

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 24/03/2019.

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

S237d Santos, Adriano dos  
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

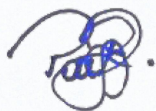
1. Biossensores. 2. Análise eletroquímica. 3. Espectroscopia de impedância. 4. Marcadores bioquímicos. 5. Lectinas. I. Título.

## 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.

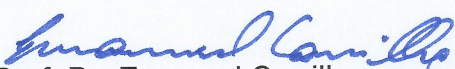
### BANCA EXAMINADORA



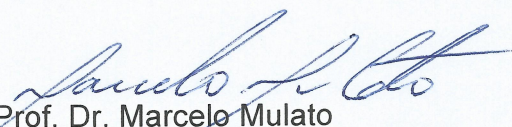
Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno (Orientador)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



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 piezométrica.*

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  $\beta$ -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: 2<sup>nd</sup> 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: 45<sup>a</sup> 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: 2<sup>nd</sup> 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: 2<sup>nd</sup> 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: 33<sup>rd</sup> 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: 31<sup>a</sup> 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: 14<sup>th</sup> 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-dietililenodiamina.** In: 30<sup>a</sup> 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: 30<sup>a</sup> 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-dietililenodiamina.** 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: 2<sup>nd</sup> 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-dietililenodiamina**. In: 30<sup>a</sup> 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-dietililenodiamina**. 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. 2<sup>nd</sup> 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. 30<sup>a</sup> 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 conseqüentemente, *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 destino 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?<sup>3</sup> 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)*

---

<sup>3</sup> 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  $\Gamma \approx 5 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$ . 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  $\Gamma \approx 3,7 \text{ mg/m}^2$ , 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  $\Gamma \approx 3,0 \text{ mg/m}^2$ , 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<sup>2</sup>. 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<sup>2</sup>, 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<sup>2</sup>, 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

<b>Figura 1</b> - A ciência como parecer ser: um quebra-cabeça complicado.....	22
<b>Figura 2</b> - Faixas de concentração de proteínas (valores aproximados) acessíveis para diferentes técnicas analíticas.....	25
<b>Figura 3</b> - Diferentes abordagens para detecção de proteínas.....	26
<b>Figura 4</b> - Representação esquemática de um biossensor.....	27
<b>Figura 5</b> - Representação de um sensor voltamétrico para detecção de lisozima baseado no uso de aptâmero.....	31
<b>Figura 6</b> - Ilustração de um processo ideal de impressão molecular para detecção de moléculas alvo utilizando tiol .....	33
<b>Figura 7</b> - Curvas e esquemas característicos da impedância eletroquímica.....	34
<b>Figura 8</b> - Representação esquemática do modelo de Góes para a capacitância de um sistema com propriedades de relaxação iônica.....	40
<b>Figura 9</b> - Modelo explicativo da capacitância eletroquímica.....	43
<b>Figura 10</b> - Voltamogramas típicos para o processo de limpeza do eletrodo de ouro.....	53
<b>Figura 11</b> - Voltamograma típico para o processo de dessorção do tiol da superfície de ouro.....	55
<b>Figura 12</b> - Curvas referentes ao teste de Kronig-Kramers (KK). .....	61
<b>Figura 13</b> - Curvas para análise da validação dos dados de impedância eletroquímica.....	61
<b>Figura 14</b> - Resultados de análise eletroquímica obtidos para a modificação do eletrodo de ouro utilizando 11Fc e PEG-tiol. ....	64
<b>Figura 15</b> - Voltamogramas e a dependência da intensidade da corrente de pico com a velocidade de varredura obtidos utilizando a superfície modificada.....	65
<b>Figura 16</b> - Diagrama de Nyquist obtidos nos processos de modificação do eletrodo com SAM, anti-PAP e bloqueio com BSA.....	66
<b>Figura 17</b> - Exemplo de sensograma obtido no processo de imobilização de anti-PAP.....	67
<b>Figura 18</b> - Etapa de bloqueio durante construção do biossensor para a detecção de PAP por meio da técnica de QCM.....	69
<b>Figura 19</b> - Análise por espectroscopia de impedância/capacitância obtidos para detecção de PAP.....	70

<b>Figura 20</b> - 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
<b>Figura 21</b> - Avaliação da propriedade anti-incrustante de superfície funcionalizada com filme de PEG-tiol .....	73
<b>Figura 22</b> - Curva de calibração para detecção da proteína biomarcadora PAP, utilizando faixa de concentração de 50-5000 pmol/L em soro comercial não diluído.....	73
<b>Figura 23</b> - Representação conceitual da engenharia de superfície desenvolvida para a detecção de D-dímero. ....	76
<b>Figura 24</b> - Análises eletroquímicas (VC e EIE) obtidos para a caracterização da superfície de ouro modificada com 11Fc e 16MHx. ....	77
<b>Figura 25</b> - Exemplo de sensograma obtido no processo de imobilização de anti-DD. ....	78
<b>Figura 26</b> - Etapa de bloqueio durante construção do biossensor para a detecção de D-dímero por meio da técnica de QCM.....	80
<b>Figura 27</b> - Análise por espectroscopia de impedância/capacitância para a detecção de D-dímero. ....	81
<b>Figura 28</b> - Gráficos de Bode para os dados de capacitância real (a) e imaginária (b) em função da frequência. ....	81
<b>Figura 29</b> - Curva de calibração obtida utilizando DD diluído em soro comercial.....	83
<b>Figura 30</b> - Caracterização eletroquímica obtida para o eletrodo de ouro modificado com 11Fc e 16MHx para a realização do glico-ensaio.....	87
<b>Figura 31</b> - Análise por espectroscopia de impedância/capacitância para o estudo da interação AntinM-HRP. ....	88
<b>Figura 32</b> - 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
<b>Figura 33</b> - Curva de calibração para a detecção da glicoproteína HRP utilizando o sinal de capacitância eletroquímica no potencial <i>in</i> .....	89
<b>Figura 34</b> - Exemplo de glycoarray para o estudo da interação entre lectinas e carboidratos..	93
<b>Figura 35</b> - 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

<b>Figura 36</b> - Resposta de $1/C''$ em função da concentração de HRP para toda faixa de frequências.....	96
<b>Figura 37</b> - Curvas analíticas obtidas nas frequências otimizadas para todos os 18 parâmetros analíticos e capacitância eletroquímica.....	97
<b>Figura 38</b> - Controles negativos para diferentes funções de imitância utilizando BSA .....	98
<b>Figura 39</b> - Sensibilidades para diferentes funções de imitância em função da faixa de frequências.....	98
<b>Figura 40</b> - Curvas de saturação obtidas, na frequência otimizada, para todos os 18 parâmetros analíticos (funções de imitância e suas relações).....	99

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Exemplos de biossensores eletroquímicos para detecção de diferentes biomarcadores. ....	38
<b>Tabela 2</b> - Substâncias, suas procedências e finalidades. ....	49
<b>Tabela 3</b> - 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
<b>Tabela 4</b> - 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
<b>Tabela 5</b> - Frequências otimizadas de diferentes funções de imitação ( <b><i>ImFs</i></b> ) para o estudo da interação ArtinM-HRP. ....	96

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	23
2.1 Capacitância redox ou eletroquímica.....	39
<b>3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....	46
<b>4 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	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
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	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
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	101
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	104
<b>APÊNDICE A</b> .....	121
<b>APÊNDICE B</b> .....	136
<b>APÊNDICE C</b> .....	143
<b>APÊNDICE D</b> .....	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),<sup>1</sup> 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*<sup>2</sup> 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 (*enzyme-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,<sup>3-6</sup> que partem de engenharias criativas e ao mesmo tempo intrincadas (como o uso de nanotubos e nanopartículas),<sup>7,8</sup> 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,<sup>9</sup> e recaía 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,<sup>10</sup> e despontava frente aos métodos ópticos e piezelétricos discutidos na literatura da época.<sup>11,12</sup> 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:<sup>13</sup> 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.<sup>14</sup> O mesmo se repete para o câncer de ovário (de 5% para 90%)<sup>14</sup> e de próstata (de 30% para 99%).<sup>15</sup> 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.<sup>16</sup>

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**<sup>b</sup> que “*existem muitos espaços lá embaixo*” (de seu discurso “*There’s plenty of room at the bottom*” proferido no Instituto de Tecnologia da

---

<sup>b</sup> **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 alceno, alceno, ou grupo de átomos contendo carbono) sobre ouro, realizada por Nuzzo e Allara em 1983.<sup>17</sup> 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),<sup>18-20</sup> 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, conseqüentemente, 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.<sup>1,21,22</sup>

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

---

---

piezométrica (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 piezométrica. 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 impedância,<sup>23,24</sup> 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 piezométrica 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

---

## 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  $4 - 5 \times 10^{-10} \text{mol/cm}^2$ , na mesma ordem de grandeza do valor teórico reportado para o empacotamento denso de tiol em ouro cristalino ( $7,5 \times 10^{-10} \text{mol/cm}^2$ ).

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  $\Delta f$ ,  $\Gamma_{\text{anti-PAP}} = 3,7 \text{ mg/m}^2$ , 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<sup>103</sup> 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 ( $R > 0,90$ ).<sup>160</sup> Os ensaios mostram-se

---

---

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

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  $\Gamma_{anti-DD} = (3,0 \pm 0,1) \times 10^{-7} \text{ g/cm}^2$  ou  $\approx 3,0 \text{ mg/m}^2$ , 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)<sup>179</sup>, 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- $p > 0,09$ ;  $\alpha=0,05$ ), 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 admitância são promissores para o desenvolvimento de dispositivos eletroanalíticos para diagnóstico clínico, uma vez que os biomarcadores investigados nesta tese foram detectados na ordem de  $\sim 10^{-15} - 10^{-9}$  mol/L, e com faixa linear que se situa na região clinicamente útil; 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  $\beta$ -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 diagnosis 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. Impedance 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.clinicadrhusein.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](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.; HINOUE, 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 applications**. 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 LATORIA, 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 ELSHAFFEY, 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 Myoglobin (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 In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 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. Labelless 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.; MAHASHI, 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 Kyo. 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 prostatic 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. Plasma 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.; HAFIYEDH, 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 Wiley & 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.
-