of gold nanoparticles as label in antibody based sensors. Biosens Bioelectron 43: 336-347.
28. Hao N, Li H, long Y, Zhang L, Zhao X, et al. (2011) An electrochemical immunosensing method based on silver nanoparticles. Journal of Electroanalytical Chemistry 656: 50-54.
29. Ju H, Zhang X, Wang J (2011) Nanomaterials for Immunosensors and Immunoassays. In NanoBiosensing, Springer, New York, 425-452.

Citation: Santos A, Davis JJ, Bueno PR (2014) Fundamentals and Applications of Impedimetric and Redox Capacitive Biosensors. J Anal Bioanal Tech S7: 016. doi:10.4172/2155-9872.S7-016

30. Pingarrón JM, Yáñez-Sedeño P and González-Cortés A (2008) Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. Electrochimica Acta 53: 5848-5866.

31. Liu G, Lin Y (2007) Nanomaterial labels in electrochemical immunosensors and immunoassays. Talanta 74: 308-317.

32. Huang H, Zhu JJ (2013) The electrochemical applications of quantum dots. Analyst 138: 5855-5865.

33. Dai Y, Cai Y, Zhao Y, Wu D, Liu B, et al. (2011) Sensitive sandwich electrochemical immunosensor for alpha fetoprotein based on prussian blue modified hydroxyapatite. Biosens Bioelectron 28: 112-116.

34. Larkin SE, Zeidan B, Taylor MG, Bickers B, Al-Ruwaili J, et al. (2010) Proteomics in prostate cancer biomarker discovery. Expert Rev Proteomics 7: 93-102.

35. Wang L, Jia X, Zhou Y, Xie Q, Yao S (2010) Sandwich-type amperometric immunosensor for human immunoglobulin G using antibody-adsorbed Au/SiO_2 nanoparticles**.** Microchimica Acta 168: 245-251.

36. Zhang J, Liu B, Liu H, Zhang X, Tan W (2013) Aptamer-conjugated gold nanoparticles for bioanalysis. Nanomedicine (Lond) 8: 983-993.

37. Liu Y (2008) Electrochemical detection of prostate-specific antigen based on gold colloids/alumina derived sol-gel film. Thin Solid Films 516: 1803-1808.

38. Ho JA, Chang HC, Shih NY, Wu LC, Chang YF, et al. (2010) Diagnostic detection of human lung cancer-associated antigen using a gold nanoparticle-based electrochemical immunosensor. Anal Chem 82: 5944-5950.

39. Chen ZP, Peng ZF, Zhang P, Jin XF, Jiang JH, et al. (2007) A sensitive immunosensor using colloidal gold as electrochemical label. Talanta 72: 1800-1804.

40. Ma F, Ho C, Cheng AKH and Yu HZ (2013) Immobilization of redox-labeled hairpin DNA aptamers on gold: Electrochemical quantitation of epithelial tumor marker mucin 1. Electrochimica Acta 110: 139-145.

41. Rodriguez MC, Kawde AN, Wang J (2005) Aptamer biosensor for label-free impedance spectroscopy detection of proteins based on recognition-induced switching of the surface charge. Chem Commun (Camb) : 4267-4269.

42. Xiao Y, Lubin AA, Heeger AJ, Plaxco KW (2005) Label-free electronic detection of thrombin in blood serum by using an aptamer-based sensor. Angew Chem Int Ed Engl 44: 5456-5459.

43. Willner I, Zayats M (2007) Electronic aptamer-based sensors. Angew Chem Int Ed Engl 46: 6408-6418.

44. Mir M, Katakis I (2007) Aptamers as elements of bioelectronic devices. Mol Biosyst 3: 620-622.

45. Radi AE, Acero Sánchez JL, Baldrich E, O'Sullivan CK (2006) Reagentless, reusable, ultrasensitive electrochemical molecular beacon aptasensor. J Am Chem Soc 128: 117-124.

46. Xiao Y, Piorek BD, Plaxco KW, Heeger AJ (2005) A reagentless signal-on architecture for electronic, aptamer-based sensors via target-induced strand displacement. J Am Chem Soc 127: 17990-17991.

47. Goda T, Miyahara Y (2013) Label-free and reagent-less protein biosensing using aptamer-modified extended-gate field-effect transistors. Biosens Bioelectron 45: 89-94.

48. Kim CH, Ahn JH, Kim JY, Choi JM, Lim KC, et al. (2013) CRP detection from serum for chip-based point-of-care testing system. Biosens Bioelectron 41: 322-327.

49. Bănică FG (2012) Enzymes and Enzymatic Sensors. In: Chemical Sensors and Biosensors, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 28-49.

50. Newman JD, Setford SJ (2006) Enzymatic biosensors. Mol Biotechnol 32: 249-268.

51. Yakovleva ME, Safina GR, Danielsson B (2010) A study of glycoprotein-lectin interactions using quartz crystal microbalance. Anal Chim Acta 668: 80-85.

52. Bertok T, Klukova L, Sediva A, Kasák P, Semak V, et al. (2013) Ultrasensitive impedimetric lectin biosensors with efficient antifouling properties applied in glycoprofiling of human serum samples. Anal Chem 85: 7324-7332.

53. Trilling AK, Beekwilder J, Zuilhof H (2013) Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview. Analyst 138: 1619-1627.

54. Sassolas A, Blum LJ, Leca-Bouvier BD (2012) Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. Biotechnol Adv 30: 489-511.

55. Zhang X, Yadavalli VK (2011) Surface immobilization of DNA aptamers for biosensing and protein interaction analysis. Biosens Bioelectron 26: 3142-3147.

56. Bonanno LM, Delouise LA (2007) Steric crowding effects on target detection in an affinity biosensor. Langmuir 23: 5817-5823.

57. Bonroy K, Frederix F, Reekmans G, Dewolf E, De Palma R, et al. (2006) Comparison of random and oriented immobilisation of antibody fragments on mixed self-assembled monolayers. J Immunol Methods 312: 167-181.

58. Makaraviciute A, Ramanaviciene A (2013) Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors. Biosens Bioelectron 50: 460-471.

59. Wink T, van Zuilen SJ, Bult A, van Bennkom WP (1997) Self-assembled monolayers for biosensors. Analyst 122: 43R-50R.

60. Chaki NK, Vijayamohanan K (2002) Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. Biosens Bioelectron 17: 1-12.

61. Ferretti S, Paynter S, Russell DA, Sapsford KE, Richardson DJ (2000) Self-assembled monolayers: a versatile tool for the formulation of bio-surfaces. TrAC Trends in Analytical Chemistry 19: 530-540.

62. Lee J, Seo J, Kim C, Kwon Y, Ha J, et al. (2013) A comparative study on antibody immobilization strategies onto solid surface. Korean Journal of Chemical Engineering 30: 1934-1938.

63. Peluso P, Wilson DS, Do D, Tran H, Venkatasubbaiah M, et al. (2003) Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays. Anal Biochem 312: 113-124.

64. Wilson DS, Nock S (2002) Functional protein microarrays. Curr Opin Chem Biol 6: 81-85.

65. Kausaite-Minkstimiene A, Ramanaviciene A, Kirlyte J, Ramanavicius A (2010) Comparative study of random and oriented antibody immobilization techniques on the binding capacity of immunosensor. Anal Chem 82: 6401-6408.

66. Lue RY, Chen GY, Hu Y, Zhu Q, Yao SQ (2004) Versatile protein biotinylation strategies for potential high-throughput proteomics. J Am Chem Soc 126: 1055-1062.

67. Orth R, Clark TG, Craighead HG (2003) Avidin-biotin micropatterning methods for biosensor applications. Biomedical Microdevices 5: 29-34.

68. Lee JH, Choi HK, Chang JH (2010) Optimization of biotin labeling of antibodies using mouse IgG and goat anti-mouse IgG-conjugated fluorescent beads and their application as capture probes on protein chip. J Immunol Methods 362: 38-42.

69. Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, Whitesides GM (2005) Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. Chem Rev 105: 1103-1169.

70. Ulman A (1996) Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. Chem Rev 96: 1533-1554.

71. Bueno PR, Gonçalves LM, dos Santos FC, dos Santos ML, Barros AA, et al. (2013) Electrogravimetric Analysis by Quartz-Crystal Microbalance on the consumption of the neurotransmitter acetylcholine by acetylcholinesterase. Analytical Letters 46: 258-265.

72. Xu M, Luo X, Davis JJ (2013) The label free picomolar detection of insulin in blood serum. Biosens Bioelectron 39: 21-25.

73. Alcantar NA, Aydil ES, Israelachvili JN (2000) Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces. J Biomed Mater Res 51: 343-351.

74. Fernandes FCB, Santos A, Martins DC, Góes MS, Bueno PR (2014) Comparing label free electrochemical impedimetric and capacitive biosensing architectures. Biosens Bioelectron 57: 96-102.

75. Fischer MJ (2010) Amine coupling through EDC/NHS: a practical approach. Methods Mol Biol 627: 55-73.

76. Bryan T, Luo X, Bueno PR, Davis JJ (2013) An optimised electrochemical biosensor for the label-free detection of C-reactive protein in blood. Biosens Bioelectron 39: 94-98.

77. López-Gallego F, Guisán JM, Betancor L (2013) Glutaraldehyde-Mediated Protein Immobilization. In: Immobilization of Enzymes and Cells 1051: 33-41.

78. Huy TQ, Hanh NTH, Van Chung P, Anh DD, Nga PT, et al. (2011) Characterization of immobilization methods of antiviral antibodies in serum for electrochemical biosensors. Applied Surface Science 257: 7090-7095.

Citation: Santos A, Davis JJ, Bueno PR (2014) Fundamentals and Applications of Impedimetric and Redox Capacitive Biosensors. J Anal Bioanal Tech S7: 016. doi:10.4172/2155-9872.S7-016

79. Balamurugan S, Obubuafo A, Soper SA, Spivak DA (2008) Surface immobilization methods for aptamer diagnostic applications. Anal Bioanal Chem 390: 1009-1021.

80. Katz E, Willner I (2004) Biomolecule-functionalized carbon nanotubes: applications in nanobioelectronics. ChemPhysChem 5: 1084-1104.

81. Luz RAS, Iost RM, Crespilho FN (2013) Nanomaterials for Biosensors and Implantable Biodevices. Nanobioelectrochemistry 27-48.

82. Serafín V, Agüí L, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón JM (2014) Electrochemical immunosensor for the determination of insulin-like growth factor-1 using electrodes modified with carbon nanotubes-poly(pyrrole propionic acid) hybrids. Biosens Bioelectron 52: 98-104.

83. Eissa S, L'Hocine L, Siaj M, Zourob M (2013) A graphene-based label-free voltammetric immunosensor for sensitive detection of the egg allergen ovalbumin. Analyst 138: 4378-4384.

84. Justino CIL, Rocha-Santos TAP, Duarte AC (2013) Advances in point-of-care technologies with biosensors based on carbon nanotubes. TrAC Trends in Analytical Chemistry 45: 24-36.

85. Jr RAC, Vaddiraju S, Chan PY, Seyta R, Jain FC (2011) Label-free protein detection based on vertically aligned carbon nanotube gated field-effect transistors. Sensors and Actuators B: Chemical 160: 154-160.

86. Yu X, Chattopadhyay D, Galeska I, Papadimitrakopoulos F, Rusling JF (2003) Peroxidase activity of enzymes bound to the ends of single-wall carbon nanotube forest electrodes. Electrochemistry Communications 5: 408-411.

87. Yu X, Kim SN, Papadimitrakopoulos F, Rusling JF (2005) Protein immunosensor using single-wall carbon nanotube forests with electrochemical detection of enzyme labels. Mol Biosyst 1: 70-78.

88. Malhotra R, Patel V, Vaqué JP, Gutkind JS, Rusling JF (2010) Ultrasensitive electrochemical immunosensor for oral cancer biomarker IL-6 using carbon nanotube forest electrodes and multilabel amplification. Anal Chem 82: 3118-3123.

89. Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B (2007) SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. Biomol Eng 24: 381-403.

90. Yao C, Qi Y, Zhao Y, Xiang Y, Chen Q, et al. (2009) Aptamer-based piezoelectric quartz crystal microbalance biosensor array for the quantification of IgE. Biosens Bioelectron 24: 2499-2503.

91. Luo X, Davis JJ (2013) Electrical biosensors and the label free detection of protein disease biomarkers. Chem Soc Rev 42: 5944-5962.

92. Peters T (1996) All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. Academic Press: San Diego, California.

93. Qureshi A, Gurbuz Y, Niazi JH (2012) Biosensors for cardiac biomarkers detection: A review. Sensors and Actuators B: Chemical 171–172: 62-76.

94. Kirk JT, Brault ND, Baehr-Jones T, Hochberg M, Jiang S, et al. (2013) Zwitterionic polymer-modified silicon microring resonators for label-free biosensing in undiluted human plasma. Biosens Bioelectron 42: 100-105.

95. Jiang S, Cao Z (2010) Ultralow-fouling, functionalizable, and hydrolyzable zwitterionic materials and their derivatives for biological applications. Adv Mater 22: 920-932.

96. Zhao C, Li LY, Guo MM, Zheng J (2012) Functional polymer thin films designed for antifouling materials and biosenseors. Chemical Papers 66: 323-339.

97. Vaisocherová H, Yang W, Zhang Z, Cao Z, Cheng G, et al. (2008) Ultralow Fouling and Functionalizable Surface Chemistry Based on a Zwitterionic Polymer Enabling Sensitive and Specific Protein Detection in Undiluted Blood Plasma. Anal Chem 80: 7894-7901.

98. Goda T, Tabata M, Sanjoh M, Uchimura M, Iwasaki Y, et al. (2013) Thiolated 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine for an antifouling biosensor platform. Chem Commun (Camb) 49: 8683-8685.

99. Yang W, Xue H, Carr LR, Wang J, Jiang S (2011) Zwitterionic poly(carboxybetaine) hydrogels for glucose biosensors in complex media. Biosens Bioelectron 26: 2454-2459.

100. Luo X, Xu M, Freeman C, James T, Davis JJ (2013) Ultrasensitive label free electrical detection of insulin in neat blood serum. Anal Chem 85: 4129-4134.

101. Brault ND, Gao C, Xue H, Piliarik M, Homola J, et al. (2010) Ultra-low fouling and functionalizable zwitterionic coatings grafted onto SiO2 via a biomimetic adhesive group for sensing and detection in complex media. Biosens Bioelectron 25: 2276-2282.

102. Fernandes FCB, Góes MS, Davis JJ, Bueno PR (2013) Label free redox capacitive biosensing. Biosens Bioelectron 50: 437-440.

103. Guan JG, Miao YQ, Zhang QJ (2004) Impedimetric biosensors. J Biosci Bioeng 97: 219-226.

104. Prodromidis MI (2010) Impedimetric immunosensors—A review. Electrochimica Acta 55: 4227-4233.

105. Bryan T, Luo X, Forsgren L, Morozova-Roche LA, Davis JJ (2012) The robust electrochemical detection of a Parkinson's disease marker in whole blood sera. Chemical Science 3: 3468-3473.

106. Jarocka U, Sawicka R, Góra-Sochacka A, Sirko A, Zagórski-Ostoja W, et al. (2014) Electrochemical immunosensor for detection of antibodies against influenza A virus H5N1 in hen serum. Biosens Bioelectron 55: 301-306.

107. Qureshi A, Niazi JH, Kallempudi S, Gurbuz Y (2010) Label-free capacitive biosensor for sensitive detection of multiple biomarkers using gold interdigitated capacitor arrays. Biosens Bioelectron 25: 2318-2323.

108. Lehr J, Fernandes FCB, Bueno PR, Davis JJ (2014) Label-free capacitive diagnostics: exploiting local redox probe state occupancy. Anal Chem 86: 2559-2564.

109. Bourigua S, Hnaien M, Bessueille F, Lagarde F, Dzyadevych S, et al. (2010) Impedimetric immunosensor based on SWCNT-COOH modified gold microelectrodes for label-free detection of deep venous thrombosis biomarker. Biosens Bioelectron 26: 1278-1282.

110. Canbaz MÇ, Simşek CS, Sezgintürk MK (2014) Electrochemical biosensor based on self-assembled monolayers modified with gold nanoparticles for detection of HER-3. Anal Chim Acta 814: 31-38.

111. Hu Y, Zuo P, Ye BC (2013) Label-free electrochemical impedance spectroscopy biosensor for direct detection of cancer cells based on the interaction between carbohydrate and lectin. Biosens Bioelectron 43: 79-83.

112. Ohno R, Ohnuki H, Wang H, Yokoyama T, Endo H, et al. (2013) Electrochemical impedance spectroscopy biosensor with interdigitated electrode for detection of human immunoglobulin A. Biosens Bioelectron 40: 422-426.

113. Yang T, Wang S, Jin H, Bao W, Huang S, et al. (2013) An electrochemical impedance sensor for the label-free ultrasensitive detection of interleukin-6 antigen. Sensors and Actuators B: Chemical 178: 310-315.

114. Seven B, Bourourou M, Elouarzaki K, Constant JF, Gondran C, et al. (2013) Impedimetric biosensor for cancer cell detection. Electrochemistry Communications 37: 36-39.

115. Elshafey R, Tlili C, Abulrob A, Tavares AC, Zourob M (2013) Label-free impedimetric immunosensor for ultrasensitive detection of cancer marker Murine double minute 2 in brain tissue. Biosens Bioelectron 39: 220-225.

116. Rajesh, Sharma V, Tanwar VK, Mishra SK, Biradar AM (2010) Electrochemical impedance immunosensor for the detection of cardiac biomarker Myogobin (Mb) in aqueous solution. Thin Solid Films 519: 1167-1170.

117. Barton AC, Davis F, Higson SP (2008) Labeless immunosensor assay for prostate specific antigen with picogram per milliliter limits of detection based upon an ac impedance protocol. Anal Chem 80: 6198-6205.

118. Ahmed A, Rushworth JV, Wright JD, Millner PA (2013) Novel impedimetric immunosensor for detection of pathogenic bacteria *Streptococcus pyogenes* in human saliva. Anal Chem 85: 12118-12125.

119. Wang L, Kang B, Gao N, Du X, Jia L, et al. (2014) Corrosion behaviour of austenitic stainless steel as a function of methanol concentration for direct methanol fuel cell bipolar plate. Journal of Power Sources 253: 332-341.

120. Salehisaki M, Aryana M (2014) Effect of microstructure on corrosion behavior of Ag-30Cu-27Sn alloy in vitro media. Applied Surface Science 297: 205-212.

121. Hmamou DB, Salghi R, Zarrouk A, Hammouti B, Benali O, et al. (2013) Studies on the inhibitive effect of potassium ferrocyanide on the corrosion of steel in phosphoric acid. Research on Chemical Intermediates 39: 3475-3485.

122. Montalvillo M, Silva V, Palacio L, Calvo JI, Carmona FJ, et al. (2014) Charge

Citation: Santos A, Davis JJ, Bueno PR (2014) Fundamentals and Applications of Impedimetric and Redox Capacitive Biosensors. J Anal Bioanal Tech S7: 016. doi:10.4172/2155-9872.S7-016

and dielectric characterization of nanofiltration membranes by impedance spectroscopy. Journal of Membrane Science 454: 163-173.

123. Noack J, Cremers C, Bayer D, Tübke J, Pinkwart K (2014) Development and characterization of a 280 cm^2 vanadium/oxygen fuel cell. Journal of Power Sources 253: 397-403.

124. Nguyen S, Lim JC, Lee JK (2014) Improving the performance of silicon anode in lithium-ion batteries by Cu_2O coating layer. Journal of Applied Electrochemistry 44: 353-360.

125. Antunes R, Jewulski J, Golec T (2013) Full Parametric Characterization of LSM/LSM-YSZ Cathodes by Electrochemical Impedance Spectroscopy. J Fuel Cell Sci Technol 11: 011007-011007.

126. Daniels JS, Pourmand N (2007) Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges. Electroanalysis 19: 1239-1257.

127. K'Owino IO, Sadik OA (2005) Impedance Spectroscopy: A Powerful Tool for Rapid Biomolecular Screening and Cell Culture Monitoring. Electroanalysis 17: 2101-2113.

128. Berggren C, Bjarnason B, Johansson G (2001) Capacitive Biosensors. Electroanalysis 13: 173-180.

129. Lisdat F, Schäfer D (2008) The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. Anal Bioanal Chem 391: 1555-1567.

130. Macdonald JR (2003) Impedance spectroscopy. In Encyclopedia of Physical Science and Technology. 3rd edition. Meyers, Academic Press, New York, 703-715.

131. Esteban JM, Orazem ME (1991) On the application of the Kramers-Kronig relations to evaluate the consistency of electrochemical impedance data. Journal of The Electrochemical Society 138: 67-76.

132. Bard AJ, Faulkner LR (2001) Electrochemical methods: fundamentals and applications, 2nd edition, John Wiley & Sons, Inc.

133. Bueno PR, Benites TA, Góes MS, Davis JJ (2013) A facile measurement of heterogeneous electron transfer kinetics. Anal Chem 85: 10920-10926.

134. Qureshi A, Gurbuz Y, Niazi JH (2010) Label-free detection of cardiac biomarker using aptamer based capacitive biosensor. Procedia Engineering 5: 828-830.

135. Bueno PR, Gabrielli C (2009) Electrochemistry, Nanomaterials and Nanostructures. In: Nanostructured Materials for Electrochemical Energy Production and Storage, Springer, New York, 81-149.

136. Chang BY, Park SM (2010) Electrochemical impedance spectroscopy. Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif) 3: 207-229.

137. Góes MS, Rahman H, Ryall J, Davis JJ, Bueno PR (2012) A dielectric model of self-assembled monolayer interfaces by capacitive spectroscopy. Langmuir 28: 9689-9699.

138. Johnson A, Song Q, Ko Ferrigno P, Bueno PR, Davis JJ (2012) Sensitive affimer and antibody based impedimetric label-free assays for C-reactive protein. Anal Chem 84: 6553-6560.

139. Su L, Zou L, Fong CC, Wong WL, Wei F, et al. (2013) Detection of cancer biomarkers by piezoelectric biosensor using PZT ceramic resonator as the transducer. Biosens Bioelectron 46: 155-161.

140. Wang H, Zhang Y, Yu H, Wu D, Ma H, et al. (2013) Label-free electrochemical immunosensor for prostate-specific antigen based on silver hybridized mesoporous silica nanoparticles. Analytical Biochemistry 434: 123-127.

141. Chiriacò MS, Primiceri E, Montanaro A, de Feo F, Leone L, et al. (2013) On-chip screening for prostate cancer: an EIS microfluidic platform for contemporary detection of free and total PSA. Analyst 138: 5404-5410.

142. Xu H, Gorgy K, Gondran C, Le Goff A, Spinelli N, et al. (2013) Label-free impedimetric thrombin sensor based on poly(pyrrole-nitrilotriacetic acid)-aptamer film. Biosens Bioelectron 41: 90-95.

143. Ocaña C, del Valle M (2014) Signal amplification for thrombin impedimetric aptasensor: sandwich protocol and use of gold-streptavidin nanoparticles. Biosens Bioelectron 54: 408-414.

144. Gratchev A, Sobenin I, Orekhov A, Kzhyshkowska J (2012) Monocytes as a diagnostic marker of cardiovascular diseases. Immunobiology 217: 476-482.

145. Arya SK, Chornokur G, Venugopal M, Bhansali S (2010) Antibody functionalized interdigitated micro-electrode (IDmicroE) based impedimetric cortisol biosensor. Analyst 135: 1941-1946.

146. Varshney M, Li Y (2009) Interdigitated array microelectrodes based impedance biosensors for detection of bacterial cells. Biosens Bioelectron 24: 2951-2960.

147. Xu D, Xu D, Yu X, Liu Z, He W, et al. (2005) Label-free electrochemical detection for aptamer-based array electrodes. Anal Chem 77: 5107-5113.

148. Tkac J, Davis JJ (2009) Label-free Field Effect Protein Sensing. In: Engineering the Bioelectronic Interface: Applications to Analyte Biosensing and Protein Detection, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 193-224.

149. Radi AE, Acero Sánchez JL, Baldrich E, O'Sullivan CK (2005) Reusable impedimetric aptasensor. Anal Chem 77: 6320-6323.

150. Berggren C, Johansson G (1997) Capacitance measurements of antibody-antigen interactions in a flow system. Anal Chem 69: 3651-3657.

151. Limbut W, Kanatharana P, Mattiasson B, Asawatreratanakul P, Thavarungkul P (2006) A comparative study of capacitive immunosensors based on self-assembled monolayers formed from thiourea, thioctic acid, and 3-mercaptopropionic acid. Biosens Bioelectron 22: 233-240.

152. Limbut W, Kanatharana P, Mattiasson B, Asawatreratanakul P, Thavarungkul P (2006) A reusable capacitive immunosensor for carcinoembryonic antigen (CEA) detection using thiourea modified gold electrode. Analytica Chimica Acta 561: 55-61.

153. Dijksma M, Kamp B, Hoogvliet JC, van Bennekom WP (2001) Development of an electrochemical immunosensor for direct detection of interferon-gamma at the attomolar level. Anal Chem 73: 901-907.

154. Lin KC, Kunduru V, Bothara M, Rege K, Prasad S, et al. (2010) Biogenic nanoporous silica-based sensor for enhanced electrochemical detection of cardiovascular biomarkers proteins. Biosens Bioelectron 25: 2336-2342.

155. Büttiker M, Thomas A, Prêtre A (1993) Mesoscopic capacitors. Phys Lett A 180: 364-369.

156. Bueno PR, Davis JJ (2014) Measuring quantum capacitance in energetically addressable molecular layers. Anal Chem 86: 1337-1341.

157. Bueno PR, Davis, JJ (2014) Elucidating redox level dispersion and local dielectric effects within electroactive molecular films. Anal Chem 86: 1977-2004.

158. Bueno PR, Mizzon G, Davis JJ (2012) Capacitance spectroscopy: a versatile approach to resolving the redox density of states and kinetics in redox-active self-assembled monolayers. J Phys Chem B 116: 8822-8829.

159. Bueno PR, Fabregat-Santiago F, Davis JJ (2013) Elucidating capacitance and resistance terms in confined electroactive molecular layers. Anal Chem 85: 411-417.

160. Lin J, Merzlyakov M, Hristova K, Searson PC (2008) Impedance spectroscopy of bilayer membranes on single crystal silicon. Biointerphases 3: FA33.

161. Lin J, Szymanski J, Searson PC, Hristova K (2010) Electrically addressable, biologically relevant surface-supported bilayers. Langmuir 26: 12054-12059.

162. Romaner L, Heimel G, Ambrosch-Draxl C, Zojer E (2008) The Dielectric Constant of Self-Assembled Monolayers. Adv Funct Mater 18: 3999-4006.

163. Sondag-Huethorst JAM, Fokkink LGJ (1995) Electrochemical Characterization of Functionalized Alkanethiol Monolayers on Gold. Langmuir 11: 2237-2241.

Citation: Santos A, Davis JJ, Bueno PR (2014) Fundamentals and Applications of Impedimetric and Redox Capacitive Biosensors. J Anal Bioanal Tech S7: 016. doi:10.4172/2155-9872.S7-016

This article was originally published in a special issue, **Biosensing** handled by Editor. Dr. Dr. Michael J. Serpe, University of Alberta, Canada

Electrochimica Acta 182 (2015) 946–952

Contents lists available at ScienceDirect

Electrochimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/electacta

Sensitive label-free electron chemical capacitive signal transduction for D-dimer electroanalysis

Simone M. Marques[a,1], Adriano Santos[a,1], Luís M. Gonçalves[b,c,d], João C. Sousa[c,d], Paulo R. Bueno[a,*]

[a] Institute of Chemisry, São Paulo State University, Nanobionics Research Group (www.nanobionics.pro.br), Univ. Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, São Paulo, Brazil
[b] Requimte, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal
[c] Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Health Sciences, University of Minho, Braga, Portugal
[d] ICVS/3B's—PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:
Received 2 September 2015
Accepted 30 September 2015
Available online 9 October 2015

Keywords:
Biosensor
D-dimer
Electroanalysis
Electrochemical Capacitance
Pulmonary embolism
Self-assembled monolayer

ABSTRACT

D-dimer, an important biomarker in emergency medicine, was determined by applying a label-free electrochemical capacitive approach with an antibody-based selective biosensor consisting of an electroactive self-assembled monolayer mounted on a commercially available gold electrode. Electrochemical measurements were performed by an impedance-derived approach (based on observing the complex capacitance diagrams from where electrochemical capacitance can be obtained as transducer signal) from which it was possible to obtain low limits of detection of 50 fmol L^{-1} in buffer (PBS) and 7 pmol L^{-1} in undiluted human serum (performed without any kind of sample pre-treatment), with good coefficient of determination ($r^2 \geq 0.99$) in a clinically relevant D-dimer concentration range (from 1 to 1,000 ng mL^{-1}). These electro analytical/chemistry results pave the way to the creation of low-cost and reliable point-of-care electrochemical approach for the quantitative bedside determination of D-dimer in clinical samples, thus speeding up the diagnosis of potentially lethal, nonetheless treatable, clinical conditions like pulmonary embolism.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

D-dimer (DD) is a general term to describe heterogeneous fibrin degradation products present in blood. Circulating DD values are raised in various clinical conditions although, in general, an elevated DD value indicates some type of thrombosis. DD have been used in the past decades to help doctors in the assessment of patients. It has had particular relevance on the management of venous thromboembolism (VTE), particularly pulmonary embolism (PE). PE is a potentially acute life threating pathology of difficult diagnosis [1], and it is still a relevant cause of unexpected in-hospital deaths [2]. Therefore any portable and quick ways of DD determination are welcomed by clinicians and would make it possible to have a result available in emergency medical vehicles, potentially saving lives [3]. Moreover, the clinical application of DD appears to be spreading to other medical entities beyond PE in the near future [4,5], including terrible events like disseminated intravascular coagulation and aortic aneurism [3], conditions where its early diagnosis and management are absolutely critical for a successful outcome. Furthermore, many studies point to its use as a prognostic indicator as well [6,7].

DD analysis in hospitals laboratories has walked a long path since its introduction in the late 1980s [8]. Initially, DD assays were performed with latex beads coated with anti-DD antibodies and required human visual reading of the agglutination magnitude [9]. Then, by means of several technological advances, automatic Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA) became the most common analytical way of measuring DD [8]. ELISA-based analytical methodologies for DD are indeed quite sensitive and reliable (Limit of detection [10] of 45 μg L^{-1}), but on the other hand they can be time-consuming and cannot be performed as a bedside assay. Nowadays, the combination of antibody-based sensors (immunosensors) with electrochemical detection has proven to be a successful strategy in the development of a novel generation of DD biosensors [11]. The use of antibodies in biosensors greatly increases their selectivity because they have a specific interaction

* Corresponding author at: IQ–UNESP, CP 355, CEP 14800–900 Araraquara, São Paulo, Brasil. Tel. +55 1633019642; fax: +55 1633222308.
E-mail address: prbueno@iq.unesp.br (P.R. Bueno).
[1] Simone M. Marques and Adriano Santos contributed equally to the development of this manuscript.

http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2015.09.169
0013-4686/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

with the aimed analyte, and this biorecognition process has had an impact of utter importance in biosensing applications. Moreover, electrochemical approaches have several advantages over other analytical techniques such as sensitivity, simplicity and the possibility of miniaturization which makes it possible to develop analytical point-of-care devices. Some electroanalytical methodologies for DD determination can be found in literature with low limits of detection (LOD), examples (LODs in parentheses) include approaches designed using cyclic voltammetry (20 $\mu g\,L^{-1}$) [12], amperometry (25 $\mu g\,L^{-1}$) [13] and impedimetric (0.5 $\mu g\,L^{-1}$) [14] immunosensor.

Recently, it has been introduced a new label-free electrochemical approach to detect relevant biomarkers with high sensibility. This approach is based on the use of an electrochemical capacitance signal, referred by us as redox capacitance (C_r) [15,16]. Fundamentally the approach is based on the ability of a redox tethered monolayer in store charge when a certain electrical potential is applied. Studies have shown that C_r is very sensitive of environmental changes [17] and antibody-antigen coupling [15,16,18], which is ideal for biosensing applications, mainly those related to bedside applications since there is no need of adding any redox probe in solution previously to the electroanalysis, avoiding the introduction of chemical interferences or chemical species on the patient samples.

In terms of transducer signal, electrochemical or redox capacitance, C_r, is a capacitance related to the faradaic processes operating between the redox active monolayer and the metallic probe (current collector, i.e. the working electrode). In physical chemistry terms C_r contains information on both electrostatic and electronic structure contributions for the energy storage process involved with the redox couple contained in the molecular layer self-assembled over the current collector [19]. By using densify functional theory concepts (see support information of reference [19]) it was demonstrated that C_r is constituted of a series contribution of electrostatic and quantum capacitive components, i.e.

$$\frac{1}{C_r} = \frac{1}{C_e} + \frac{1}{C_q} \tag{1}$$

where C_e is the electrostatic capacitance and C_q is the quantum capacitance, which in its turns, is defined as

$$\frac{1}{C_q} = \frac{1}{e^2}\left[\frac{1}{g_r(\mu)} + \frac{1}{g_l(\mu)}\right] \tag{2}$$

where $g_r(\mu)$ and $g_l(\mu)$ are density of states functions (right) and (left) [20], respectively, representing the density of states of two different chemical systems when electrons are separated from one to another due to the existence of an externally imposed potential difference, where $\mu = eV$ is the chemical potential of the electrons directly related to the potential difference, but stated in terms of energy per electron. Note that for two metallic probes both density of states [in Eqn. (2)] are huge and so that the contribution of C_q to C_r [in Eqn. (2)] is null in a way that $C_r \sim C_e$ and there is obviously no quantum contribution to the electrochemical capacitance.

On the other hand, in the particular situation where one plate is the metallic working electrode with a density of states $g_l(\mu)$ and the other "plate" is an electroactive molecular layer self-assembled over the metallic working electrode with a density of states $g_r(\mu)$, it is easy to observe that $g_l(\mu) \gg g_r(\mu)$ and thus Eqn. (2) reduces to $C_q = e^2 g_r(\mu)$. Assuming now that the variation of C_e with the electrochemical energy (μ) of the electrode is minimal, thus the redox capacitance is directly proportional to the redox density of state of the molecular redox layer self-assembled over the working electrode and thus

$$C_r \propto e^2 g_r(\mu) \tag{3}$$

Indeed, experimentally [17,20,21] it is observed that $g_r(\mu)$ has a Gaussian shape as a function of μ, i.e. as a function of the potential or energy of the working electrode. From an electroanalytical point of view what can be observed is that C_r constitutes a very sensible and useful electronic transducer signal [15,16,18,22–24]. The sensitivity is obviously high because it can be sensible to any changes on the electronic structure (consequently sensible to any kind of chemical interaction) of the molecular layer interface, being it electrostatic or yet only based on changes on the electronic states of the attached molecule constituting the receptive interface of a given biosensing device.

Therefore, in terms of biosensing interface, it is possible to design bi-functional molecular layer comprised, for instance, of a self-assembled monolayer (SAM) containing two different thiols (see schematic representation in Fig. 2), i.e. one functioning as electrochemical transduction signal (a redox tethered end group thiol) and another one functioning as the chemical coupling or site of the recognition biological element to detect specific and relevant biomarkers. The impedance signal associated with this molecular engineered interface can be described by an equivalent circuit containing two parallel branches (Fig. 1a); faradaic (involved with electron transfer itself) and non-faradaic (involved

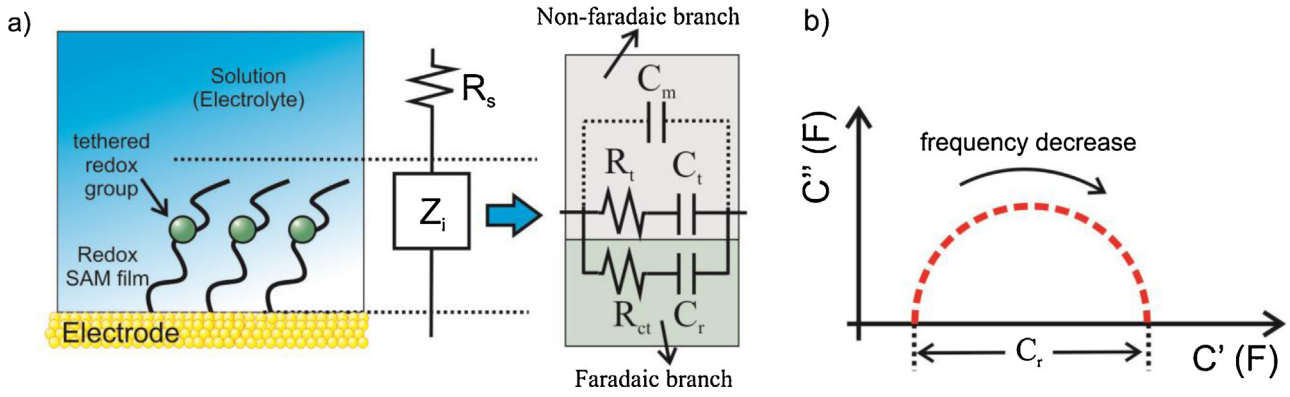


Fig. 1. (a) Schematic representation of the interfacial impedance of the receptive interfaces used in redox capacitive biosensing. Note that the SAM contains a tethered redox probe. The equivalent circuit can be described by a resistance of the solution (R_S) in series with an impedance element Z_i. The latter impedimetric term is comprised by a non-faradaic branch (associated with dipolar relaxation and ion ingress) and a faradaic branch (exclusively related to electron transfer between electrode and redox group). The faradaic branch is composed by the redox capacitance (C_r) and a charge transfer resistance (R_{ct}). It is important to note that faradaic and non-faradaic contributions can be separated by ECS. (b) A representative Nyquist capacitance plot for the equivalent circuit shown in (a) where $C_r \gg C_t \gg C_m$. In such condition, capacitance response is ultimately due C_r which can be extract by approximation of the diameter of the semicircle [18].

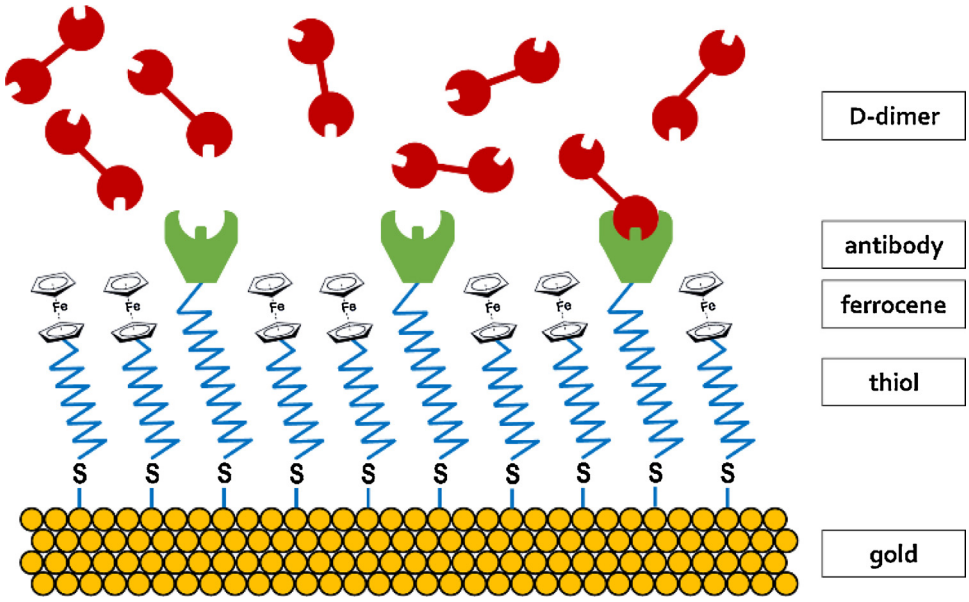


Fig. 2. Conceptual representation of the biosensor's SAM composition and analyte recognition. Alkanes link to the electrode's gold surface through sulphur atoms, whereas antibody attachment occurs at the carboxylic acid moiety of 16-mercaptohexadecanoic acid. An analytical signal is obtained upon interaction of DD molecules in solution with antibodies, which alters the charge transfer between ferrocene [from 11-(ferrocenyl)-undecanethiol] and gold (molecules not drawn to scale).

with dielectric capacitance of the SAM and additionally to the ionic dipolar relaxation contained on it). Depending on the applied potential, the electrochemical behavior of the redox active SAM can be modeled by the non-faradaic circuit only or by both. For instance, in potentials out of the redox activity of the probe (named redox out potential), only contributions related to the non-faradaic branch is observed/measured. The non-faradaic equivalent circuit branch is composed by a parallel combination of a capacitor (C_m) in series with capacitive (C_t) and resistive (R_t) terms, physical-chemically representing the ionic ingress (in the monolayer) that generates an ideal dipole relaxation contributions (i.e. a Debye-type relaxation), as described elsewhere [25]. However, if the energy perturbation is able to promote a redox (electrochemical) activity (redox in potential, where the maximum occurs at the half-wave or formal potential of the redox layer) thus the faradaic contribution either shown in terms of equivalent circuit in Fig. 1a must be considered.

In terms of equivalent circuit, the faradaic branch is composed by a series combination of a resistor (R_{ct}) and capacitor (C_r), which is related to loss and storage of energy, respectively, in the faradaic process. Experimentally, C_r is obtained by an electrochemical capacitance spectroscopy (ECS) approach [21,23], which consist in converting complex impedance into complex capacitance representation. C_r is thus easily obtained approximately by the value of the semicircle (and more precisely by its diameter) in the capacitive Nyquist plot as theoretically illustrated in Fig. 1b and experimentally in Fig. 3b.

In this paper, we described the first application of a label-free redox capacitive assay for DD determination, both in buffer (PBS) and neat human serum. This approach demonstrated to be high sensitive and able to detect DD in low concentrations (femtomolar and picomolar), useful for clinical applications. The proposed DD biosensor is based on a bifunctional electroactive self-assembled monolayer (SAM) architecture using two thiol-bearing molecules, a 11-carbon atoms long alkane with ferrocene attached to one end (the electroactive probe) and a 16-carbon carboxylic acid to which antibodies are covalently linked (the anchoring species) as schematized in Fig. 2.

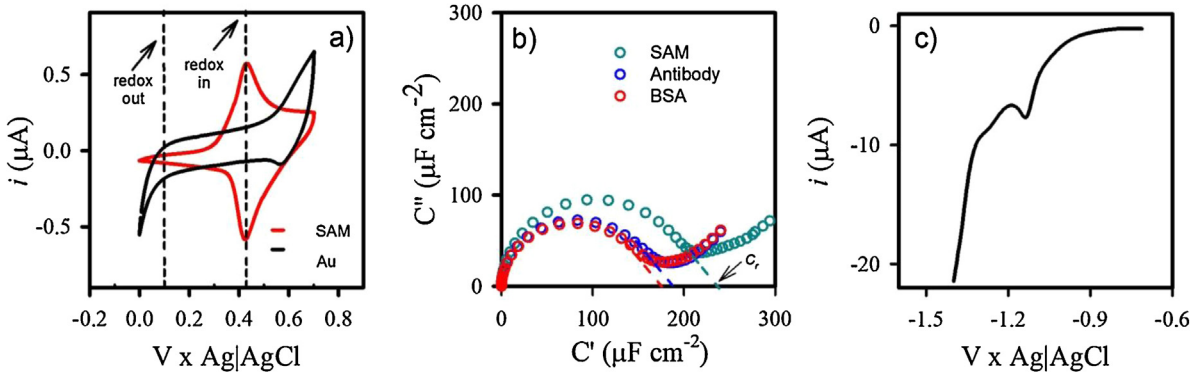


Fig. 3. (a) Cyclic voltammogram obtained for cleaned gold electrode (in black) and after bifunctional SAM formation (in red). Note the presence of redox peaks which there are inexistent in bare Au electrode. The dashed lines represents the redox out (0.1 V × Ag|AgCl) and redox in (0.42 V × Ag|AgCl) potentials. CV obtained in 20 mmol L^{-1} of TBA-ClO_4 in potential ranging from 0-0.7 V, sweep rate 0.1 V s^{-1}. (b) Nyquist diagram obtained at E_{in} for SAM formation, antibody immobilization and BSA blocking. C_r can be easily obtained from the diameter semicircle. (c) Cyclic voltammogram (1st cycle) for bifunctional SAM desorption process (KOH 500 mmol L^{-1} potential cycled from −0.7 to −1.4 V × Ag|AgCl, sweep rate 100 mV s^{-1}).

2. Experimental

2.1. Reagents

All chemicals and biochemicals were purchased from Sigma-Aldrich except H_2SO_4 which was obtained from Hexis Scientific, and were used without further purification. Solutions of mouse-produced monoclonal anti-fibrinogen antibody 8.2 μg mL^{-1} and bovine serum albumin (BSA) 0.1% (m/v) were either diluted or prepared in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 with the following composition: NaCl, 137 mmol L^{-1}; KCl, 2.7 mmol L^{-1}; $Na_2HPO_4{\cdot}12H_2O$, 10 mmol L^{-1}; KH_2PO_4, 1.8 mmol L^{-1}. Human plasma DD antigen 1-1,000 ng mL^{-1} was diluted either in PBS pH 7.4 or neat human serum. Solutions of NaOH, 500 mmol L^{-1}; KOH, 500 mmol L^{-1} and H_2SO_4, 500 mmol L^{-1} were prepared in Milli-Q water (Simplicity UV ultrapure water system from Millipore with 18.2 MΩ cm at 25 °C). Mixture solutions of 16-mercaptohexadecanoic acid (16-MHDA) 0.2 mmol L^{-1} and 11-(ferrocenyl)-undecanethiol (11-F-UDT) 2 mmol L^{-1} were prepared in anhydrous ethanol. Mixture solutions of *N*-(3-dimethylamino-propyl)-*N*'-ethylcarbodiimide (EDC) 200 mmol L^{-1} and *N*-Hydroxysuccinimide (NHS) 50 mmol L^{-1} were prepared in Milli-Q water. Solutions of tetrabutylammonium perchlorate (TBA-ClO_4) 20 mmol L^{-1} were prepared in a mixture of acetonitrile:Milli-Q water (20:80).

2.2. Electrochemical measurements

All experiments were made at room temperature (25 °C). Cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) measurements were performed using an AUTOLAB potentiostat model PGSTAT302N equipped with a frequency response analysis (FRA) module and the NOVA software from Metrohm. A three-electrode system was used, including the biosensor as working electrode, a platinum mesh as counter electrode and a homemade Ag|AgCl (saturated KCl solution). The DD biosensor was assembled onto a polyether ether ketone (peek) electrode with a 2 mm-diameter polycrystalline gold disk tip (code 6.1204.140) from Metrohm.

2.3. Surface characterization and Biosensor design

The biosensor setup involved three major steps which include gold surface preparation, bifunctional SAM formation (i.e. designed SAM for antibody attachment and signal transduction) and antibody attachment. By its turn, surface preparation consisted of another three steps. First, the electrodes were mechanically polished by using 1.0, 0.3 and 0.05 μm grain-sized aluminium oxide aqueous suspensions followed by sonication in deionized water for 5 minutes to remove adhered particles. After, a CV electrochemical desorption step was performed (NaOH 500 mmol L^{-1}, from −0.7 to −1.7 V, 300 cycles, 100 mV s^{-1}). Next, electrodes were immersed in stirred anhydrous ethanol for 20 minutes to reduce gold oxide [26]. Finally, a CV electrochemical cleaning step was performed (H_2SO_4 500 mmol L^{-1}, from −0.2 to 1.5 V, 25 cycles, 100 mV s^{-1}). Electroactive areas were calculated on the basis of cyclic voltammograms from the electrochemical cleaning step by integrating the cathodic peak (details in the Appendix A). The area was used to normalize the capacitance signal.

For bi-functional SAM formation, polished working gold electrodes were immersed in a mixture of 16-MHDA (for antibody attachment) and 11-F-UDT (signal transduction) for 16 hours at 25 °C. After this step, CV was performed (TBA-ClO_4 20 mmol L^{-1}, from 0.0 to 0.7 V, 3 cycles, 100 mV s^{-1}) to obtain the redox in potential ($E_{in} = (E_{ox} + E_{red})/2$, where $E_{ox}$and E_{red} are oxidation and reduction potentials, respectively) and 11-F-UDT surface coverage by anodic peak integration (see appendix for details). Lastly, previously to anti-DD antibody attachment, activation of carboxyl groups from 16-MHDA was achieved by immersing SAM-bearing electrodes into a mixture containing EDC/NHS for 30 minutes, and then electrodes were immersed in the antibody solution (8.2 μg mL^{-1}) for 1 hour. Electrodes were subsequently immersed in BSA 0.1% for 30 minutes to block non-specific sites.

DD quantitation and control analyses were accomplished by electrochemical impedance spectroscopy (EIS) using TBA-ClO_4 as supporting electrolyte, modulation frequency varied in 60 steps from 0.01 to 100,000 Hz, peak-to-peak amplitude 10 mV, at E_{in} and E_{out} potentials experimentally obtained. All measurements were performed in triplicate. The capacitance analysis was done by obtaining $C^*(\omega)$ by means of impedance $Z^*(\omega)$ using the relationship $C^*(\omega) = 1/i\omega Z^*(\omega)$, in which ω is the angular frequency and $i = \sqrt{-1}$ [21]. The asterisk accounts for complex functions. Practically, the real (C') and imaginary (C'') parts of the complex capacitive function can be directly obtained as a function of real and imaginary terms obtained from the measured complex impedance as $C'(\omega) = Z''\phi$ and $C''(\omega) = Z'\phi$, noting that $\phi = 1/\omega|Z|^2$, where $|Z|$ accounts for the modulus of the impedance function [21].

Calibration curves were constructed by measuring DD standard solutions from 1 to 1,000 ng mL^{-1} (five experimental points) in either PBS pH 7.4 or neat human serum. The biosensor was incubated with 50 μL of DD standards for 20 minutes prior to measurements. Blank was pure PBS buffer or neat human serum. Negative control analyses, to verify the selectivity of the biosensor response towards DD, were performed by replacing DD standard with fetuin-A 1,000 ng mL^{-1} in PBS pH 7.4. The transduction signal (S) was calculated using the inverse of capacitance, $S = 1/C_{r[DD]} - 1/C_{r[blank]}$, where $C_{r[DD]}$ is the redox capacitance signal (normalized per area) obtained in a certain DD concentration and $C_{r[blank]}$ is the response of redox capacitance (normalized per area) with no target in solution (PBS or neat serum without DD). The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated following IUPAC procedures as three times and ten times the standard deviation of the blank, respectively [27].

CV electrochemical desorption step was performed (KOH 500 mmol L^{-1}, potential cycled from -0.7 to -1.4 V *versus* Ag|AgCl reference electrode, 15 cycles, sweep rate of 100 mV s^{-1}) to obtain the bi-functional SAM surface coverage (see Appendix B for details).

3. Results and Discussion

Herein, signal transduction is based on electrochemical capacitance, as theoretically defined in the introduction section, sometimes empirically referred as pseudo-capacitance [28] in the electrochemistry literature. Indeed the transducer capacitive signal is measured based on an impedance-derived approach named as electrochemical capacitance spectroscopy (ECS) from where electrochemical capacitance, named in the electroactive monolayer context as redox capacitance (C_r), serve as the sensor signal [15,16,18,21,24,25,29]. C_r is a measure of the extension of the reversible charging/discharging of organic films due to charge exchange (electrochemical coupling) between a redox probe tethered to the film and the metallic electrode surface. Alterations in the probe's environment, per example by antigen-antibody binding, affect the monolayer electrochemical energy storage features, and thus $C_r$values.

Electron active SAM functionalization steps were evaluated by CV (Fig. 3a) and electrochemical impedance spectroscopy (at E_{in} = 0.42 V, see Appendix B) which in turn was converted to

complex capacitance, where by using ECS approches C_r is generally easily obtained [16,21,24] from the value of the semicircle diameter of the complex capacitive Nyquist diagrams, as shown in Fig. 3b.

Fig. 3a shows CVs performed before and after redox-active SAM formation onto cleaned gold electrode. From these results, it is possible to verify/control the SAM formation due the presence of redox peaks, absent in CV for bare Au. In addition, a reversible process ($ip_a/ip_c \approx 1$, where ip_a and ip_c are anodic and cathodic peak current, respectively; and $\Delta E = E_{ox} - E_{red} \sim 5$ mV) is observed. From integration of anodic peak (details in Appendix B), the 11-F-UDT surface coverage ($\Gamma_{11\text{-}F\text{-}UDT}$) is of $(2.7 \pm 0.2) \times 10^{-10}$ mol cm^{-2}. From reduction peak (cathodic peak) presented in Fig. 3c (details in Appendix B) carried out in basic solution (KOH 500 mmol L^{-1}), it was obtained a surface coverage for SAM (Γ_{SAM}) of (5.1 ± 0.4) x 10^{-10} mol cm^{-2}, value found in the same order of magnitude of surface coverage of SAM on gold electrode reported in literature (Γ_{SAM} of 7.5×10^{-10} mol cm^{-2}) [30].

From capacitance analysis of SAM ($C_r \sim 210\,\mu F\ cm^{-2}$) it demonstrates a decrease in C_r (from 210 to 180 μF cm^{-2}) as a consequence of environment perturbation around ferrocenyl groups caused by antibody attachment. Upon addition of bovine serum albumin (BSA), to block non-specific sites on the surface, a slightly decrease in C_r, to $\sim 170\,\mu F\ cm^{-2}$ is still observed. Altogether, these results demonstrate that proper SAM modification was achieved.

On the other hand, from spectroscopic impedance analysis, it is not possible to extract or obtain any information of the biosensor carried out for different DD concentrations (Fig. 4a) at E_{in} of 0.42 V. Nonetheless, when complex impedance data is converted to complex capacitance domain resulting in a complex capacitive (spectrum) plane (for instance, observed Nyquist capacitive diagram shown in Fig. 4b) it is thus possible to observe the changes caused on the surface mainly by observing as redox capacitance term changes as a function of DD-concentration (Fig. 4b). As previously discussed, ferrocene-gold electron transfer and capacitive charging is altered by DD-antibody interaction. The capacitance response decreased with increasing DD presence, which permitted to infer a linear correlation that could be used for analytical purposes. Furthermore, the capacitance signal is only sensitive to changes on target concentration at E_{in} potential, as shown in Fig. 4c-d. From the Bode plots, it is possible to infer that both real (Fig. 4c) and imaginary parts of capacitance (Fig. 4d) do not respond in potentials out of the faradaic activity, named as redox out potential (E_{out} of 0.1 V), but only respond/change as function of target concentration at E_{in} potential, as expected, since as demonstrated in the introduction section, this corresponds to the potential or energy of the electrode where the faradaic capacitive event takes place (with maximum activity).

The analytical figures of merit were obtained by a calibration curve of standards prepared in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4, in triplicate in a concentration range from 1 to 1,000 ng mL^{-1} (Fig. 5a).

A good coefficient of determination of the linear regression was verified ($r^2 \geq 0.993$) by fitting the signal transduction S (details in

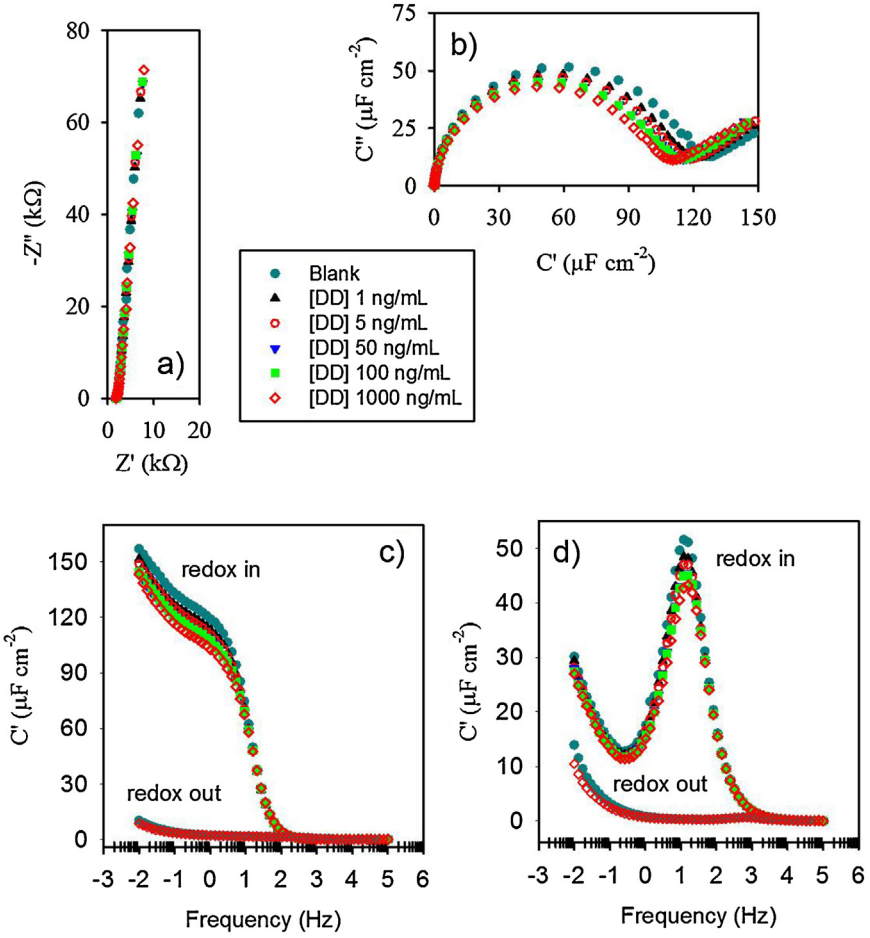


Fig. 4. a) Impedance Nyquist plot obtained in different DD concentrations at E_{in}. b) The data show in (a) can be converted to a complex capacitive diagram in which it is possible to observe changes in C_r (semicircle diameter) as a function of DD concentrations. The real (c) and imaginary part of capacitance (d) are unresponsive at redox out potential (E_{out}), but respond sensitively as a function of DD concentrations at redox in potential (E_{in}).

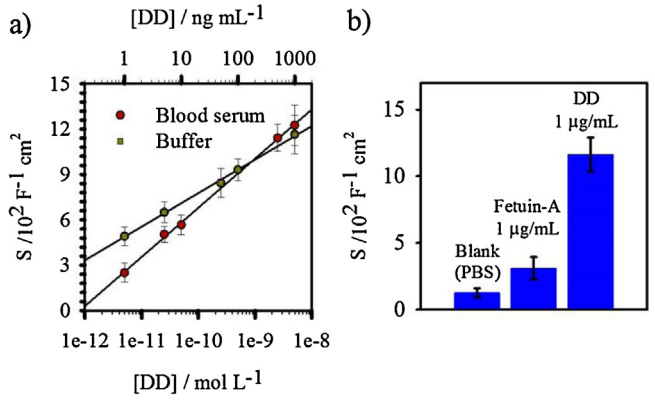


Fig. 5. a) Analytical capacitance curves reporting the inverse of the redox capacitance (signal transduction, *S*) for DD determination in a concentration range from 1 to 1,000 ng mL^{-1} (upper scale) and the corresponding values in molarity (lower scale) obtained both in PBS and neat serum. Plotted data points represent means and standard deviations. b) Selectivity assessment. Redox capacitive signal of D-dimer (DD)-responsive interfaces, in presence of fetuin-A, a nonspecific protein, and the specific target DD, both at a concentration of 1,000 ng mL^{-1}.

the Section 2.3) *versus* the logarithm of DD concentration (Fig. 5a). Very low limits of detection (LOD = 10 ng L^{-1}, same as 52 fmol L^{-1}) and quantitation (LOQ = 130 ng L^{-1}, same as 648 fmol L^{-1}) were obtained (unit conversion from mass *per* litre to molar was done considering a DD molecular weight of 200 kDa [31]), with a relative standard deviation (*RSD*) of 11%. Negative control analyses, to verify the selectivity of the biosensor response towards DD, were performed by replacing DD standard with fetuin-A 1,000 ng mL^{-1} in PBS pH 7.4, as illustrated by Fig. 5b. By exposing the functionalised SAM surface to fetuin-A, a ~ 48 kDa-blood protein which presents several roles in human physiology [32], a significantly different response, when compared with that obtained with DD, was verified. Indeed, *p-value* (α of 0.05) is much lower than α, *p* of 0.0004, which demonstrates/confirms that the average signal obtained for DD statistically differ to those of average signal obtained for fetuin-A at the same concentration (so that validates the analytical response) in a confidence interval of 95%.

As a proof-of-principle, the biosensor was tested in commercial neat human serum (Fig. 5a). In this case, a good coefficient of determination was also found ($r^2 \geq 0.999$) with LOD and LOQ in the picomolar range (7 and 21 pmol L^{-1}, same as 1.4 µg L^{-1} and 4.6 µg L^{-1}, respectively) and *RSD* of 14%. The increase in LOD, LOQ and RSD when compared with the data obtained in PBS are related to biological matrix effects, since this was performed without any kind of sample preparation on the human serum. Nevertheless, the LOD represents better value when compared with others electroanalytical methodologies such as amperometry (25 µg L^{-1}) [13] and/or cyclic voltammetry (20 µg L^{-1}) [12], for example (see Table 1 for details on comparisons between different methods). Table 1 demonstrates that the introduced capacitive biosensor is potentially useful to quantify DD in clinical samples.

Indeed, the DD concentration cut-off used in a presumptive PE situation in medicine follows, to a certain extent, the 'thumb rule': age × 10 ng mL^{-1} (e.g. the cut-off for a 65 year old is ~ 650 ng mL^{-1}) [34]. Thus, the studied linear range, 1 to 1,000 ng mL^{-1}, has a valid application for all ages in terms of PE diagnostic. For acute aortic dissection the cut-off has been recently suggested [35] to be 500 ng mL^{-1}. Literature cut-off values for strokes significantly vary and also depend if one talks about acute or chronic ischemia but, in general, values range [4] from 100 to 1,000 ng mL^{-1}. Nevertheless, taking into account all the new studies that point to new diagnostic roles, the low LODs here obtained can be important to make the use of DD significant in other pathologies where it still is not commonly used. Modern medicine is constantly looking for reliable biomarkers of several pathologies, particularly those that are significant and hard to diagnose. The use of DD in the daily hospital routine is handicapped by its mixed value when it is positive, however, its negative predictive value is generally undisputed as meaningful. Quite possibly, DD values have diminished application because of the still time and cost consuming way that they are determined. Perhaps, if they were quantified in a manner as simple as presently glucose is quantified the situation might differ. A recent study showed that, as expected, the DD values are elevated in the post-operative period, however they were also able to show that such rise could be predicted according to the type of surgery (in that case: type I: not entering abdominal cavity −300 ng mL^{-1}; type II: intra-abdominal −1500 ng mL^{-1}; type III: retroperitoneal/liver surgery −4000 ng mL^{-1}), and they even showed how long these values would take to normalize [36]. This raises the question if DD values could not be used to alter the dose of prophylactic therapy of clotting events, which is typical performed using anticoagulant agents like low-molecular-weight heparin, in the same way glucose values alter the quantity of insulin prescribed; it should be kept in mind that an excess of anticoagulation can also lead to alarming hemorrhagic events.

4. Conclusions

This work describes a simple yet sensitive and specific capacitive label-free without any redox probe in solution biosensor for DD using impedimetric-based measurements. These results create the basis for the development of low-cost, reliable point-of-care electrochemical chips for the quantitative bedside determination of DD in clinical samples, thus speeding up the diagnosis of many possibly lethal, pathologies like PE.

Acknowledgements

This work was financially supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP, 2012-22820-7) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) grants. AS acknowledges CNPq for his Ph.D. studentship (141058/2013-7), SMM acknowledges FAPESP for her research grant (2014/030398) and LMG acknowledges the Portuguese Foundation for Science and

Table 1
Some examples of biosensors for DD determination using different approaches. Unit conversion was done considering a DD molecular weight of ~200 kDa [31].

Approach	Matrix	Concentration range	LOD	Ref.
Redox(Electrochemical) capacitance	Buffer (PBS)	1-1,000 ng mL^{-1}	0.000052 nmol L^{-1} (0.01 µg L^{-1})	This work
	Human serum	1-1,000 ng mL^{-1}	0.007 nmol L^{-1} (1.4 µg L^{-1})	This work
Amperometry	Human serum	60-1,000 ng mL^{-1}	0.12 nmol L^{-1} (25 µg L^{-1})	[13]
Cyclic voltammetry	–	0.1-100 ng mL^{-1}	0.1 nmol L^{-1} (20 µg L^{-1})	[12]
Surface Acoustic Wave	Buffer (PBS)	2,000-20,000 ng mL^{-1}	< 1 nmol L^{-1} (200 µg L^{-1})	[33]
Surface Plasmon Resonance (SPR)	Buffer (PBS)	300-1,000 ng mL^{-1}	1.5 nmol L^{-1} (300 µg L^{-1})	[14]
Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS)	Buffer (PBS)	0.5-50 ng mL^{-1}	0.0025 nmol L^{-1} (0.5 µg L^{-1})	[14]

Technology (FCT) for his post-doctoral fellowship (SFRH/BPD/76544/2011).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2015.09.169.

References

[1] H. Bounameaux, P. de Moerloose, A. Perrier, G. Reber, Thrombosis and Haemostasis 71 (1994) 1–6.
[2] J. Tsai, S.D. Grosse, A.M. Grant, W. Hooper, H.K. Atrash, Archives of Internal Medicine 172 (2012) 960–961.
[3] J. Antović, Journal of Medical Biochemistry 29 (2010) 282–287.
[4] E. Haapaniemi, T. Tatlisumak, Acta Neurologica Scandinavica 119 (2009) 141–150.
[5] A. Wakai, A. Gleeson, D. Winter, Emergency Medicine Journal 20 (2003) 319–325.
[6] A. Gutiérrez, J. Sánchez-Payá, P. Marco, M. Pérez-Mateo, Journal of Clinical Gastroenterology 32 (2001) 315–318.
[7] X.-Y. Yang, S. Gao, J. Ding, Y. Chen, X.-S. Zhou, J.-E. Wang, PLoS ONE 9 (2014) e89756.
[8] S.S. Adam, N.S. Key, C.S. Greenberg, Blood 113 (2009) 2878–2887.
[9] M.J. Elms, I.H. Bunce, P.G. Bundesen, D.B. Rylatt, A.J. Webber, P.P. Masci, A.N. Whitaker, American Journal of Clinical Pathology 85 (1986) 360–364.
[10] J.L. Pittet, P. de Moerloose, G. Reber, C. Durand, C. Villard, N. Piga, D. Rolland, S. Comby, G. Dupuy, Clinical Chemistry 42 (1996) 410–415.
[11] M.A. Arugula, A. Simonian, Measurement Science and Technology (2014) 25.
[12] J.S. Rossier, H.H. Girault, Lab on a Chip 1 (2001) 153–157.
[13] M. Gamella, S. Campuzano, F. Conzuelo, A. Julio Reviejo, J.M. Pingarron, Electroanalysis 24 (2012) 2235–2243.
[14] I. Hafaid, A. Gallouz, W. Mohamed Hassen, A. Abdelghani, Z. Sassi, F. Bessueille, N. Jaffrezic-Renault, Journal of Sensors 2009 (2009) 12.
[15] J. Lehr, F.C.B. Fernandes, P.R. Bueno, J.J. Davis, Analytical Chemistry 86 (2014) 2559–2564.
[16] F.C.B. Fernandes, M.S. Góes, J.J. Davis, P.R. Bueno, Biosensors and Bioelectronics 50 (2013) 437–440.
[17] P.R. Bueno, J.J. Davis, Anal. Chem. 86 (2014) 1977–2004.
[18] F.C.B. Fernandes, A. Santos, D.C. Martins, M.S. Góes, P.R. Bueno, Biosensors and Bioelectronics 57 (2014) 96–102.
[19] P.R. Bueno, G.T. Feliciano, J.J. Davis, Physical Chemistry Chemical Physics 17 (2015) 9375–9382.
[20] P.R. Bueno, J.J. Davis, Anal. Chem. 86 (2014) 1337–1341.
[21] P.R. Bueno, G. Mizzon, J.J. Davis, Journal of Physical Chemistry B 116 (2012) 8822–8829.
[22] A. Santos, J.P. Piccoli, N.A. Santos-Filho, E.M. Cilli, P.R. Bueno, Biosensors and Bioelectronics 68 (2015) 281–287.
[23] A. Santos, J.J. Davis, P.R. Bueno, Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques (2014) , doi:http://dx.doi.org/10.4172/2155-9872.S7-016 S7:016.
[24] A. Santos, F.C. Carvalho, M.-C. Roque-Barreira, P.R. Bueno, Biosensors and Bioelectronics 62 (2014) 102–105.
[25] M.S. Goes, H. Rahman, J. Ryall, J.J. Davis, P.R. Bueno, Langmuir 28 (2012) 9689–9699.
[26] J. Tkac, J.J. Davis, Journal of Electroanalytical Chemistry 621 (2008) 117–120.
[27] G.L. Long, J.D. Winefordner, Analytical Chemistry 55 (1983) 712–724.
[28] W. Deng, X. Ji, Q. Chen, C.E. Banks, RSC Advances 1 (2011) 1171–1178.
[29] P.R. Bueno, J.J. Davis, Analytical Chemistry 86 (2014) 1337–1341.
[30] J.C. Love, L.A. Estroff, J.K. Kriebel, R.G. Nuzzo, G.M. Whitesides, Chemical Reviews 105 (2005) 1103–1169.
[31] J.B. Walker, M.E. Nesheim, Journal of Biological Chemistry 274 (1999) 5201–5212.
[32] K. Mori, M. Emoto, M. Inaba, Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery 5 (2011) 124–146.
[33] K. Mitsakakis, E. Gizeli, Analytica Chimica Acta 699 (2011) 1–5.
[34] R.A. Douma, G. Le Gal, M. Söhne, M. Righini, P.W. Kamphuisen, A. Perrier, M.J.H. A. Kruip, H. Bounameaux, H.R. Büller, P.M. Roy, BMJ (Online) 340 (2010) 962.
[35] M. Levčík, J. Kettner, A. Jabor, J. Kautzner, Cor et Vasa 55 (2013) e510–e514.
[36] D. Dindo, S. Breitenstein, D. Hahnloser, B. Seifert, S. Yakarisik, L.M. Asmis, M.K. Muller, P.A. Clavien, Blood coagulation & fibrinolysis: an international journal in haemostasis and thrombosis 20 (2009) 347–352.

Biosensors and Bioelectronics 62 (2014) 102–105

Contents lists available at ScienceDirect

Biosensors and Bioelectronics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bios

Short communication

Impedance-derived electrochemical capacitance spectroscopy for the evaluation of lectin–glycoprotein binding affinity

Adriano Santos [a], Fernanda C. Carvalho [a], Maria-Cristina Roque-Barreira [b], Paulo R. Bueno [a,*]

[a] Department of Physical Chemistry, Chemistry Institute, São Paulo State University (Unesp), 55 Prof. Francisco Degni Street, ZIP Code: 14800-060, São Paulo, Brazil

[b] Department of Cellular and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents, Ribeirão Preto Medical School. University of São Paulo (USP), 3900 Bandeirantes Avenue. ZIP Code: 14049-900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 16 May 2014
Accepted 16 June 2014
Available online 20 June 2014

Keywords:
ArtinM
HRP
Impedance-derived electrochemical capacitance spectroscopy
Langmuir isotherm
Binding affinity constant

ABSTRACT

Characterization of lectin–carbohydrate binding using label-free methods such as impedance-derived electrochemical capacitance spectroscopy (ECS) is desirable to evaluate specific interactions, for example, ArtinM lectin and horseradish peroxidase (HRP) glycoprotein, used here as a model for protein–carbohydrate binding affinity. An electroactive molecular film comprising alkyl ferrocene as a redox probe and ArtinM as a carbohydrate receptive center to target HRP was successfully used to determine the binding affinity between ArtinM and HRP. The redox capacitance, a transducer signal associated with the alkyl ferrocene centers, was obtained by ECS and used in the Langmuir adsorption model to obtain the affinity constant $(1.6 \pm 0.6) \times 10^8$ L mol^{-1}. The results shown herein suggest the feasibility of ECS application for lectin glycoarray characterization.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Electrochemical approaches such as amperometry (Poorahong et al., 2011), voltammetry (Compton and Banks, 2007), and impedance spectroscopy (EIS) (Lisdat and Schäfer, 2008; Bueno and Gabrielli, 2009) are reproducible and suitably sensitive to transduce biological signals inherent in binding affinity events, e.g., antigen–antibody (Bryan et al., 2013) and enzyme–substrate (Gonçalves et al., 2014). Additionally, EIS has been used successfully to characterize lectin–carbohydrate interactions and for the design of glycoprotein biosensors (Bertok et al., 2013; Loaiza et al., 2011; Yang et al., 2013).

Faradaic capacitive approaches comprising impedance-derived electrochemical capacitance spectroscopy (ECS) have not yet been employed for glycoprotein biosensoring. ECS biosensoring has the advantage of eliminating the need for a redox probe in the biological matrix or electrolyte. The differences between EIS and ECS are associated with the electrochemistry communication between the redox probe and the metallic electrode surface (Fernandes et al., 2014). The transducer signal in EIS measures the change in the impedance caused by the target binding on the biosensor surface, specially associated with the charge transfer resistance (R_{ct}) element in a redox probe in the biological matrix or electrolytic solution (Fernandes et al., 2013, 2014;). However, the ECS transducing signal measures the change in the redox capacitance (C_r) of the redox tethered receptive interfaces (Fernandes et al., 2013, 2014; Lehr et al., 2014; Bueno and Davis, 2014a, 2014b) and does not require a redox probe in solution. This causes the ECS biosensor approach to be advantageous for multiplexing point of care applications.

Briefly, in ECS the transduction signal, C_r, is related to the redox density of states (DOS) whose occupancy, for one single state level, is given by Bueno et al. (2012, 2013), Bueno and Davis (2014a, 2014b):

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

where $f = n/\Gamma = F(E_r, \mu_e) = \{1 + \exp[(E_r - \mu_e)/k_B T]\}^{-1}$ is the occupation function given by the Fermi Dirac function, n is the electron density occupancy, e is the elementary charge, k_B is the Boltzmann constant, T is the absolute temperature, Γ is the redox molecular surface coverage, E_r is the half-wave potential and μ_e electron chemical potential (Bueno et al., 2012, 2013).

Affinity interaction is transduced to the redox capacitance mechanistically as proposed by Bueno et al. (2012) and Bueno and Davis (2014a, 2014b). The hypothesis is that a redox probe tethered in a SAM has a charging fingerprint (energy storage from

* Corresponding author. Tel.: +55 16 3301 9642; fax: +55 16 3322 2308.
E-mail address: prbueno@iq.unesp.br (P.R. Bueno).

http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.06.034
0956-5663/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

a combination of the electrostatic field associated with charge separation and a quantized term resulting from resonant access to specific confined molecular states – C_r or redox capacitance) sensitively dependent on the redox probe environment. A change in the environment, due a biorecognition event such as antibody–antigen and lectin–glycoprotein bindings, disturb C_r, thus allowing transduce of the signal. This idea has been used to detect successfully relevant biomarkers (Lehr et al., 2014; Fernandes et al., 2013, 2014).

We use C_r as the transducer signal to characterize the ArtinM lectin binding with HRP glycoprotein using the binding affinity constant calculated from the Langmuir isotherm model. ArtinM was selected since it is an important mannose binding lectin from *Artocarpus heterophyllus* seeds; ArtinM is a tetrameric non-glycosylated protein composed of identical 16 kDa protomers, each one with a carbohydrate recognition domain (CRD) (Rosa et al., 1999). Glycoarray analysis of ArtinM specificity revealed that subsets of complex-type bi-antennary N-glycans containing Manα1-3 (Manα1-6)Manβ1 are well recognized by the lectin (Nakamura-Tsuruta et al., 2008), which accounts for the selectivity of ArtinM binding to certain N-glycans such as those linked to some protein cell receptors (Carvalho et al., 2011; Pereira-da-Silva et al., 2012). Furthermore, the interaction of ArtinM–N-glycan can be explained using the ArtinM–HRP model, i.e. using crystallography analysis (Jeyaprakash et al., 2004) and a label-free sensor, such as Quartz Crystal Microbalance (QCM), with dissipation factor (Pesquero et al., 2010; Giménez-Romero et al., 2013).

2. Material and methods

2.1. Reagents

All reagents described in this section were purchased from Sigma-Aldrich.

Lectin ArtinM was extracted from *Artocarpus heterophyllus* seeds by affinity chromatography with immobilized D-mannose as previously described (Santos-de-Oliveira et al., 1994).

All solutions used in the analytical procedures were prepared with Milli-Q purified water (Millipore Corp., Simplicity System, Bedford, MA, US) with 18.2 MΩ cm at 25 °C. The protein solutions were prepared and used in a 10 mM PBS (phosphate buffered saline) solution at pH 7.4.

2.2. Biosensoring surface engineering

The self-assembled monolayer (SAM) approach was used to immobilize both the lectin (ArtinM) and alkyl ferrocene (redox probe) onto the gold surface and obtain the transducer capacitive signal proportional to the ArtinM–HRP binding. The gold electrode (2 mm, Metrohm) was cleaned and the surface area was determined as previously described (Fernandes et al., 2014; Lehr et al., 2014). These determinations (~0.036–0.038 cm^2) were used to normalize the absolute recorded capacitance.

The electroactive SAM was constructed by immersing the cleaned gold surface for 16 h at 25 °C in a mixed solution of 0.2 mM 16-mercaptohexadecanoic acid (for covalent lectin attachment) and 2.0 mM 11-(ferrocenyl)undecanethiol (redox probe) in ethanol. The carboxyl groups of the 16-mercaptohexadecanoic acid were activated with an aqueous solution containing 0.4 M N-(3-dimethylaminopropyl)-N′-ethylcarbodiimide (EDC) and 0.1 M N-hydroxysuccinimide (NHS) for 30 min. Subsequently, the electrode was washed using PBS, dried with nitrogen gas, and immersed in 0.15 mg mL^{-1} ArtinM solution in PBS for 1 h. Finally, the ArtinM electrodes were immersed in a 0.1% gelatin solution for 30 min to block unspecific sites (Fig. 1a).

2.3. Electrochemical capacitance spectroscopy measurements

An AUTOLAB potentiostat (PGSTAT30) with a FRA module controlled by NOVA software was used for all electrochemical measurements. A three-electrode setup was used for the measurements consisting of a 2.0 mm diameter gold working electrode from METROHM, a platinum mesh counter electrode, and an Ag|AgCl (saturated KCl) reference electrode.

Electrochemical characterization was conducted using the supporting electrolyte of 20 mM $TBAClO_4$ (tetrabutylammonium perchlorate) dissolved in acetonitrile and H_2O (20:80) without a redox probe. EIS measurements were conducted in the frequency range 10 mHz to 100 kHz with peak to peak amplitude of 10 mV and verified for compliance with the Kramers–Kroning linear systems theory using NOVA software. The ECS analysis was performed by determining the capacitance using the following relationship $C^*(\omega) = 1/i\omega Z^*(\omega)$, where ω is the angular frequency and i is the complex number, $i = \sqrt{-1}$ (Bueno et al., 2013). In processing $Z^*(\omega)$ it is possible to obtain the imaginary $C'' = \varphi Z'$ and real $C' = \varphi Z''$ part of capacitance noting that $\varphi = 1/(\omega|Z|^2)$.

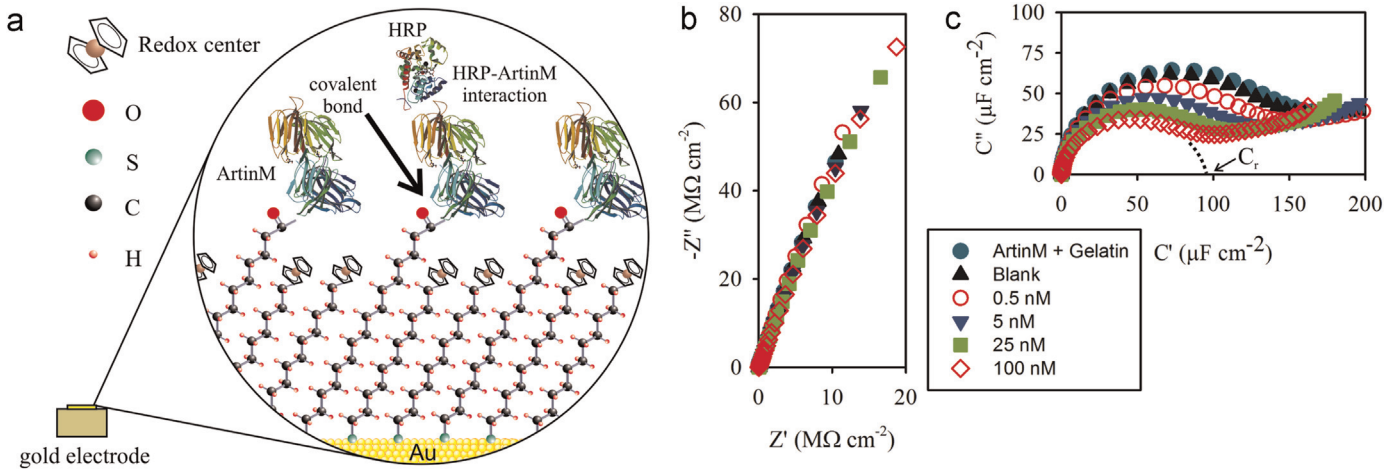


Fig. 1. (a) Schematic representation of functional SAM to characterize ArtinM–HRP binding by ECS. The C_r signal obtained from ECS is sensitive to the HRP target concentration and can be used as a transducer signal to design label-free glycoprotein sensing. Examples of (b) impedance and (c) capacitance Nyquist plots of the ArtinM-HRP interface at different concentrations of HRP. The higher responsiveness exhibited by the capacitance in comparison to the impedance plots underlines the utility of capacitive redox glycoprotein sensing. C_r is obtained from the diameter of the semi-circle in capacitive Nyquist diagrams (as exemplified in c). The data were obtained at the E_r, i.e. 0.48 V vs Ag|AgCl.

All measurements were performed in triplicate. To verify the specific interaction, a negative control analysis was implemented replacing HRP with BSA (bovine serum albumin), a non-glycosylated protein, at 100 nM.

To construct the saturation curve, a range of HRP concentrations from 0.5 nM to 100 nM in PBS was used, exposing the electrode to 50 μL of the solution prior to ECS analysis at the E_r (walf-wave) potential (0.48 V vs Ag|AgCl).

3. Results and discussion

The C_r signal is dependent on the target concentration and a Langmuir saturation curve must be constructed to obtain the binding affinity constant. Fig. 1b and c illustrates the Nyquist plots from the impedance and capacitance analysis executed after exposing the ArtinM biosensor to different HRP concentrations. From the impedance Nyquist plots (Fig. 1b), it is not possible to distinguish the interaction process, and it is neither sensitive enough nor able to be used as a transducer signal. However, converting the complex impedance raw data into complex capacitance (Fig. 1c) easily overcomes the latter problem. From Fig. 1c, C_r, which is obtained from the diameter of the semi-circle from Nyquist capacitive diameter (Bueno et al., 2012; Lehr et al., 2014), decreases proportionally with increasing target concentration. A linear response is obtained by plotting the inverse of ΔC_r ($1/\Delta C_r = 1/C_{r,[HRP]} - 1/C_{r,\,blank}$, where $1/C_{r,blank}$ is the inverse of the capacitance of the biosensor after exposing it to the PBS solution without target) as a function of the natural logarithm of the target concentration (data not shown). Additionally, a $1/\Delta C_r$ saturation curve with respect to the target concentration is shown in Fig. 2a. These responses are specific to HRP (Fig. 2c).

From Fig. 2a, the binding affinity constant (K_a) can be calculated from the response variation (ΔR) (Pesquero et. al., 2010) of the Cr transducer signal (Fernandes et. al., 2014). Using the Langmuir isotherm, there are two possible independent and uncorrelated situations, i.e., unoccupied (ArtinM free sites) and occupied (ArtinM HRP) receptor sites.

The dynamic equilibrium between the lectin (ArtinM) and lectin–glycoprotein complex (ArtinM · HRP) according to the Langmuir isotherm presumptions is described by Eq. (2) (Pesquero et al., 2010):

$$\text{ArtinM} + \text{HRP} \rightleftharpoons \text{ArtinM·HRP} \tag{2}$$

The affinity constant (K_a) is given by Eq. (3):

$$K_a = \frac{[\text{ArtinM·HRP}]}{[\text{ArtinM}][\text{HRP}]} \tag{3}$$

where [] represents the concentration. Assuming a surface coverage occupation percentage given by θ and a percentage of available sites as $1-\theta$, Eq. (3) can be rewritten as

$$K_a[\text{HRP}] = \frac{\theta}{1-\theta} \tag{4}$$

Solving Eq. (4) for θ, it is possible obtain the expression

$$\theta = \frac{K_a[\text{HRP}]}{1 + K_a[\text{HRP}]} \tag{5}$$

The biomolecular surface coverage response, R (mol cm^{-2}), of the transducer is proportional to θ. Therefore, it can be assumed that $R = \theta R_m$, where R_m is the maximum response of the adsorption probability when θ approaches unity as in Eq. (6)

$$R = \frac{R_m K_a[\text{HRP}]}{1 + K_a[\text{HRP}]} \tag{6}$$

Eq. (6) can be linearized as

$$\frac{[\text{HRP}]}{R} = \frac{[\text{HRP}]}{R_m} + \frac{1}{K_a R_m} \tag{7}$$

Because ArtinM is occupied by HRP and forms ArtinM · HRP according to Eq. (2), the number of occupied redox centers decreases proportionally as the C_r values decreases. Furthermore, Eq. (7) can be rewritten in terms of variation of the signal as

$$\frac{[\text{HRP}]}{\Delta R} = \frac{[\text{HRP}]}{R_m} + \frac{1}{K_a R_m} \tag{8}$$

where ΔR is $1/C_r$ and ΔR_m, the maximum signal, corresponds to $(1/\Delta C_r)_m$. This mathematical approach can be used to fit the experimental data in a plot of $[HRP]/\Delta R$ against [HRP] (Fig. 2b), where $[\text{HRP}]/\Delta R = [\text{HRP}]/(1/\Delta C_r) = [\text{HRP}]\Delta C_r$ with units mol L^{-1} F cm^{-2}. The K_a value calculated by the quotient of the angular $(1/\Delta R_m)$ and linear $(1/K_a\Delta R_m)$ coefficient was $(1.6 \pm 0.6) \times 10^8$ L mol^{-1} for ArtinM–HRP.

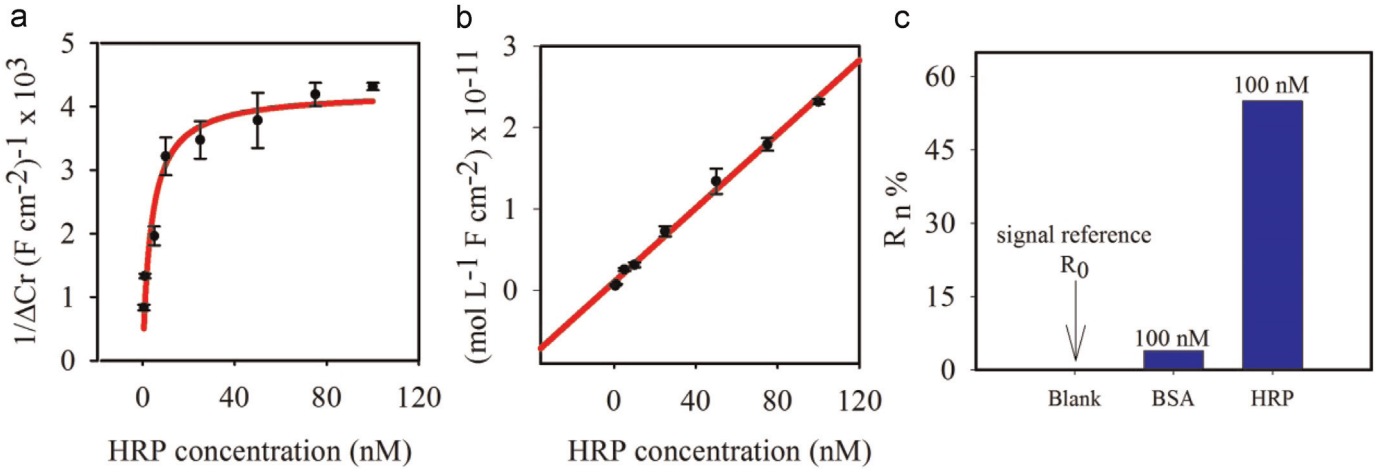


Fig. 2. (a) Saturation curve reporting $1/\Delta C_r$ for the electroactive ArtinM functionalized electrode. (b) Linear form of the Langmuir isotherm from the data showed in (a). The linear regression adjustment is 99%. The error bars indicate the variance for triplicate measurements. (c) Redox-capacitive response of the ArtinM interface in the presence of a nonspecific protein (BSA) as a percentage of the response (R_n) upon selective binding. Percent response, $R_n(\%) = 100\,(R_n - R_0)/R_0$, is calculated with respect to the HRP specific interface response for a zero target concentration (R_0). Nonspecific responses were typically less than 4% of R_0, in contrast to a variation of 55% of R_0 for the specific responses.

The affinity constant obtained by ECS was around three orders of magnitude higher than values obtained by QCM measurements (Pesquero et al., 2010). The differences are intrinsically associated with HRP concentration range used in each methodology. In QCM approach the HRP concentration range was from 1.5×10^5 nmol L^{-1} to 7.5×10^5 nmol L^{-1} (Pesquero et al., 2010) where HRP is expected to form bimolecular (aggregates) complexes (Giménez-Romero et al., 2013), whereas the HRP concentration range from 0.5 nmol L^{-1} to 100 nmol L^{-1} used in ECS (due to its inherently higher sensitivity) assures that HRP exists only as single molecular entities instead of complexes (Giménez-Romero et al., 2013). This observation is potentially reflective of the advantages associated with the high dilution conditions permitted by the ECS approach. The binding affinity is more adequately obtained under diluted situations according to the premises of the Langmuir isotherm. Therefore, the high sensitivity of the ECS methodology is accordingly associated with the use of diluted HRP as a target binding to ArtinM. The methodology proposed can be extended to the binding analysis of others lectin–carbohydrates systems.

4. Conclusions

We have reported a suitable approach to calculate the affinity constant between ArtinM lectin and HRP glycoprotein using a redox capacitance transducer signal in an electroactive mixed monolayer containing alky ferrocene and 16-mercaptohexadecanoic acid with an ArtinM interface.

The results presented underline the utility and potential of ECS for the development of a highly sensitive and selective label-free approach for accurate measurement of the binding affinity constant of protein–carbohydrate biological systems. It can be used for a wide range of lectin–glycoproteins and, in combination with the intrinsic multiplexing characteristics of ECS, it is highly suitable (and potentially useful) for glycoarray technological platforms.

Acknowledgments

This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP, 2012-22820-7) and the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) grants. Adriano Santos acknowledges CNPq for his Ph.D. scholarship (141058/2013-7).

References

Bertok, T., Klukova, L., Sediva, A., Kasák, P., Semak, V., Micusik, M., Omastova, M., Chovanová, L., Vlček, M., Imrich, R., Vikartovska, A., Tkac, J., 2013. Anal. Chem. 85, 7324–7332.
Bryan, T., Luo, X., Bueno, P.R., Davis, J.J., 2013. Biosens. Bioelectron. 39, 94–98.
Bueno, P.R., Mizzon, G., Davis, J.J., 2012. J. Phys. Chem. B 116, 8822–8829.
Bueno, P.R., Davis, J.J., 2014a. Anal. Chem. 86, 1337–1341.
Bueno, P.R., Davis, J.J., 2014b. Anal. Chem. 86, 1997–2004.
Bueno, P.R., Fabregat-Santiago, F., Davis, J.J., 2013. Anal. Chem. 85, 411–417.
Bueno, P.R., Gabrielli, C., 2009. Electrochemistry, nanomaterials and nanostructures. In: Leite, Edson Roberto (Ed.), Nanostructured Materials for Electrochemical Energy Production and Storage. Springer, New York, pp. 81–149.
Carvalho, F.C., Soares, S.G., Tamarozzi, M.B., Rego, E.M., Roque-Barreira, M.C., 2011. PLoS One 6, e27892.
Compton, R.G., Banks, C.E., 2007. Understanding Voltammetry, second ed. Imperial College Press, London.
Fernandes, F.C.B., Góes, M.S., Davis, J.J., Bueno, P.R., 2013. Biosens. Bioelectron. 50, 437–440.
Fernandes, F.C.B., Santos, A., Martins, D.C., Góes, M.S., Bueno, P.R., 2014. Biosens. Bioelectron. 57, 96–102.
Giménez-Romero, D., Bueno, P.R., Pesquero, N.C., Monzó, I.S., Puchades, R., Maquieira, Á., 2013. J. Phys. Chem. B 117, 8360–8369.
Gonçalves, L.M., Callera, W.F.A., Sotomayor, M.D.P.T., Bueno, P.R., 2014. Electrochem. Commun. 38, 131–133.
Jeyaprakash, A.A., Srivastav, A., Surolia, A., Vijayan, M., 2004. J. Mol. Biol. 338, 757–770.
Lehr, J., Fernandes, F.C.B., Bueno, P.R., Davis, J.J., 2014. Anal. Chem. 86, 2559–2564.
Lisdat, F., Schäfer, D., 2008. Anal. Bioanal. Chem. 391, 1555–1567.
Loaiza, O.A., Lamas-Ardisana, P.J., Jubete, E., Ochoteco, E., Loinaz, I., Cabañero, G.N., García, I., Penadés, S., 2011. Anal. Chem. 83, 2987–2995.
Nakamura-Tsuruta, S., Uchiyama, N., Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M., Totani, K., Ito, Y., Hirabayashi, J., 2008. FEBS J. 275, 1227–1239.
Pereira-da-Silva, G., Carvalho, F.C., Roque-Barreira, M.C., 2012. Inflamm. Allergy—Drug Targets 11, 433–441.
Pesquero, N.C., Pedroso, M.M., Watanabe, A.M., Goldman, M.H.S., Faria, R.C., Roque-Barreira, M.C., Bueno, P.R., 2010. Biosens. Bioelectron. 26, 36–42.
Poorahong, S., Santhosh, P., Ramírez, G.V., Tseng, T.-F., Wong, J.I., Kanatharana, P., Thavarungkul, P., Wang, J., 2011. Biosens. Bioelectron. 26, 3670–3673.
Rosa, J.C., Greene, L.J., De Oliveira, P.S.L., Garratt, R., Beltramini, L., Resing, K., Roque-Barreira, M.C., 1999. Protein Sci. 8, 13–24.
Santos-de-Oliveira, R., Dias-Baruffi, M., Thomaz, S.M., Beltrarninim, L.M., Roque-Barreira, M.C., 1994. J. Immunol. 153, 1798–1807.
Yang, H., Li, Z., Wei, X., Huang, R., Qi, H., Gao, Q., Li, C., Zhang, C., 2013. Talanta 111, 62–68.

Biosensors and Bioelectronics 83 (2016) 368–378

Contents lists available at ScienceDirect

Biosensors and Bioelectronics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bios

Glycoprotein assay based on the optimized immittance signal of a redox tagged and lectin-based receptive interface

Adriano Santos, Paulo R. Bueno *

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (São Paulo State University), Institute of Chemistry, Physical Chemistry Department, Nanobionics Group, 55 Prof. Francisco Degni Street, Quitandinha, 14800-060 Araraquara, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 16 February 2016
Received in revised form
8 April 2016
Accepted 14 April 2016
Available online 16 April 2016

Keywords:
Electroanalysis
Electrochemical impedance spectroscopy
Glycoprotein
Lectin
Immittance functions

ABSTRACT

Glycoproteins play important roles in biological systems such as in process related to cell binding, signaling and disease. Consequently, novel, potentially quantitative, and rapid electroanalytical approaches capable of detecting protein binding are welcome. Herein, we introduce a methodology that is both fast and sensitive, and capable of quantification of the binding affinity in glycoprotein-lectin molecular models. The proposed methodology is based on the electrochemical impedance spectroscopy technique focused on the immittance function approach, wherein a library of analytical parameters can be computed from the raw impedance data obtained, and automatically processed in a label-free, quantifiable and very sensitive assay platform. This approach also avoids redox probe pre-doping of the analytical sample.

Avoiding redox pre-doping of the analytical sample is achievable designing an appropriate redox-tagging monolayer containing lectin interface (a carbohydrate binding protein, herein ArtinM) as the bio-receptor, endowing high sensitivity of electrochemical signal when specifically detecting glycoproteins of interest (presently horseradish peroxidase, HRP, a mannose glycoprotein) as the biochemical target for ArtinM. The electroanalytical curves demonstrated that the binding affinity constant could be evaluated as equivalent for all library (immittance function) parameters, allowing optimized single frequency (or a range of frequencies) assessment with high sensitivity. In other words, binding affinity constants between ArtinM and HRP for each of the parameters in the immittance function library at given optimized frequencies were similar, independently of the parameter. Thus, the feasibility of using this immittance function approach for electroanalytical glycoarrays by accessing bio-recognition processes on a rapid (optimized) single frequency and highly multiplexable platform was demonstrated.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Glycoproteins and glycolipids are complex carbohydrate-containing chemical structures that play important roles in biological systems (Dwek, 1996; Nelson and Cox, 2012). Among numerous biological processes, carbohydrate units have vital importance in biochemical activities, for instance, in controlling physicochemical phenomena related to protein adsorption/interaction or binding (cell-cell and biomolecule-cell) that involve cell-signaling (Zachara and Hart, 2006) and pathogen invasion (Marchant et al., 2012). The carbohydrates present in glycoproteins are also associated with protein stability (folding and structure conformation) (Laurent et al., 2008) and abnormal alterations in glycosylation patterns are related with various diseases (Dennis et al., 1999) including diabetes (Dias and Hart, 2007), neurodegenerative disorders (Dias and Hart, 2007), cancer (Adamczyk et al., 2012), and metastasis (Silva, 2015). Indeed several cancer protein biomarkers (proteins related to trauma, infections, and disease onset or progression (Mayeux, 2004; Strimbu and Tavel, 2010)) are glycoproteins presenting with aberrant changes in carbohydrate content such as the prostatic specific antigen (PSA, for prostatic cancer) and CA125 (for ovarian cancer) (Adamczyk et al., 2012; Silva, 2015). Accordingly, the methods for both carbohydrate/glycoprotein detection and qualification/quantification of carbohydrate/glycoprotein-protein/cell interaction are greatly studied in literature (Pierce et al., 1999; Laurent et al., 2008; Yakovleva et al., 2010; Safina et al., 2011; Bertok et al., 2013a, 2013b; Carvalho et al., 2014; Santos et al., 2014a; Surinova et al., 2015).

Early detection of cancer biomarkers is highly desirable in clinical applications since it increases patient survival rate as a consequence of raising the probability of successful treatment. Several techniques have been developed in order to either validate or detect such biomarkers in early disease stages (Bohunicky and

* Corresponding author.
E-mail address: prbueno@iq.unesp.br (P.R. Bueno).
URL: http://www.nanobionics.pro.br (A. Santos).

http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.04.043
0956-5663/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Mousa, 2011; Reddy et al., 2012; Uludag and Tothill, 2012; Chiriaco et al., 2013; Asav and Sezgintürk, 2014; Taleat et al., 2014; Yang et al., 2014; Johari-Ahar et al., 2015) by non-invasive methods which are alternative for biopsy. For example, Surinova et al. (2015) described a mass spectrometry methodology to screen and validate a set of glycoproteins for colorectal cancer (CRC) diagnosis and Safina et al. (2011) developed a surface plasmon resonance (SPR) assay for glycoprotein screening. Furthermore, traditional and commercial immunoassays such as ELISA and radio-immunoassay (Voller et al., 1978; Berson and Yalow, 2006), although essentially label-based approaches are extensively used in clinical applications and glycoarrays (Laurent et al., 2008). Nonetheless, ELISA and radio-based immunoassays have the inconvenience of being highly and typically time-consuming (Voller et al., 1978; Luo and Davis, 2013) or costly (Luo and Davis, 2013), and are difficult to be developed for bedside applications (Rusling et al., 2010), and require well-trained technical staff (Wang, 2006). Several label-free bioassays have been extensively explored as an alternative. Some of these assays include piezoelectric (Su et al., 2013), optical (Reddy et al., 2012) and electrochemical assays (Ronkainen et al., 2010; Luo and Davis, 2013). Among assays based on electroanalytical signals, electrochemical impedance-based bioassays (electrochemical impedance/capacitance spectroscopy, EIS/ECS) are receiving special attention due their sensitivity, label-free multiplexing, and miniaturizing capabilities (Daniels and Pourmand, 2007; Lisdat and Schäfer, 2008; Santos et al., 2014b).

Two main different real-time and label-free techniques have been used in quantifying lectin-glycoprotein binding interactions such as isothermal titration calorimetry (ITC) (Pierce et al., 1999; Dam and Brewer, 2002; Takeda and Matsuo, 2014) and quartz crystal microbalance (QCM) (Speight and Cooper, 2012). The advantage of these techniques is the capability to investigate interaction kinetics in real-time (Lebed et al., 2006; Pedroso et al., 2008; Pesquero et al., 2010). This technique can also incorporate analysis of the energy dissipation factor (QCM-D), additionally allowing investigation of the viscoelastic properties of protein-protein binding/interactions (Höök and Kasemo, 2007), eventually associated with different binding processes or recognition events (Giménez-Romero et al., 2013; Santos et al., 2015a). Similar to QCM, Surface Plasmon Resonance (SPR) is a technique in which the transducing signal is intrinsically and related to changes in the optical properties of the investigated receptive surface. It allows detection of changes in the optical properties as a consequence of protein adsorption that can be applied in affinity studies (Homola et al., 1999; Laurent et al., 2008; Safina et al., 2011). Nonetheless, the development of glycoarrays based either QCM or SPR is time-consuming, presenting with higher cost and lower sensitivity compared to competing electroanalytical techniques such as impedance electrochemical assays (Carvalho et al., 2014; Santos et al., 2014a).

Impedance-based bioassays comprise mostly of two different methods: faradaic and non-faradaic (Daniels and Pourmand, 2007; Lisdat and Schäfer, 2008; Santos et al., 2014b). In both these approaches of impedance-based bioassays, useful analytical information is generally obtained only after applying the equivalent circuit analysis (for instance, by using a Randles equivalent circuit) to fit/adjust the raw impedance spectra data to an appropriated circuit model (Daniels and Pourmand, 2007; Lisdat and Schäfer, 2008; Santos et al., 2014b). Faradaic assays necessarily use redox probes in the analytical solution to generate the electrochemical transducer signal of interest, which is further related to and quantified by the specific binding of the analyte. The major charge transducer signal of interest is associated with the change of the charge transfer resistance (R_{ct}), which is expected to rise as the target concentration in the analytical solution increases. This expectative comes from the fact that in capturing the target by the receptive interface a more effective isolating layer (to those electroactive ionic species doping/added to the solution phase) is formed as the binding event occurs so that the increasing in R_{ct} is as consequence of a chemical (steric) blocking of the interface.

On the other hand, in non-faradaic based assays, the redox probe is not required since the transduction signal is capacitive, and primarily originates from changes in the dielectric (double layer-like) properties of the interface (Berggren et al., 2001; Goes et al., 2012). In non-faradaic assays, charge distribution is mainly caused by ionic relaxation effects and ionic concentration (associated with the electrolyte) changes on the interface as target binding increases (Berggren et al., 2001; Berney, 2004; Santos et al., 2014b). Interfacial capacitance in such assays is modeled as a parallel-plate contained in an equivalent circuit model of the interface, where the electrolyte resistance appears in series with this interfacial capacitance (Berggren et al., 2001). It is worth noting that while the faradaic approach has disadvantages based on the needs of pre-doping the solution with a redox probe, the non-faradaic approach shows some disadvantages/issues related to receptor surface design (Berggren et al., 2001) and usually suffers from lack of selectivity (Daniels and Pourmand, 2007) and sensitivity.

As an alternative to both the approaches mentioned, redox capacitive assays combine high sensitivity and the lack of need for pre-doping the solution with a redox probe. In redox capacitive assays the probe is responsible for generating a sensitive electrochemical signal which is already (previously added) contained in the receptive interface; however, instead of using the charge transfer resistive signal, a useful transducer electrochemical signal is associated with the redox capacitance (a kind of faradaic capacitive signal, C_r) (Fernandes et al., 2013; Fernandes et al., 2014; Lehr et al., 2014). This capacitance can sometimes be (depending on the project of redox self-assembly monolayer designing) one or two orders of magnitude higher than those associated with non-faradaic capacitive events (Fernandes et al., 2014; Marques et al., 2015; Santos et al., 2015b). Redox (or electrochemical) capacitance is a measure of electrochemical density of the states of a redox active monolayer which was demonstrated to be highly sensitive to binding events (antigen-antibody coupling) (Fernandes et al., 2013; Fernandes et al., 2014; Lehr et al., 2014), and to changes in environmental dielectrics (Bueno and Davis, 2014a). However, as already mentioned it is not associated with non-faradaic double-layer capacitive effects (it exists additionally to double-layer effects and can sometimes dominate the capacitive signal) (Fernandes et al., 2014; Marques et al., 2015).

In spite of a considerable number of impedance bioassays reported in literature for either cancer detection (specially glycoproteins or cancer cells) (Bertok et al., 2013a, 2013b; Hu et al., 2013) or biological affinity studies (lectin-glycoprotein and lectin-cell binding) (Carvalho et al., 2014; Santos et al., 2014a), there are only few studies which do not require the modeling of interface with an equivalent circuit (Bedatty Fernandes et al., 2015; Patil et al., 2015). These applications are supported by the use of immittance function approaches (*ImFs*) (Bedatty Fernandes et al., 2015; Patil et al., 2015) or the use of redox capacitance signals obtained directly from Nyquist or Bode capacitive diagrams (Santos et al., 2014a; Marques et al., 2015). Accordingly, the main goal of the present work is to extend the use of *ImFs* beyond those associated with antigen-antibody bioassays (Bedatty Fernandes et al., 2015; Patil et al., 2015) to glycoprotein-lectins. Concomitantly using the Langmuir isotherm adsorption model and the *ImFs* approach, it is thus demonstrated here that it is possible either to detect and/or quantify the binding affinity of glycoproteins-lectins systems. More details on the Langmuir isotherm approach will be described in the results and discussion section.

Regarding the immittance functions approach, it can be shortly

said that it is comprised of the possibility of assessing a library of different complex functions (Z^*, Y^*, M^*, and C^*, i.e. complex impedance, admittance, modulus, and capacitance). These complex functions contain their imaginary and real components that can also be applied as transduction signals and their empirical (or pure electroanalytical) use is possible without considering any interfacial (circuit or physical chemistry) model (Bedatty Fernandes et al., 2015; Patil et al., 2015). For instance, a given set of impedance raw data as the fingerprint of an interfacial sensing process generate immittance function parameters that respond quite sensitively but differently for the same interface (Bedatty Fernandes et al., 2015; Patil et al., 2015). Since *ImFs* are mathematically related (Bedatty Fernandes et al., 2015; Patil et al., 2015), the associated approach consists of collecting frequency-dependent impedance data at a given DC electrochemical potential and convert them (using appropriate home-made mathematical software) into related immittance-target functions, thus generating a library of accessible and analytically useful immittance functions, $ImF(\omega)$, as well as their associated parameters, as detailed in the experimental section. Obviously, each $ImF(\omega)$ can be evaluated at different target concentrations and thus analytical curves (for specifically chosen or all frequencies) can be constructed and analyzed. The potential of creating a library of $ImF(\omega)$ is based in the fact that some functions are more sensitive than others for the same interfacial changes (due the target-receptor interaction) in a correspondent chosen frequency (Patil et al., 2015). Consequently, a specific frequency (or preferably a range of frequencies, typically from 100 to 1.0 Hz, as will be demonstrated) can be used in analytical procedures, thus reducing the acquisition-time (<3 min) with optimized sensitivities and automatized/optimized limit of detection (LOD) (Patil et al., 2015).

Specifically we reinforce that we use the immittance function concept here for both detecting and quantifying the lectin-glycoprotein binding affinity. As a biochemical interaction model, we constructed a label-free ArtinM based bioassay receptive interface containing a tethered redox probe self-assembled monolayer. The priority was to detect HRP glycoprotein (horseradish peroxidase), a high-mannose content glycoprotein (Straus, 1981), by using the electrochemical activity associated with redox centers to amplify the signal. ArtinM was preferable as the lectin model due to its importance, being a non-glycosylated tetrameric lectin (a carbohydrate binding protein) composed of identical 16-kDa protomers which exhibit a high specificity for mannose in N-glycans (Rosa et al., 1999; Nakamura-Tsuruta et al., 2008) presented in the cell membranes (Pereira-Da-Silva et al., 2012). It is also well known that the lectin ArtinM is involved in cell death of NB4 promyelocytic acute leukemia cells through recognition of aberrant glycosylation (β1,6-GlcNAc branched N-glycans) on the cell membrane (Carvalho et al., 2011), demonstrating feasibility for important clinical applications.

In summary, in this work we derivate, concomitantly considering Langmuir isotherm assumptions, mathematic relations between the *ImFs* (as transduction signal) and target concentrations, which enable us to calculate the affinity constant (K_a) of the biorecognition of HRP-ArtinM in an optimized manner, leading to the highest sensitivity possible. From all *ImFs* studied in this work, it was possible to obtain sensitive assays within pico to nanomolar limits of detection (LOD) and equivalent K_a values (as physical and chemically expected), clearly highlighting the promise of the *ImFs* approach in glycoprotein detection (including glycoarrays future developments) and quantitative multiplexable bio-interaction evaluation.

2. Experimental section

2.1. Chemicals and biochemical reagents

All reagents described in this section were purchased from Sigma-Aldrich except the lectin ArtinM, which was extracted from *Artocarpus heterophyllus* seeds by affinity chromatography with immobilized D-mannose (Santos-De-Oliveira et al., 1994).

Solutions of ArtinM (0.15 mg mL^{-1}), gelatin (0.1%, m/v), and bovine serum albumin (BSA) 0.1% (m/v) were prepared in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, with the composition: NaCl, 137 mmol L^{-1}; KCl, 2.7 mmol L^{-1}; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 10 mmol L^{-1}; KH_2PO_4, 1.8 mmol L^{-1}. Solutions of PBS, 500 mmol L^{-1} NaOH, 500 mmol L^{-1} KOH, and 500 mmol L^{-1} H_2SO_4 were prepared in Milli-Q water (Simplicity UV ultrapure water system from Millipore with 18.2 MΩ cm at 25 °C). The mixtures of 16-mercaptohexadecanoic acid (16-MHDA) 0.2 mmol L^{-1} and 11-(ferrocenyl)-undecanethiol (11-Fc) 2 mmol L^{-1} were prepared in anhydrous ethanol. Mixtures of 200 mmol L^{-1} *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*′-ethylcarbodiimide (EDC) and 50 mmol L^{-1} *N*-hydroxysuccinimide (NHS) were prepared in Milli-Q water. Supporting electrolyte solution of 20 mmol L^{-1} tetrabutylammonium perchlorate (TBA-ClO_4) for electrochemical measurements was prepared in a mixture of acetonitrile: Milli-Q water (20/80, v/v).

2.2. Electrochemical measurements

All experiments were performed at room temperature (25 °C) using TBA-ClO_4 solution. Cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) measurements were performed using an AUTOLAB potentiostat, model PGSTAT302N, equipped with a frequency response analysis (FRA) module, and the NOVA software from Metrohm. A three-electrode system was used, including the gold electrode as the working electrode (2 mm diameter), a platinum mesh as the counter electrode and a homemade Ag/AgCl, saturated with KCl solution as the reference electrode. All potentials referred to in this work are relative to Ag/AgCl, (saturated KCl).

2.3. Surface engineering

Firstly, gold electrodes were mechanically polished with 1.0, 0.3, and 0.05 μm grain-sized aluminum oxide aqueous suspensions (Buehler) followed by sonication in deionized water for 5 min to remove adherent particles. CVs for the electrochemical desorption step were performed in 500 mmol L^{-1} NaOH, from −1.7 to −0.7 V, 300 cycles, at a scan rate of 100 mV s^{-1}. After this, the electrodes were immersed in stirred anhydrous ethanol for 20 min to reduce gold oxide (Tkac and Davis, 2008). Finally, a CV electrochemical cleaning step was performed in 500 mmol L^{-1} H_2SO_4 from −0.2 to 1.5 V, 25 cycles, at a scan rate of 100 mV s^{-1}, followed by CV gold oxide stripping in H_2SO_4 500 mmol L^{-1} from 0.7 to 0.2 V, 10 cycles, at a scan rate of 100 mV s^{-1}. Electroactive areas were calculated based on the cyclic voltammograms from the electrochemical cleaning step by integrating the cathodic peak on the last scan (25th cycle) using a value of 482 μC cm^{-2} (Goes et al., 2012; Marques et al., 2015). These determinations (0.036 ± 0.002 cm^2) were used to normalize the electrochemical immittance functions.

As described previously, the ArtinM immobilization strategy was based on a bifunctional self-assembled monolayer (SAM) (Santos et al., 2014a) consisting of a spacer tethered redox probe thiol for signal transduction (11-Fc) and a carboxylic end group thiol (16-MHDA) for lectin attachment. Using this approach, predoping of the analytical solution with a redox probe for electrochemical signal analysis and measurements is not necessary. The

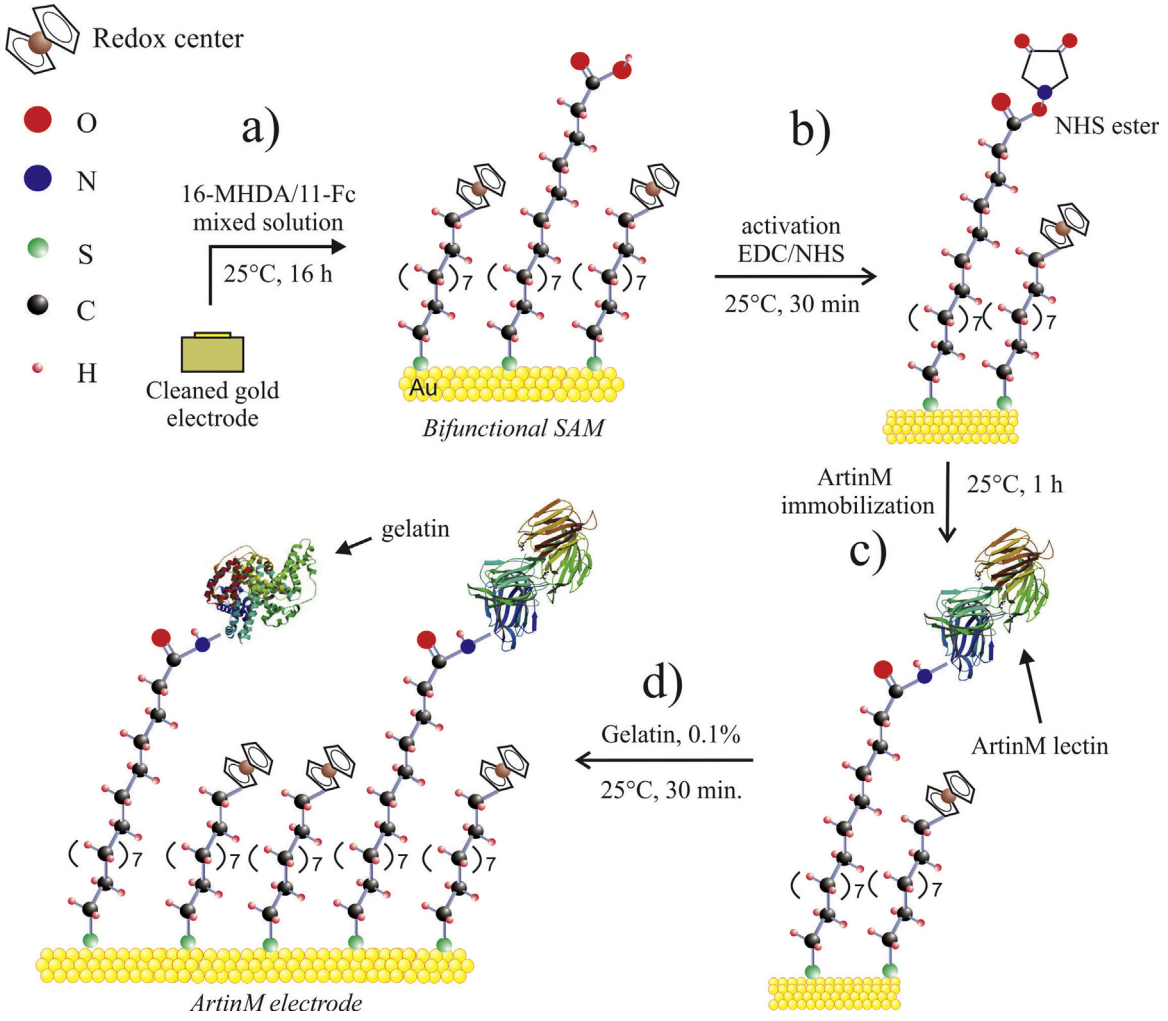


Fig. 1. Schematic stepwise description of ArtinM electrode preparation before HRP detection and biosensing analysis. (a) Functionalization of gold surface with a mixed solution containing 11-Fc (to be used as transduction electrochemical signal) and 16-MHDA (ArtinM attachment). (b) Activation of carboxylic groups using EDC/NHS standard chemistry procedure, forming the NHS ester to react with amino groups present in ArtinM as shown in (c). (d) Blocking of non-specific sites with gelatin 0.1% to minimize interference (molecules not drawn to scale).

electroactive bifunctional SAMs were constructed by immersing a cleaned gold electrode in a mixture of 0.2 mmol L^{-1} 16-MHDA and 2.0 mmol L^{-1} 11-Fc in ethanol for 16 h at 25 °C. The carboxyl groups of 16-MHDA were activated with an aqueous solution containing 0.4 mol L^{-1} EDC and 0.1 mol L^{-1} NHS for 30 min in order to obtain NHS ester. Subsequently, the electrode was washed in PBS, dried with nitrogen gas, and immersed in 0.15 mg mL^{-1} ArtinM solution for 1 h. Finally, the ArtinM electrodes were immersed in a 0.1% gelatin solution for 30 min to block unspecific sites (Fig. 1).

It must be stressed that it was not used any substrate (such as hydrogen peroxide) that could provoke HRP parallel enzymatic redox catalytic signal and thus interference during impedance analysis. Consequently, the HRP redox activity is absent in our experiments and does not interfere with that electrochemical signal of the tethered redox couple. Indeed, previously investigation of H_2O_2 enzymatic reaction catalyzed by HRP immobilized interface demonstrates and confirms this statement (Pesquero et al., 2010).

Impedance analysis and cyclic voltammetry measurements were taken after each step of the bioassay interface design to confirm an appropriate receptive surface construction. After SAM formation, CV was performed from 0.0 to 0.7 V in three cycles at a scan rate of 100 mV s^{-1} to obtain the redox-in potential $E_{in}=(E_{ox}+E_{red})/2$, where E_{ox} and E_{red} are the oxidation and reduction peak potentials, respectively. Impedance analyses were performed at E_{in} in a frequency range of 0.01–100,000 Hz (60 frequencies logarithmically arranged), peak-to-peak amplitude of 10 mV, 0.125 s of maximum integration time and one cycle as minimum number of cycles to integrate.

CV electrochemical desorption step was performed in 500 mmol L^{-1} KOH with potential ranging from −0.8 to −1.4 V, 15 cycles at a scan rate of 100 mV s^{-1} to obtain the bi-functional SAM surface coverage (Γ_{SAM}). 11-Fc surface coverage ($\Gamma_{11\text{-}Fc}$) was estimated by anodic peak integration of the CV as described in more detail previously (Marques et al., 2015).

2.4. Assessment of ArtinM-HRP interaction and HRP detection by immittance functions

After receptive and redox active surface construction, and its characterization by CV and EIS, the ArtinM functional electrodes were exposed for 30 min to eight different concentrations of the HRP glycoprotein, ranging from 0.5 to 100 nmol L^{-1} prepared in PBS solution. After exposure to each HRP concentration, the electrodes were washed in PBS and impedance analysis was carried-out at E_{in} using TBA-ClO_4 as the supporting electrolyte, wherein modulation frequency varied in 60 steps (frequency range of 0.01–

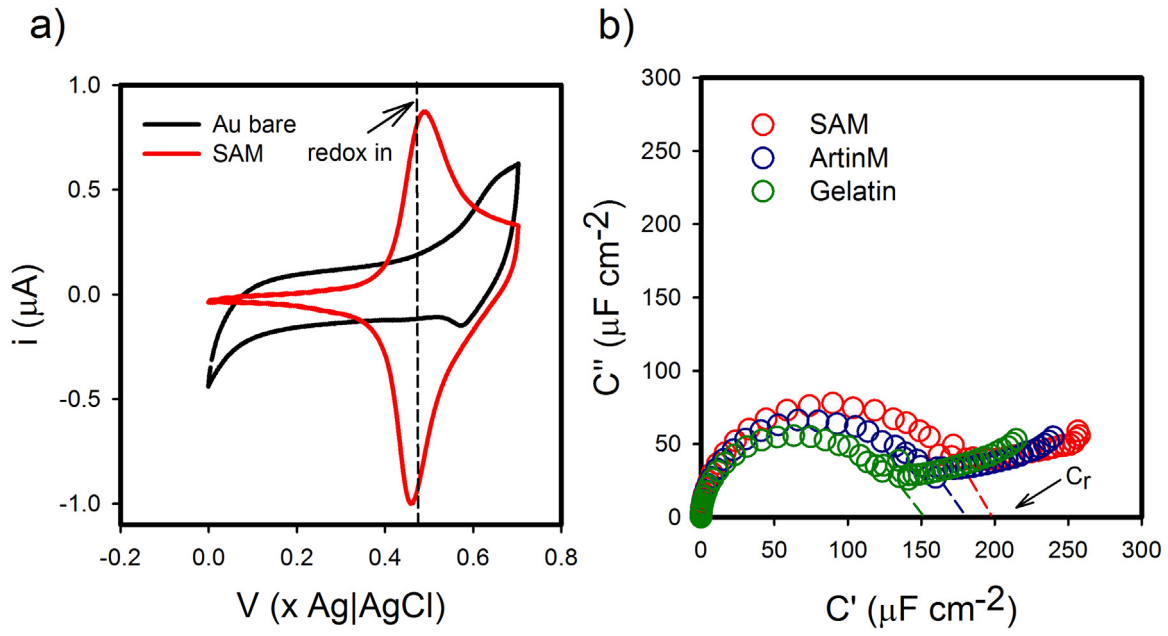


Fig. 2. (a) Cyclic voltammogram (3rd cycle) obtained before (bare Au) and after the formation of an electroactive SAM over the gold electrode. Note the presence of redox peaks in CV related to formation of the electroactive SAM, which is clearly absent for the bare gold response. The dashed line demarcates the E_{in} potential, where impedance analyses were performed (corresponding to 0.47 V). CVs were obtained in 20 mmol L^{-1} of TBA-ClO_4 in potentials ranging from 0 to 0.7 V at a scan rate of 100 mV s^{-1}. (b) Nyquist diagram obtained at E_{in} potential corresponding to different steps: formation of electroactive SAM, incorporation of ArtinM, and blocking in 0.1% gelatin. C_r is easily obtained from the diameter semicircle for each step (Marques et al., 2015), as shown in the Nyquist capacitive diagram.

100,000 Hz), with peak-to-peak amplitude of 10 mV. A typical acquisition of impedance data over the full frequency range (as described in Section 2.3), considering the incubation time, is approximately 50 min. Consequently, acquisition of eight-point calibration curve, including blank measurement, requires approximately 7.5 h for a full analytical curve. All the assays were performed in triplicate (three different electrodes).

The analytical complex immittance functions ($ImFs^*$) used in this work were impedance (Z^*), admittance (Y^*), capacitance (C^*) and modulus (M^*). Their phasorial relationships are, in considering impedance complex ($Z^*(\omega) = Z' + jZ''$) (Patil et al., 2015):

$$C^*=1/j\omega Z^* \quad (1)$$

$$Y^*=j\omega C^*=1/Z^* \quad (2)$$

$$M^*=j\omega Z^* \quad (3)$$

where $j=\sqrt{-1}$ and $\omega=2\pi f$.

As can be observed, all complex immittance functions are related to impedance (Z^*) and since they have modulus ($|ImFs|$), real ($ImFs'$), and imaginary parts ($ImFs''$), it constitutes 12 different parameters for any sample frequency. In this work, in addition to these functions, six more parameters were added, based on the relationship between imaginary and real parts of ImFs and the inverse of both real and imaginary parts of capacitance (Z''/Z', C''/C', Y''/Y', M''/M', $1/C'$ and $1/C''$). Consequently, there were 18 different parameters overall as the analytical signal for each frequency for different HRP concentrations.

The response (R) obtained for each parameter was evaluated across a frequency range as the target concentration (HRP) was varied. In order to normalize the transduction signal for each ImF the relative response was used. The relative response (RR), for each HRP concentration in a certain frequency (f), was, for all $ImFs$, defined as:

$$RR^f_{[HRP]}(\%) = \left[\left(R^f_{[HRP]} - R^f_0 \right) / R^f_0 \right] x\ 100 \quad (4)$$

where R^f_0 represents the initial value of ImF in the absence of analyte (blank measurement) and $R^f_{[HRP]}$ is the value of ImF after exposure of the ArtinM functionalized electrode to the corresponding HRP concentration at the same frequency f. Collecting RR over a range of target concentrations, it was possible to plot n analytical curves for each ImF, wherein n represents the number of frequencies used in the assay. The optimal frequency corresponds to the analytical curve which has a higher (in modulus) correlation coefficient (Pearson, r_{xy}), higher determination coefficient (R^2), higher sensitivity (angular coefficient), lowest limit of detection (LOD, defined as 3.3 × SD, where SD means standard deviation of the blank (Long and Winefordner, 1983)), and lowest relative standard deviation (RSD). In this work, the optimized frequencies for each parameter were reported from those corresponding to $|r_{xy}| > 0.97$, $R^2 > 0.95$ and RSD < 18%. In order to evaluate non-specific interaction, BSA (a non-glycosylated protein) was used at 100 nmol L^{-1}.

3. Results and discussion

3.1. Design of the bioassay interface

Despite the facility to construct functionalized SAMs on gold surfaces, several studies have demonstrated the importance of the pre-cleaning protocol to assure reproducibility and appropriate density packing of these monolayers (Tkac and Davis, 2008). In this work, chemical reduction (in basic media), mechanical, electrochemical polishing, and electrochemical gold oxide stripping were combined as suggested by Tkac and Davis (2008). Using this protocol, the bifunctional SAM (with redox and glycoprotein receptive function) presented a surface coverage of $(5 \pm 1) \times 10^{-10}$ mol cm^{-2}, a value in the same order of magnitude as that of alkanethiol SAMs (7.5×10^{-10} mol cm^{-2}) (Love et al.,

2005). The 11-Fc surface coverage ($\Gamma_{11\text{-Fc}}$) estimated by using the anodic peak of the CV (SAM in Fig. 2*a*) was of $(2.5 \pm 0.3) \times 10^{-10}$ mol cm^{-2} (more details are given in Supplementary Material). Both values correlate with those obtained in a previous study using the same bi-functionalized SAM (Marques et al., 2015).

The SAM functionalization step was evaluated by CV and EIS, with the latter converted to complex capacitance (Eq. (1)). From the Nyquist complex capacitance diagrams it was possible to obtain/access the redox capacitance signal (C_r), which is related to the ability of the redox SAM in storage energy when a certain electrical potential is applied and the redox centers are proportionally occupied (Bueno et al., 2012; Bueno and Davis, 2014b; Santos et al., 2014b; Bueno et al., 2015). The C_r signal is sensitive to environmental changes caused by antibody-antigen interaction on the interface (Fernandes et al., 2013, 2014; Lehr et al., 2014; Marques et al., 2015; Santos et al., 2015b). As mentioned previously, this can alternatively be used as the transduction signal for glycoprotein binding on interfaces containing ArtinM as the receptive centers. The binding event usually represents a decrease in C_r signal (Fernandes et al., 2014; Santos et al., 2014a, 2014b; Marques et al., 2015, Santos et al., 2015b). More details regarding equivalent circuit modeling of electrochemical capacitive interfaces comprising of redox electroactive films are provided in literature (Fernandes et al., 2014; Lehr et al., 2014; Marques et al., 2015).

As depicted in Fig. 2a, CV responses obtained before SAM formation over the gold surface does not show any redox activity (any redox peaks are identified) as expected. However, when SAM is formed (chemically or covalently attached) on the gold electrode, two clear peaks are evidenced on CV response, exhibiting a reversible redox process with the anodic and cathodic current peak approaching the unit ($ip_a/ip_c \sim 1$) and with a very small potential difference between these peaks, ~30 mV. The vertical line in Fig. 2a demarcates the redox-in potential (E_{in} ~0.47 V) which corresponds to the formal potential of this highly reversible electrochemical process. This redox-in potential is very useful since it is the potential in which the maximum redox capacitive activity is achieved. Fig. 2b shows the Nyquist capacitive plots obtained at E_{in} for each step of construction of the redox active and glycoprotein bio-receptive interfaces. At E_{in} it can be seen that the electroactive SAM, without bio-receptive centers, exhibits a C_r value of ~200 μF cm^{-2}. After ArtinM is attached or immobilized on the interface, the redox capacitance decreased to C_r ~178 μF cm^{-2} which indicates environmental perturbation around ferrocenyl groups due to lectin attachment/binding to this interface. Subsequently gelatin was added to block the remaining non-specific sites and as expected an additional decrease was observed C_r ~150 μF cm^{-2}. Altogether, these results demonstrate proper electrode modification (or construction of the appropriate receptive interface) for detection of HRP as the target glycoprotein.

3.2. Glycoprotein detection, analytical curves, and sensitivity

Redox tagged and either ArtinM functionalized electrodes, prepared as described in the previous section, were exposed for 30 min to different HRP concentrations (0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 75.0, 100.0 nmol L^{-1}) in PBS (pH 7.4). After this, the electrodes were washed with PBS and impedance analysis were performed (in the supporting electrolyte solution containing 20 mmol L^{-1} TBA-ClO_4, 20:80, acetonitrile: water) at E_{in}.

The principle of *ImFs* electroanalysis is based on measuring the impedance spectrum to obtain its real (Z') and imaginary (Z'') components, obviously at different frequencies. After this, using mathematically defined immittance functions (Eqs. (1)–(3)), the real (*ImFs'*), imaginary (*ImFs''*), and the modulus (|*ImF*|) of all *ImFs* can be obtained. By adding the ratios (imaginary component divided by its real part) and the inverse of imaginary and real parts of capacitance, it was herein possible to obtain 18 analytical parameters that could be used to construct analytical curves by measuring the impedance spectrum of the interface chemically incubated at different target concentrations, as detailed in the experimental section.

The advantages of using *ImFs* as the electroanalytical transduction signal in clinical or bioassays is sustained on the capability of optimizing the frequency for each *ImF*, which corresponds to accomplishing the most sensitive transduction signal with the lowest LODs possible (usually it has been achieved pico to nanomolar range). Thus reproducibility and the fastest assays (corresponded to highest frequency) (Patil et al., 2015) are obtained for a given impedance (or electrical transfer function) spectrum.

In order to compare all *ImFs*, the relative response (*RR*) which, essentially, consists in measuring changes (in percentage) in *ImF* signal obtained for certain HRP concentration in comparison with the blank signal, was used (Eq. (4)). Once all *ImF* parameters can be used as the transduction signal and are obtained over a frequency range (Fig. 3), it is easy to determine the optimal frequency (or frequency range) where sensitivity is maximized and the linear regression presents $R^2 > 0.95$, $|r_{xy}| > 0.97$ (strong linear relationship) and RSD < 18%.

For example, while analyzing the *RR* signal for $1/C''$ parameter (Fig. 4) it is possible to verify that the optimized frequency range response is between 0.1 and 20 Hz (hachured area). By converting impedance raw data spectrum in all 18 analytical parameters, it is possible to verify the optimized frequency for each parameter used for signal transduction (as summarized in Table 1). All analytical curves are shown in Fig. 3S in Supplementary Material. HRP detection and sensitivity the $1/C''$ parameter at 7.04 Hz represents the most sensitive frequency (a sensitivity of 37% per decade of HRP concentration) with a LOD of 0.4 nmol L^{-1}, a value in the same order of magnitude as that obtained by the redox capacitive approach (0.2 nmol L^{-1}). In contrast, in analyzing the real part of admittance (Y'), a lower LOD of 0.06 nmol L^{-1} at a higher frequency (9.24 Hz) is obtained. Notably, all parameters are unresponsive to BSA, a non-glycosylated protein used here as the negative control (see Fig. 4S in Supplementary Material), demonstrating the selectivity of this assay methodology independently of any elected parameter.

Since the redox capacitance signal is spectroscopically (through capacitance spectroscopy analysis) assessed at low frequencies (Bueno and Davis, 2014b), it is clear that the signal of $1/C'$ approaches that obtained directly by extracting the redox capacitance signal ($1/C_r$), at low frequencies. Indeed, $1/C'$ signal presented similar value for LOD (~0.30 nmol L^{-1}) at 0.6 Hz either with a similar sensitivity of 23% decade^{-1} when compared with values obtained by $1/C_r$. This not only validates the proposed methodology but also demonstrates its consistency. Nonetheless, the time required (to construct an analytical curve with eight concentration points) in a complete analysis by using redox capacitance methodology, considering a frequency range from 100,000 Hz to 0.01 Hz (60 frequencies) and an incubation time of 30 min, is about 7.5 h (details in Section 2.3). On the other hand, by using $1/C'$ parameter at 0.6 Hz, for example, this will take approximately 4.5 h, which is a significant gain of time in constructing an electroanalytical calibration curve.

Interestingly, further analysis on a given set of *ImFs* clearly demonstrates the existence of an optimal range of frequencies where sensitivity does not change considerably. For example, the imaginary components of impedance and modulus (Z'' and M'') presents a broad constant sensitivity across a frequency range of 0.15–962 Hz (with a sensitivity in % decade^{-1} of 26 ± 4). The maximum sensitivity value is 30 at 245 Hz, $R^2 = 96\%$ (Fig. 5). This

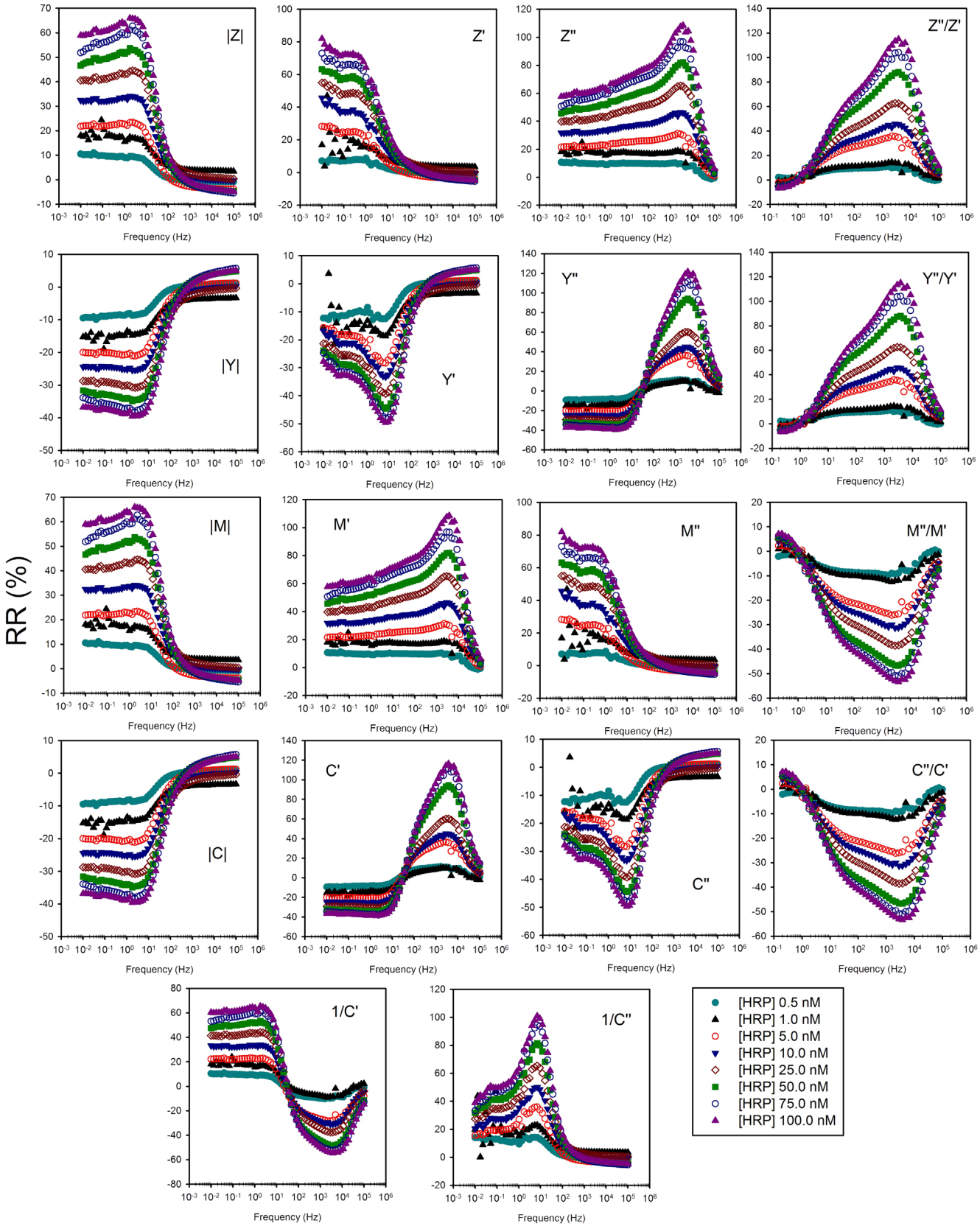


Fig. 3. Relative response (*RR*) of 18 parameters analyzed across a frequency range of 0.01–100,000 Hz for varying HRP concentrations from 0.5 to 100.0 nmol L^{-1}. Since *C**, *Y** and *M** are phasorially derived from *Z**, several functions show a similar response (For example, compare |*Z*| and |*M*|, |*C*| and |*Y*|.

feature allows analysis of a full range of frequencies instead of a single frequency without any loss of sensitivity and yet, in this case, higher than that obtained for redox capacitance approach ($1/C_r$ signal). In addition, this optimized frequency range (from 0.15 to 962 Hz) is time-advantageous when compared with a full frequency range (usually from 0.01 to 100,000 Hz in redox

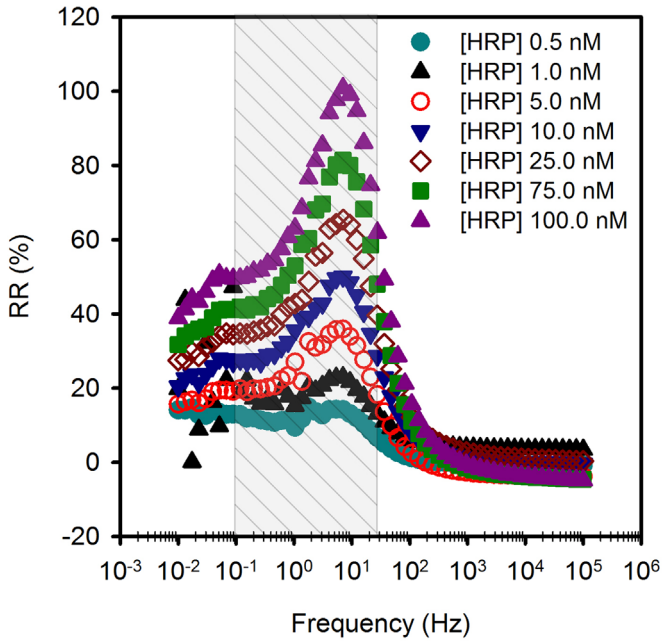


Fig. 4. $1/C''$ response as a function of HRP concentration at the full range of frequencies. The hachured area demarcates the frequency range (0.1–20 Hz) corresponding to frequencies where the most sensitive analytical plots can be constructed ($R^2 > 95\%$).

capacitance), since in the former it necessarily takes five minutes of measurement while in the latter it generally needs about 17 min in a similar setup procedure.

In summary, similar to previous results and analyses performed using *ImFs* as transduction signal for protein target detection (Patil et al., 2015), the same methodology was successfully applied here to provide a faster yet sensitive analysis/detection for glycoproteins in comparison with redox capacitance (Santos et al., 2014a) and classical impedance measurements (Bertok et al., 2013b). In the next section, we expand the application of *ImFs* by quantifying the affinity interaction of the glycoprotein-lectin system, a biological system which is of relevant importance in some biomedical studies and applications (Mihara et al., 2010; Nelson and Cox, 2012).

3.3. Glycoprotein-lectin binding affinity studies

The adsorption of proteins to functionalized surfaces has received great attention (Fang et al., 2005; Chen et al., 2010; Rabe et al., 2011; Wiseman and Frank, 2012; Santos et al., 2015a) due to the possibility of quantifying bio-interaction (or bio-recognition) thus providing new insights in comprehending the role of certain proteins in biological systems (Nelson and Cox, 2012), specifically in cell-cell interactions (Ramburth and Dwek, 2011; Marchant et al., 2012; Carvalho et al., 2014). For example, lectins, a class of carbohydrate binding proteins, have been used as biorecognition elements for cancer cell detection (Ramburth and Dwek, 2011; Hu et al., 2013) which suffer some structural changes clearly as a consequence of disease onset (Reis et al., 2010; Clark and Mao, 2012). In addition, lectins are responsible for cell-cell adhesion in infectious processes and protozoan invasion (Monteiro et al., 1998; Marchant et al., 2012), and knowledge about the mechanism might help develop vaccines (Lourenço et al., 2006) and contribute to improvement of social health.

Although electrochemical methods such as electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and electrochemical capacitance spectroscopy (ECS) have recently received special attention due their high sensitivity (Carvalho et al., 2014; Santos et al., 2014a, 2014b), they are typically long-term experiments, and especially in the faradaic impedance approach, the redox probe needs to be used as doping in the analytical solution as previously mentioned (Daniels and Pourmand, 2007; Lisdat and Schäfer, 2008). As previously discussed, in a simple impedance assay (range of frequencies from 0.01 Hz to 100,000 Hz, 60 frequencies), about 17 min are required for each experimental point, disregarding the time for the incubation step (of about 30 min). On the other hand, use of an appropriate and optimized immittance function might reduce this time to a few seconds (even less) and represents an interesting alternative for protein-protein interaction studies (Patil et al., 2015). However, until now, there are no studies regarding the use of immittance functions and their parameters to construct isotherm curves for quantifying binding affinities. It is true that faradaic impedance (through R_{ct} signal) (Carvalho et al., 2014; Fernandes et al., 2014) and redox capacitance ($1/C_r$ signal) (Santos et al., 2014a) were used in the past, but due to optimization capacity of immittance functions, as observed in the previous section, we present herein an additional applicability of the

Table 1
Optimized frequencies for different *ImFs*. The K_a values obtained (details are given in Section 3.3) are similar to those calculated previously by using redox capacitive approach ($p > 0.09$) considering a significance level of 5%.

ImF	*Optimized frequency (Hz)*	R^2	r_{xy} *(Pearson)*	*Sensitivity (% decade^{-1})*	*LOD (nmol L^{-1})*	K_a ($x10^8$ L mol^{-1})
|Z|	2.35	0.96	0.98	24	0.30	1.2 ± 0.4
Z'	0.45	0.96	0.98	26	0.40	1.2 ± 0.3
Z''	0.45	0.96	0.98	22	0.30	1.3 ± 0.4
Z''/Z'	108.12	0.96	0.98	27	1.08	1.1 ± 0.3
|Y|	2.35	0.99	−0.99	−13	0.08	2.1 ± 0.7
Y'	9.24	0.99	−0.99	−16	0.06	2.3 ± 0.7
Y''	0.05	0.99	−0.99	−12	0.06	2.3 ± 0.8
Y''/Y'	108.12	0.96	0.98	27	1.08	1.1 ± 0.3
|C|	2.35	0.99	−0.99	−13	0.08	2.1 ± 0.7
C'	0.05	0.99	−0.99	−12	0.06	2.3 ± 0.8
C''	9.24	0.99	−0.99	−16	0.06	2.3 ± 0.7
C''/C'	4953	0.98	−0.99	−21	0.30	1.2 ± 0.2
$1/C'$	0.60	0.96	0.98	23	0.30	1.3 ± 0.4
$1/C''$	7.04	0.96	0.98	37	0.40	1.1 ± 0.4
|M|	2.35	0.96	0.98	24	0.30	1.2 ± 0.4
M'	0.45	0.96	0.98	22	0.30	1.3 ± 0.4
M''	0.45	0.96	0.98	26	0.40	1.2 ± 0.3
M''/M'	4953	0.98	−0.99	−21	0.30	1.2 ± 0.2
$1/C_r$	–	0.97	0.98	23	0.20	1.8 ± 0.7

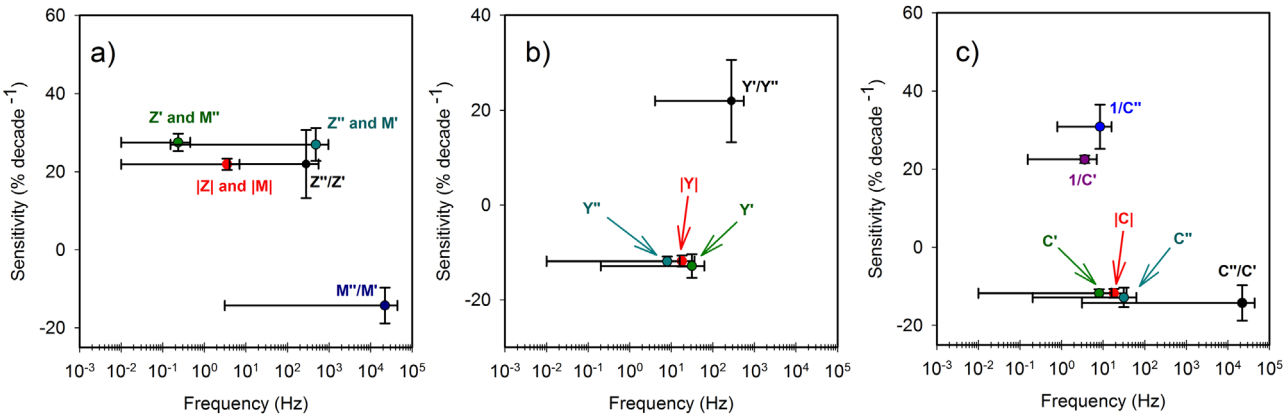


Fig. 5. Comparative transduction signal sensitivities in the full range of frequencies used in this work. Analysis for (a) Z^*, M^* and M''/M' Z''/Z'; (b) Y^* and Y''/Y' and (c) C^*, C''/C', $1/C'$ and $1/C''$. All sensitivities were extracted from analytical plots with $R^2 > 0.95$ in a certain frequency range.

immittance function approach related to quantification of protein-protein (specifically glycoprotein-lectin) binding interaction in diluted conditions, i.e. clearly within the Langmuir assumptions.

The Langmuir isotherm is the most used model to understand adsorption processes between a ligand in solution and an immobilized receptor on a receptive functionalized surface (Rabe et al., 2011). This isotherm model assumes that the molecular adsorbate behaves as an ideal gas, which means that adsorbates do not interact with their neighbors in solution or in the adsorbed form. In addition, the unit occupancy of the binding sites (i.e. only one site is available per adsorbate) with equal adsorption energy in isothermal conditions is assumed (Foo and Hameed, 2010; Rabe et al., 2011). Except for the latter assumption, in dilute conditions the previously described criteria can be achieved, and this condition is the main concern in using Langmuir model for the assessment and quantification of protein-protein binding interaction. In this work, nanomolar ligand (HRP) concentrations were used to minimize adsorbate-adsorbate interaction, considering that such dilute condition is only possible due to the highly sensitivity of frequency-response techniques such as EIS, ECS, and immittance function. This assumption facilitates analysis tremendously.

Considering the Langmuir model, the dynamic equilibrium between the ligand glycoprotein (G) and glycoprotein-lectin complex ($G-L$) is described by Eq. (5) (Santos et al., 2014a):

$$G+L \rightleftharpoons G-L \tag{5}$$

The affinity constant (K_a) for this process is given by Eq. (6):

$$K_a=\frac{[G-L]}{[G][L]} \tag{6}$$

where [ ] represents concentration. Assuming a surface coverage occupancy percentage given by θ and a percentage of available sites as $1-\theta$, Eq. (6) can be rewritten as

$$K_a[G]=\frac{\theta}{1-\theta} \tag{7}$$

Solving Eq. (7) for θ, it is possible to obtain the following expression:

$$\theta=\frac{K_a[G]}{1+K_a[G]} \tag{8}$$

Since the transduction signal value (S) corresponds to a certain amount of adsorbed ligand on the surface (discounting/subtracting the blank intrinsic signal), it is intrinsically proportional to the surface coverage (Γ, mol cm^{-2}). In assuming $S=\theta S_m$, where S_m is the maximum response of adsorption, when θ approaches unity we reach Eq. (9):

$$S=\frac{S_m K_a[G]}{1+K_a[G]} \tag{9}$$

That can be linearized as

$$\frac{[G]}{S}=\frac{[G]}{S_m}+\frac{1}{K_a S_m} \tag{10}$$

Thus, the K_a (binding affinity constant) value can be now easily obtained by the quotient between the angular ($1/S_m$) and linear ($1/K_a S_m$) coefficients of the linear function comprising $[G]/S$ versus $[G]$.

Interestingly, by using optimized frequencies for each immittance function, similar and characteristic saturation curves as theoretically expected for the Langmuir adsorption processes could be obtained, as exemplified in Fig. 6 for $|Z|$ at 2.35 Hz (more details in Fig. 5S in Supplementary Material). Indeed the transduction signal could be associated with the amount of protein adsorbed on the sensor surface and the maximum signal corresponding to the saturation value, i.e. when no considerable signal variation is observed after a given saturated concentration. Using relative response RR as transduction signal (i.e.$S=RR$), the K_a value for the HRP-ArtinM interaction using all immittance functions was calculated (Table 1).

As shown, all values were compared with that obtained using the redox capacitance approach [for which obtained value was $(1.8 \pm 0.7) \times 108$ L mol^{-1}, in good agreement with that previously reported, $(1.6 \pm 0.6) \times 10^8$ L mol^{-1}) (Santos et al., 2014a)] and they are invariably similar ($p > 0.09$, $\alpha = 0.05$). This demonstrates the feasibility of this approach in obtaining K_a values in a faster and simpler manner by the immittance function compared with processes using redox capacitance (Santos et al., 2014a) or charge transfer resistance (Carvalho et al., 2014; Fernandes et al., 2014). For example, in using $1/C''$ parameter obtained from the complex capacitive function, the optimized frequency was 7.04 Hz, which corresponds to a rapid measurement (4 s) for each point using similar setup procedure as described in Section 2.3, clearly demonstrating the viability of the approach to be applied in development of rapid and reliable glycoarrays.

4. Final remarks and conclusions

Glycoprotein detection is very important for clinical applications since alterations in carbohydrate structure content (aberrant glycosylation) is associated with diseases, especially neurodegenerative events and cancer. These macromolecules play important roles in biological phenomena, such as cell signaling and cell-cell interaction in invasive processes. Since lectins are carbohydrate-

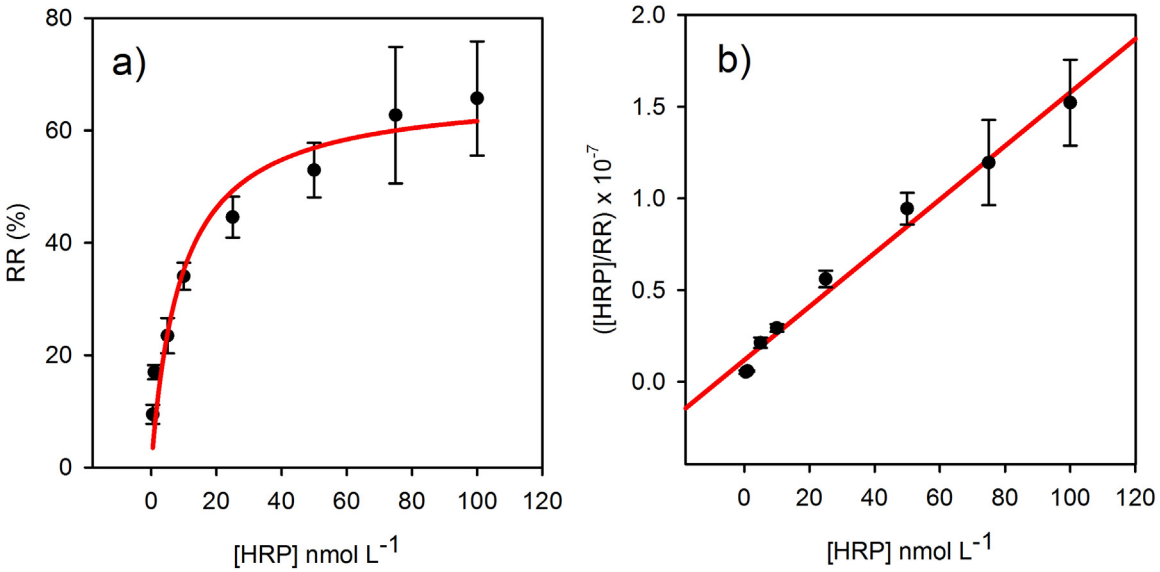


Fig. 6. Exemplification of (a) saturation curve and (b) its linearized form using the data of |Z| at 2.35 Hz (Eq. (10)), $R^2=0.99$. Note that *RR* is the relative response defined by Eq. (4).

binding proteins, they can be used for both glycoprotein detection and evaluation of glycoprotein-lectin interaction. Electroanalytical techniques are a promising approach in quantification of glycoprotein-lectin interaction. Impedance assays are a promising technique among electrochemical approaches that have the sensitive and multiplexible capability to be used in the quantification of protein-protein interactions, in addition to being cost-effective and simple for automation. However, the need of collecting a full range of frequencies due to the necessary adjustment of raw data to a suitable equivalent circuit for extracting the analytical parameter (usually R_{ct} in faradaic impedance and capacitance in non-faradaic approach), and the need of initial presumption in fitting analysis are the limiting factors for these assays.

In this paper we overcome these limiting factors by extending immittance function electroanalysis and its applicability to glycoprotein-lectin assays for both highly sensitive glycoprotein detection and glycoprotein-lection interaction quantification without the requirement of equivalent circuit models or analysis of equivalent circuit parameters. Using this approach, we demonstrated that the time of measurement could be significantly reduced while maintaining high sensitivity below nanomolar limits of detection. Additionally, it was demonstrated that the affinity constant (K_a) can be obtained using any or all of the immittance function parameters, clearly demonstrating the feasibility of this approach in glycoprotein-lection studies and the need for future development of fully automatized and optimized glycoarrays.

Acknowledgments

This work was supported by the São Paulo state research funding agency (FAPESP), Royal Society and Newton Fund. The authors also acknowledge CNPq (141058/2013–7) and CAPES.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.04.043.

References

Adamczyk, B., Tharmalinga, T., Rudd, P.M., 2012. BBA Gen. Subj. 1820 (9), 1347–1353.
Asav, E., Sezgintürk, M.K., 2014. Int. J. Biol. Macromol. 66, 273–280.
Bedatty Fernandes, F.C., Patil, A.V., Bueno, P.R., Davis, J.J., 2015. Anal. Chem. 87 (24), 12137–12144.
Berggren, C., Bjanason, B., Johansson, G., 2001. Electroanalysis 13 (3), 173–180.
Berney, H., 2004. Capacitance affinity biosensors. In: Mirsky, V. (Ed.), Ultrathin Electrochemical Chemo- and Biosensors. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 43–65.
Berson, S.A., Yalow, R.S., 2006. Clin. Chim. Acta 369 (2), 125–143.
Bertok, T., Klukova, L., Sediva, A., Kasák, P., Semak, V., Micusik, M., Omastova, M., Chovanová, L., Vlček, M., Imrich, R., Vikartovska, A., Tkac, J., 2013a. Anal. Chem. 85 (15), 7324–7332.
Bertok, T., Sediva, A., Katrlik, J., Gemeiner, P., Mikula, M., Nosko, M., Tkac, J., 2013b. Talanta 108, 11–18.
Bohunicky, B., Mousa, S.A., 2011. Nanotechnol. Sci. Appl. 4, 1–10.
Bueno, P.R., Davis, J.J., 2014a. Anal. Chem. 86 (4), 1977–2004.
Bueno, P.R., Davis, J.J., 2014b. Anal. Chem. 86 (3), 1337–1341.
Bueno, P.R., Feliciano, G.T., Davis, J.J., 2015. Phys. Chem. Chem. Phys. 17 (14), 9375–9382.
Bueno, P.R., Mizzon, G., Davis, J.J., 2012. J. Phys. Chem. B 116 (30), 8822–8829.
Carvalho, F., Martins, D., Santos, A., Roque-Barreira, M.-C., Bueno, P., 2014. Biosensors 4 (4), 358–369.
Carvalho, F.C., Soares, S.G., Tamarozzi, M.B., Rego, E.M., Roque-Barreira, M.-C., 2011. PLoS One 6 (11), e27892.
Chen, S., Li, L., Zhao, C., Zheng, J., 2010. Polymer 51 (23), 5283–5293.
Chiriaco, M.S., Primiceri, E., Montanaro, A., de Feo, F., Leone, L., Rinaldi, R., Maruccio, G., 2013. Analyst 138 (18), 5404–5410.
Clark, D., Mao, L., 2012. Dis. Markers 33 (1), 1–10.
Dam, T.K., Brewer, C.F., 2002. Chem. Rev. 102 (2), 387–430.
Daniels, J.S., Pourmand, N., 2007. Electroanalysis 19 (12), 1239–1257.
Dennis, J.W., Granovsky, M., Warren, C.E., 1999. BioEssays 21 (5), 412–421.
Dias, W.B., Hart, G.W., 2007. Mol. BioSyst. 3 (11), 766–772.
Dwek, R.A., 1996. Chem. Rev. 96 (2), 683–720.
Fang, F., Satulovsky, J., Szleifer, I., 2005. Biophys. J. 89 (3), 1516–1533.
Fernandes, F.C.B., Góes, M.S., Davis, J.J., Bueno, P.R., 2013. Biosens. Bioelectron. 50, 437–440.
Fernandes, F.C.B., Santos, A., Martins, D.C., Góes, M.S., Bueno, P.R., 2014. Biosens. Bioelectron. 57, 96–102.
Foo, K.Y., Hameed, B.H., 2010. Chem. Eng. J. 156 (1), 2–10.
Giménez-Romero, D., Bueno, P.R., Pesquero, N.C., Monzó, I.S., Puchades, R., Maquieira, Á., 2013. J. Phys. Chem. B 117 (28), 8360–8369.
Goes, M.S., Rahman, H., Ryall, J., Davis, J.J., Bueno, P.R., 2012. Langmuir 28 (25), 9689–9699.
Homola, J., Yee, S.S., Gauglitz, G., 1999. Sens. Actuators B-Chem. 54 (1–2), 3–15.
Hu, Y.F., Zuo, P., Ye, B.C., 2013. Biosens. Bioelectron. 43, 79–83.
Höök, F., Kasemo, B., 2007. The QCM-D technique for probing biomacromolecular recognition reactions. In: Janshoff, A., e Steinem, C. (Eds.), Piezoelectric Sensors 5(12). Springer, Berlin Heidelberg, pp. 425–447.
Johari-Ahar, M., Rashidi, M.R., Barar, J., Aghaie, M., Mohammadnejad, D., Ramazani, A., Karami, P., Coukos, G., Omidi, Y., 2015. Nanoscale 7 (8), 3768–3779.
Laurent, N., Voglmeir, J., Flitsch, S.L., 2008. Chem. Commun. 37, 4400–4412.

Lebed, K., Kulik, A.J., Forró, L., Lekka, M., 2006. J. Colloid Interface Sci. 299 (1), 41–48.
Lehr, J., Fernandes, F.C.B., Bueno, P.R., Davis, J.J., 2014. Anal. Chem. 86 (5), 2559–2564.
Lisdat, F., Schäfer, D., 2008. Anal. Bioanal. Chem. 391 (5), 1555–1567.
Long, G.L., Winefordner, J.D., 1983. Anal. Chem. 55 (7), 712–724.
Lourenço, E.V., Bernardes, E.S., Silva, N.M., Mineo, J.R., Panunto-Castelo, A., Roque-Barreira, M.-C., 2006. Microb. Infect. 8 (5), 1244–1251.
Love, J.C., Estroff, L.A., Kriebel, J.K., Nuzzo, R.G., Whitesides, G.M., 2005. Chem. Rev. 105 (4), 1103–1170.
Luo, X., Davis, J.J., 2013. Chem. Soc. Rev. 42 (13), 5944–5962.
Marchant, J., Cowper, B., Liu, Y., Lai, L., Pinzan, C., Marq, J.B., Friedrich, N., Sawmynaden, K., Liew, L., Chai, W., Childs, R.A., Saouros, S., Simpson, P., Roque Barreira, M.C., Feizi, T., Soldati-Favre, D., Matthews, S., 2012. J. Biol. Chem. 287 (20), 16720–16733.
Marques, S.M., Santos, A., Gonçalves, L.M., Sousa, J.C., Bueno, P.R., 2015. Electrochim. Acta 182, 946–952.
Mayeux, R., 2004. NeuroRX 1 (2), 182–188.
Mihara, H., Tomizaki, K., Usui, K., 2010. FEBS J. 277 (9), 1996–2005.
Monteiro, V.G., Sares, C.P., De Souza, W., 1998. FEMS Microbiol. Lett. 164 (2), 323–327.
Nakamura-Tsuruta, S., Uchiyama, N., Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M., Totani, K., Ito, Y., Hirabayashi, J., 2008. FEBS J. 275 (6), 1227–1239.
Nelson, L., Cox, M.M., 2012. Lehninger principles of biochemistry. Freeman W.H. & Company.
Patil, A.V., Bedatty Fernandes, F.C., Bueno, P.R., Davis, J.J., 2015. Anal. Chem. 87 (2), 944–950.
Pedroso, M.M., Watanabe, A.M., Roque-Barreira, M.C., Bueno, P.R., Faria, R.C., 2008. Microchem. J. 89 (2), 153–158.
Pereira-Da-Silva, G., Carvalho, F.C., Roque-Barreira, M.C., 2012. Inflamm. Allergy Drug Targets 11 (6), 433–441.
Pesquero, N.C., Pedroso, M.M., Watanabe, A.M., Goldman, M.H.S., Faria, R.C., Roque-Barreira, M.C., Bueno, P.R., 2010. Biosens. Bioelectron. 26 (1), 36–42.
Pierce, M.M., Raman, C.S., Nall, B.T., 1999. Methods 19 (2), 213–221.
Rabe, M., Verdes, D., Seeger, S., 2011. Adv. Colloid Interface Sci. 162 (1–2), 87–106.
Ramburth, N.D.S., Dwek, M.V., 2011. Acta Histochem. 113 (6), 591–600.
Reddy, P.J., Sadhu, S., Ray, S., Srivastava, S., 2012. Clin. Lab. Med. 32 (1), 47–72.
Reis, C.A., Osorio, H., Silva, L., Gomes, C., David, L., 2010. J. Clin. Pathol. 63 (4), 322–329.
Ronkainen, N.J., Halsall, H.B., Heineman, W.R., 2010. Chem. Soc. Rev. 39 (5), 1747–1763.
Rosa, J.C., Greene, L.J., De Oliveira, P.S.L., Garratt, R., Beltramini, L., Resing, K., Roque-Barreira, M.-C., 1999. Prot. Sci. 8 (1), 13–24.
Rusling, J.F., Kumar, C.V., Gutkind, J.S., Patel, V., 2010. Analyst 135 (10), 2496–2511.
Safina, G., Duran, I.B., Alasel, M., Danielsson, B., 2011. Talanta 84 (5), 1284–1290.
Santos, A., Carvalho, F.C., Roque-Barreira, M.-C., Bueno, P.R., 2014a. Biosens. Bioelectron. 62, 102–105.
Santos, A., Carvalho, F.C., Roque-Barreira, M.-C., Zorzetto-Fernandes, A.L., Gimenez-Romero, D., Monzó, I., Bueno, P.R., 2015a. Langmuir 31 (44), 12111–12119.
Santos, A., Davis, J.J., Bueno, P.R., 2014b. J Anal Bioanal Tech. S7:016. http://dx.doi.org/10.4172/2155-9872.S7-016.
Santos, A., Piccoli, J.P., Santos-Filho, N.A., Cilli, E.M., Bueno, P.R., 2015b. Biosens. Bioelectron. 68, 281–287.
Santos-de-Oliveira, R., Dias-Baruffi, M., Thomaz, S.M., Beltramini, L.M., Roque-Barreira, M.C., 1994. J. Immunol. 153 (4), 1798–1807.
Silva, M.L.S., 2015. BBA Rev. Can. 1856 (2), 165–177.
Speight, R.E., Cooper, M.A., 2012. J. Mol. Recognit. 25 (9), 451–473.
Straus, W., 1981. Histochemistry 73 (1), 39–47.
Strimbu, K., Tavel, J.A., 2010. Curr. Opin. HIV Aids 5 (6), 463–466.
Su, L., Zou, L., Fong, C.-C., Wong, W.-L., Wei, F., Wong, K.-Y., Wu, R.S.S., Yang, M., 2013. Biosens. Bioelectron. 46, 155–161.
Surinova, S., Choi, M., Tao, S., Schüffler, P.J., Chang, C.Y., Clough, T., Vysloužil, K., Khoylou, M., Srovnal, J., Liu, Y., Matondo, M., Hüttenhain, R., Weisser, H., Buhmann, J.M., Hajdúch, M., Brenner, H., Vitek, O., Aebersold, R., 2015. EMBO Mol. Med. 7 (9), 1166–1178.
Takeda, Y., Matsuo, I., 2014. Isothermal calorimetric analysis of lectin–sugar interaction. In: Hirabayashi, J. (Ed.), Lectins 1200(18). Springer, New York, pp. 207–214.
Taleat, Z., Cristea, C., Marrazza, G., Mazloum-Ardakani, M., Săndulescu, R., 2014. J. Electroanal. Chem. 717–718, 119–124.
Tkac, J., Davis, J.J., 2008. J. Electroanal. Chem. 621 (1), 117–120.
Uludag, Y., Tothill, I.E., 2012. Anal. Chem. 84 (14), 5898–5904.
Voller, A., Bartlett, A., Bidwell, D.E., 1978. J. Clin. Pathol. 31 (6), 507–520.
Wang, J., 2006. Biosens. Bioelectron. 21 (10), 1887–1892.
Wiseman, M.E., Frank, C.W., 2012. Langmuir 28 (3), 1765–1774.
Yakovleva, M.E., Safina, G.R., Danielsson, B., 2010. Anal. Chim. Acta 668, 80–85.
Yang, P., Li, X., Wang, L., Wu, Q., Chen, Z., Lin, X., 2014. J. Electroanal. Chem. 732, 38–45.
Zachara, N.E., Hart, G.W., 2006. BBA Mol. Cell Biol. Lipids 1761 (5–6), 599–617.