

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

SUPERFÍCIES CAPACITIVAS E IMPEDIMÉTRICAS COMO PLATAFORMA

ELETROQUÍMICA PARA DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES

CLINICAMENTE RELEVANTES

Flávio Cesar Bedatty Fernandes

TESE DE DOUTORADO

2015

Flávio Cesar Bedatty Fernandes

SUPERFÍCIES CAPACITIVAS E IMPEDIMÉTRICAS COMO PLATAFORMA
ELETROQUÍMICA PARA DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES CLINICAMENTE
RELEVANTES

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno.
Co-orientador: Prof. Dr. Márcio de Sousa Góes

ARARAQUARA – 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

F363s	<p>Fernandes, Flávio Cesar Bedatty Superfícies capacitivas e impedimétricas como plataforma eletroquímica para determinação de biomarcadores clinicamente relevantes / Flávio Cesar Bedatty Fernandes – Araraquara : [s.n], 2015 124 f. : il.</p> <p>Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Paulo Roberto Bueno Coorientador: Márcio de Sousa Góes</p> <p>1. Biossensores. 2. Análise eletroquímica. 3. Capacitância redox. 4. Funções de imitância. 5. Química de superfície. I. Título.</p>
-------	--

Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

FLÁVIO CESAR BEDATTY FERNANDES

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

Araraquara, 31 de julho de 2015.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. PAULO ROBERTO BUENO (Orientador)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara – SP


Prof. Dr. NELSON RAMOS STRADITTO
Instituto de Química / UNESP / Araraquara – SP


Prof. Dr. HOMERO MARQUES GOMES
Faculdade de Ciências e Tecnologia / UNESP / Presidente Prudente – SP


Prof. Dr. MARCELO MULATO
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras / USP / Ribeirão Preto - SP


Prof^a. Dr^a. LÚCIA HELENA MASCARO
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia / UFSCAR / São Carlos - SP

DADOS CURRICULARES

Nome: Flávio Cesar Bedatty Fernandes

1) Formação

Ano	Título ou atividade	Instituição
2004-2008	Graduação	Faculdade de ciências e tecnologia de Presidente Prudente - UNESP
2009-2011	Mestrado	Instituto de Química de Araraquara - UNESP
2011- 2015	Doutorado	Instituto de Química de Araraquara - UNESP

2) Histórico profissional.

- Doutorado Sanduíche no exterior realizado na Universidade de Oxford – Oxford/UK financiado pelo CNPq – Vigência Fevereiro/2014 a Janeiro/2015.

- Bolsista didático ministrando a disciplina de Física I – Curso de Bacharelado em Química no período de 28/02/2012 a 18/07/2012. Disciplina de responsabilidade do departamento de Físico-Química, Instituto de Química, UNESP, campus de Araraquara.

- Bolsista didático ministrando a disciplina de Física I – Curso de Licenciatura em Química no período de 08/2012 a 12/2012. Disciplina de responsabilidade do departamento de Físico-Química, Instituto de Química, UNESP, campus de Araraquara.

- Estágio de docência na disciplina: Física Geral I realizado no período de 30/07/2012 a 08/12/2012 - Instituto de Química - UNESP, com uma carga horária de 60 horas (*).

- Estágio de docência na disciplina: Eletroquímica e Cinética realizado no período de 01/08/2011 a 13/12/2011 - IQ, com uma carga horária de 60 horas (*).

- Atividades de monitoria em Química geral e Química geral e experimental durante a graduação (FCT-UNESP 2006-2007).

3) Produção Bibliográfica

1. FERNANDES, FLÁVIO C.B.; SANTOS, ADRIANO; MARTINS, DENISE C; GÓES, MÁRCIO S.; BUENO, PAULO R. . Comparing label free electrochemical impedimetric and capacitive biosensing architectures. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 57, p. 96-102, 2014.
2. BEDATTY, FLÁVIO; SILVA, ALINE; RUFINO, JOSÉ; PEZZA, HELENA REDIGOLO; PEZZA, LEONARDO. Screening and determination of sulfonamide

- residues in bovine milk samples using a flow injection system. **Food Chemistry**, v. 166, p. 309-315, 2014.
3. FERNANDES, FLÁVIO C. BEDATTY; GÓES, MÁRCIO S.; DAVIS, JASON J.; BUENO, PAULO R. Label free redox capacitive biosensing. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 50, p. 437-440, 2013.
 4. LEHR, JOSHUA; FERNANDES, FLÁVIO C. BEDATTY; BUENO, PAULO R. ; DAVIS, JASON J. . Label-free Capacitive Diagnostics: Exploiting Local Redox Probe State Occupancy. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 2559-2564, 2014.
 5. AMOL, V. PATIL; FLAVIO C. BEDATTY FERNANDES; PAULO ROBERTO BUENO; JASON J DAVIS. Immittance Electroanalysis in diagnostics. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 2, p. 944-950, Dec. 2014.
 6. CECCHETTO, JULIANA; CARVALHO, FERNANDA C.; SANTOS, ADRIANO; FERNANDES, FLÁVIO C.B.; BUENO, PAULO R. . An impedimetric biosensor to test neat serum for dengue diagnosis. **Sensors and Actuators. B: Chemical**, v. 213, p. 150-154, 2015.
 7. DA SILVA, ALINE SANTANA; FERNANDES, F. C. B.; TOGNOLLI, JOÃO OLÍMPIO; PEZZA, LEONARDO; PEZZA, HELENA REDIGOLO. A simple and green analytical method for determination of glyphosate in commercial formulations and water by diffuse reflectance spectroscopy. **Spectrochimica Acta. Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy (Print)**, v. 79, p. 1881-1885, 2011.
 8. RUFINO, JOSÉ L.; FERNANDES, FLÁVIO C. BEDATTY; RUY, MAYARA S.; PEZZA, HELENA R.; PEZZA, LEONARDO. A simple spectrophotometric method for the determination of tetracycline and doxycycline in pharmaceutical formulations using chloramine-T. **Eclética Química**, v. 35, p. 139-146, 2010.
 9. PATIL, A.; FERNANDES, F. C. B.; BUENO, PAULO R.; DAVIS, J. J. . Graphene-based protein biomarker detection. **Bioanalysis (Print)**, v. 7, p. 725-742, 2015.
 10. **Patente** - Bueno, Paulo Roberto; DAVIS, J. J. ; FERNANDES, F. C. B. ; GOES, M. S. . Capacitance spectroscopy method and electrode. 2013, Grã-Bretanha. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: 1314402.7, data de depósito: 12/08/2013, título: "Capacitance spectroscopy method and electrode" , Instituição de registro:UK Patent Office.

*A minha amada esposa Lúgia,
por toda a dedicação, amor e respeito me dados*

*A minha mãe, Carmen,
por todo amor e confiança em mim depositados.*

*Aos meus irmãos, João e Elisângela,
por me servirem de inspiração,*

*Aos meus avós Lúdia e João Bedatty(**in memoriam**)
por toda a influência positiva e ensinamentos os quais quero
passar a meus filhos e netos*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar.

A minha amada esposa Lígia, por ser minha companheira de todas as horas me apoiando em todas as dificuldades enfrentadas no curso deste trabalho.

A minha mãe e meus irmãos, por fazerem parte da minha vida de forma tão intensa... amo vocês.

Ao professor Paulo Roberto Bueno, por toda a orientação, ensinamentos, apoio e amizade que me possibilitaram superar minhas dificuldades e adquirir o conhecimento necessário ao cumprimento deste trabalho. Desta forma, me levando a um melhor desenvolvimento profissional e humano.

Ao professor Márcio de Sousa Góes, meu co-orientador e grande amigo o qual com grande paciência, seriedade e sempre prezando primeiramente pelo meu aprendizado, me ajudou a fazer deste trabalho melhor.

A professor Jason J. Davis, por me dar a oportunidade de trabalhar em seu grupo no laboratório de Física e Química teórica do departamento de Inorgânica da universidade de Oxford, Oxford – Reino Unido, durante 2014/2015, onde fui recebido de forma acolhedora como um membro do grupo.

Desta forma agradeço aos meus colaboradores Matthew Cunningham, Daniel Trawny e Amol Patil que me ajudaram não só no desenvolvimento do meu trabalho mas também em minha adaptação tanto em aspectos profissionais quanto aos aspectos culturais durante minha estadia em Oxford.

Aos amigos do laboratório, Adriano, Denise, Juliana Cecchetto, Fernanda, Welder, por todo o companheirismo durante as horas de trabalho, bem como em prazerosas horas de entretenimento. Neste sentido, agradeço em especial ao Tiago que além de colega de trabalho é um amigo de todas as horas.

A todos os funcionários do Instituto de Química que contribuíram de forma direta ou indireta com a realização deste trabalho, em especial aos funcionários e funcionárias da biblioteca e da seção de pós-graduação.

Ao CNPq pelo apoio financeiro a realização do Doutorado Sanduíche no Exterior (SWE) (Processo: 202855/2013-9)

A CAPES pela bolsa institucional de doutorado.

Agradeço a todos que tenham contribuído a este trabalho mas que eu por ventura não tenha me lembrado neste momento.

A todos meu muito obrigado.

Não demonstre medo diante de seus inimigos. Seja bravo e justo e Deus o amará.
Diga sempre a verdade, mesmo que isso o leve à morte. Proteja os mais fracos e
seja correto. Assim, você estará em paz com Deus e contigo.

Possivelmente, creio eu, extraído de parte do lema e/ou do juramento dos Cavaleiros Templários no
século XII.

RESUMO

Neste trabalho está descrito a aplicação de superfícies moleculares nanoestruturadas com grupos redox confinados e elementos de reconhecimento específico (anticorpos) para detecção de biomarcadores clinicamente importantes como: proteína C-reativa (CRP), fosfatase prostática ácida humana (*h*PAP) e alfa-sinucleína. Em princípio, os grupos redox confinados contribuem para um carregamento interfacial substancial dependente do potencial que pode ser monitorado sensivelmente e resolvido na frequência por espectroscopia de impedância derivada em capacitância (ECE). O sinal de carregamento interfacial, aqui nomeado como capacitância redox (C_r), o qual tem a magnitude do sinal relacionado com a densidade de centros redox ocupados e a sua natureza quântica é sensível a modificações na superfície. Assim, o sinal C_r é capaz de traduzir sensivelmente eventos de ligações e reconhecimentos de alvos específicos sobre a superfície receptiva. Este novo método de transdução foi aplicado aqui usando superfícies de diferentes composições químicas construídos a partir de diferentes tipos de tióis como pentadecanotiol, 16-mercaptohexadecanóico ácido ou PEGlate conjugados com 11-ferrocenilundecanotiol em diferentes proporções. No primeiro estudo a CRP e a *h*PAP foram detectadas de uma forma específica, com uma faixa linear clinicamente útil e limites de detecção (L.D.) significativamente melhores do que outros trabalhos eletroquímicos previamente reportados na literatura (200 pmol L⁻¹ e 11 pmol L⁻¹ para CRP e *h*PAP, respectivamente). Adicionalmente, a ECE e a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram comparadas analiticamente mostrando resultados equivalentes para detecção de CRP por ambas as técnicas com a vantagem que a ECE não requer a adição de uma *probe* redox em solução. Também, as formas de imobilização hidrofóbica e covalente da espécie receptiva foram comparadas e a imobilização covalente mostrou resultados mais robustos do que a imobilização hidrofóbica do anticorpo. A última vantagem proposta neste trabalho foi a aplicação das análises de função de imitância (*ImFs*) que é baseada no uso de um portfólio de funções de imitância matematicamente derivadas e componentes relacionados, capazes, a partir do mesmo conjunto de dados, de permitir o aumento da sensibilidade das análises de detecção de biomarcadores e primordialmente encurtar o tempo de ensaios em comparação a análises impedimétricas realizadas usando abordagens faradaicas, não-faradaicas ou capacitiva redox tradicionais. O conceito de *ImF* foi primeiramente validado para métodos EIE para detecção de CRP e o desempenho analítico das *ImFs* foi superior ao parâmetro tradicional R_{ct} resultando em ensaios aproximadamente 12 vezes mais sensíveis e 10 vezes mais rápidos. O conceito de *ImF* foi também combinado com ECE para detecção de alfa-sinucleína e CRP alcançando valores de L.D. de $121,1 \pm 2,7$ pmol L⁻¹ e $7,4 \pm 3,1$ pmol L⁻¹, respectivamente. O ponto mais promissor nos resultados foi o curto tempo requerido para aquisição de dados, em que menos de 3 minutos por medidas em triplicatas foram necessários. Estes ensaios são *label free*, ultrassensíveis, específicos e acompanhados por uma boa faixa linear.

Palavras-chave: Biossensores, imunossensores, capacitância redox, funções de imitância, engenharia de superfície.

ABSTRACT

In this work we described the applications of nanostructured molecular surfaces containing redox tagged groups and specific recognition elements (here antibodies) for detection of clinically important biomarkers such as: C-reactive protein (CRP); human prostatic acid phosphatase (*hPAP*) and alpha-synuclein. In principle, the redox confined groups contributes to a substantial potential-dependent interfacial charging that can be sensitively monitored and frequency-resolved by impedance-derived capacitance spectroscopy (ECS). The interfacial charging signal, named herein as redox capacitance (C_r), which has the magnitude of signal related with the density of the redox centers occupied and its quantum nature is sensitive to surfaces modifications. Thus, the C_r signal is able to sensitively transduce the recognition and binding events of specific targets on the receptive surface. This novel transduction method was exemplified here using surfaces of different chemistries constructed from different kinds of thiols as pentadecanethiol, 16-mercaptohexadecanoic acid or PEGlate conjugated to 11-ferrocenyl-undecanethiol in different proportions. In the first study CRP and *hPAP* were detected in a specific way, with a clinically useful linear range and detection limits (L.D.) significantly better than others electrochemical works previously reported in the literature (200 pmol L⁻¹ and 11 pmol L⁻¹ for CRP and *hPAP*, respectively). Additionally, the ECS and electrochemical spectroscopic impedance (EIS) were analytically compared showing equivalent results for CRP detection by both techniques with advantage that ECS does not requires addition of a redox probe in solution. Also, hydrophobic and covalent immobilizations of the receptive specie were compared herein and the covalent immobilization showed more robust results than hydrophobic antibody immobilization. The last advantage proposed in this work was the application of the immittance function analysis (*ImFs*) which is based on the use of a portfolio of mathematically derived immittance functions and related components, capable, from the same raw data sets, of enabling increased assay sensitivity of biomarkers and markedly shorter assay times in comparison to impedance analyses performed using faradaic, non-faradaic or redox impedimetric/capacitive traditional approaches. The concept of *ImF* was firstly validated regarding EIS methods for CRP detection and the analytical performance of *ImFs* was superior to the traditional parameter R_{ct} , resulting in assays 12 fold more sensitive and approximately 10 fold faster. The *ImF* concept was also combined to ECS for alpha-synuclein and CRP detection archiving values of L.D. of 121.1 ± 2.7 pmol L⁻¹ and 7.4 ± 3.1 pmol L⁻¹, respectively. The most promising point in this result was the short time required to data acquisition, wherein less than 3 minutes per measurements in triplicate were required. These assays are label free, ultrasensitive, specific and accompanied by a good linear range.

Keywords: Biosensors, immunosensors, redox capacitance, immittance functions, surface engineering.

Prefácio

Para os leitores não familiarizados com o campo de diagnóstico, o capítulo de introdução descreve brevemente o contexto histórico do desenvolvimento de métodos de diagnósticos, os princípios gerais das metodologias de diagnósticos laboratoriais as quais são baseadas na detecção de biomoléculas consideradas marcadores clínicos, como por exemplo, várias proteínas. Adicionalmente, é dada uma breve descrição de algumas proteínas consideradas biomarcadoras de importância clínica. O capítulo 2 fornece a fundamentação teórica da técnica de espectroscopia de capacitância eletroquímica (ECE) usada neste trabalho, onde estão detalhados os princípios físicos de todo o desenvolvimento da ECE. O capítulo 3 descreve o procedimento geral de preparação dos eletrodos de ouro, como polimento e limpeza, necessários à construção das superfícies moleculares nanoestruturadas contendo *probe* redox confinada enquanto que aspectos específicos do procedimento experimental de cada conjunto de resultados aqui apresentados estão descritos junto a cada respectivo resultado. O capítulo 3 traz ainda um fluxograma geral dos experimentos e medidas desde a fase de limpeza dos eletrodos de trabalho até a obtenção das curvas analíticas. No capítulo 4 estão descritos os objetivos gerais e específicos deste trabalho. Por fim, os resultados da aplicação da ECE no desenvolvimento de novas metodologias de detecção de biomarcadores estão descritos nos capítulos 5, 6 e 7. O capítulo 6 em especial, descreve uma importante comparação do desempenho da ECE, na detecção da CRP, em comparação com a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) tradicional. Já no capítulo 7 está descrito a aplicação do conceito de funções de imitância no desenvolvimento de novos métodos de detecção eletroquímica de marcadores clínicos, abordagem esta que visa melhorar o desempenho analítico aumentando a sensibilidade e diminuindo tempo de aquisição e análise dos dados.

Lista de Figuras

Figura 1.1. Ilustração comparativa da sensibilidade alcançável para diferentes técnicas usadas no desenvolvimento de biossensores. Conforme pode ser notado técnicas capacitivas impedimétricas tem o potencial de oferecer os mais métodos sensíveis e, adicionalmente, em uma plataforma *label-free* (figura extraída e adaptada de *Engineering the Bioelectronic Interface Applications to Analyte Biosensing and Protein Detection*, capítulo 7 *Label-free Field Effect Protein Sensing*³⁵).....**30**

Figura 2.1. (a) Uma análise experimental de VC típica de uma superfície com *probe* redox confinada compreendendo um filme de proteína (azurina) imobilizado sobre uma monocamada de dodecanotiol. Está em destaque a larga contribuição da corrente capacitiva à corrente total, causada por uma distorção dielétrica. A velocidade de varredura foi de 100 mV s^{-1} e o eletrodo de calomelano saturado foi usado como referência. (b) Uma outra representação experimental de voltamograma cíclico (com diferente comportamento do anterior) de uma superfície com *probe* redox confinada compreendendo um filme de proteína no qual os parâmetros dominantes do circuito equivalente responsáveis pela corrente estão representados em termos dos componentes faradaicos (R_{ct} e C_r) e não-faradaico (C_m , R_u , e C_u). O elemento capacitivo da monocamada de suporte, C_m não gera contribuições significantes em nenhum potencial conforme discutido no trabalho de Góes et al¹⁵. (figura extraída e adaptada a partir de Bueno et al. *Analytical Chemistry*. v. 85, n. 1, p. 411-417)⁵⁶**36**

Figura 2.2 (a) O modelo proposto de circuito equivalente, para uma SAM, o qual considera os efeitos dielétricos onde R_u e C_u são a resistência não compensada e a capacitância, respectivamente. (b) O mesmo que em (a), mas com centros redox associados a SAM com a contribuição faradaica representada por uma ramificação na qual R_{ct} é a resistência a transferência de carga, C_r é a capacitância redox, R_s é a resistência da solução ou do eletrólito e C_m é a capacitância eletrônica pura, como por exemplo, a capacitância da monocamada sem a contribuição iônica (a linha pontilhada indica que a contribuição deste termo é baixa). (figura extraída e adaptada a partir de Bueno et al. *Analytical Chemistry* v. 85, n. 1, p. 411-417)⁵⁶**37**

Figura 2.3 Gráficos de Bode ilustrando o componente real (a) e o componente imaginário (b) da capacitância estando ambos os componentes resolvidos na frequência (representada apenas com a expoente na base 10). Os resultados em vermelho são para medidas obtidas no $E_{1/2}$, os resultados em preto são para medidas realizadas no E_{out} e os triângulos em verde representam a subtração dos dados obtidos no E_{out} a partir dos dados obtidos no $E_{1/2}$. As contribuições dos termos faradaico e não-faradaico da resposta capacitiva estão ilustrados em (b). (figura extraída e adaptada a partir de Bueno et al. *Analytical Chemistry* v. 85, n. 1, p. 411-417)⁵⁶**39**

Figura 2.4. Gráficos capacitivos de Nyquist de análises por espectroscopia de capacitância com eletrodos medidos no potencial E_{out} (a) onde a resposta é dominada pelo processo não-faradaico (de um filme de azurina imobilizado sobre dodecanotiol) e também com os eletrodos medidos no potencial de meia onda, $E_{1/2}$ (b). O espectro de capacitância resultante da subtração de (a) a partir de (b) está mostrado em (c), onde a contribuição não-faradaica está corrigida e permanece apenas um semicírculo. O gráfico inserido em (b) corresponde a uma ampliação da região espectral de alta frequência. Em (c) está demonstrado os mesmo dados contidos em (b) após subtração da resposta não-faradaica. O sucesso da subtração da resistência não compensada e da

contribuição não-faradaica em (c) pode ser confirmada pela total eliminação da relaxação observada em (b) (amplificação inserida), onde o sinal é totalmente ausente em (c)(figura extraída e adaptada a partir de Bueno et al. Analytical Chemistry v. 85, n. 1, p. 411-417)⁵⁶.....**40**

Figura 2.5. Comparação da voltametria cíclica simulada padrão e a obtida experimentalmente para o filme de azurina imobilizada sobre uma monocamada de dodecanotiol. O primeiro foi obtido a partir dos parâmetros de ECE após ajuste ao circuito equivalente mostrado na Figura 2.2 (que considera as características dipolar/eletrostática de monocamadas para medidas realizadas no E_{out} e o termo redox adicional para medidas realizadas no $E_{1/2}$). (a) Voltametria Cíclica obtida/gerada na velocidade de varredura de 4 mV s^{-1} e (b) a 1200 mVs^{-1} . (figura extraída e adaptada a partir de Bueno et al. Analytical Chemistry v. 85, n. 1, p. 411-417)⁵⁶.....**43**

Figura 2.6. (a) Resistência de transferência de carga como uma função de potencial conforme obtido a partir do ajuste dos dados de capacitância/impedância ao circuito equivalente da Figura 2.2b, mostrando que o valor mínimo está por volta do potencial reversível para qualquer espessura fixada da SAM. (b) A capacitância redox (A Gaussiana ajustada em preto) como uma função do potencial obtido (em vermelho) a partir dos dados de capacitância/impedância ajustados ao circuito da Figura 2.2b em diferentes potenciais do estado estacionário. Esta capacitância controla a corrente redox de acordo com a Eq. 2.1 e, conforme discutido no texto principal, reporta diretamente a interação da distribuição Fermi-Dirac do eletrodo com o sítio de densidade de estados ocupados redox. Através da dependência de potencial desta interação (carregamento), a função C_r , controla diretamente o formato do pico voltamétrico. (c) A comparação da magnitude de todos os termos capacitivos com respeito à C_r , expressos como uma função de potencial, mostrando que C_r é dominante sobre os demais termos capacitivos na janela redox. (figura extraída e adaptada a partir de Bueno et al. Analytical Chemistry v. 85, n. 1, p. 411-417)⁵⁶.....**44**

Figura 2.7. Modelo de circuito equivalente de uma monocamada auto-montada com *probe* redox confinada. R_s é a resistência da solução, R_u e C_u são a resistência e capacitância não compensada, respectivamente, C_m é a capacitância da monocamada. Estes termos constituem a contribuição não-faradaica^{14; 56}. A contribuição não-faradaica é constituída pela resistência de transferência de carga (R_{ct}) e a capacitância redox (C_r)[Figura (a)]. O termo C_r é ainda composta de um termo quântico e outro eletrostático, C_q e C_e , respectivamente [Figura (b)].....**46**

Figura 2.8. (a) O efeito da constante dielétrica do meio (solução aquosa e diclorometano, DCM) sobre formato do DOS, ou seja, sobre a distribuição de energia de uma camada bioreceptiva. Note que o efeito da constante dielétrica do meio leva a um espalhamento do DOS e a uma variação no nível de energia de Fermi dos estados moleculares (indicado pela linha pontilhada), o qual é drasticamente afetado pela constante dielétrica do meio, embora a densidade volumétrica de elétrons não é afetada sendo esta em torno de 10^{19} estados por cm^{-3} , independente do meio de suporte (H_2O ou DCM). (b) Variação do DOS devido a interação entre o anti-CRP, imobilizado sobre a monocamada com *probe* redox confinada, com o analito CRP em concentrações abrangendo de 0,5 a $8,0 \text{ nmol L}^{-1}$ em PBS. Medidas realizadas em solução de 20 mmol L^{-1} de TBAClO_4 dissolvidos em ACNT/ H_2O 20:80 usada como eletrólito de suporte. Valores obtidos através de medidas realizadas em triplicata.....**50**

Figura 2.9. Relação linear entre o logaritmo natural da concentração de CRP (curva analítica) e o sistema de densidade de elétron. A densidade eletrônica foi calculada pela integração das curvas normalizadas pelo volume das SAMs (um comprimento de 3,5 nm foi usado para o 11-ferrocenil-undecanetiol). Adicionalmente, o desvio padrão foi calculado através de medidas em triplicatas. A figura também mostra dois controles de superfícies, o primeiro da superfície receptiva usada contra uma faixa de concentração de fetuína-A equivalente a usada para CRP (0,5 a 8,0 nmol L⁻¹) e o segundo controle mostrando a ausência de interação da CRP, em diferentes concentrações, sobre uma monocamada composta apenas de 11-ferrocenil-undecanetiol.....**51**

Figura 3.1 Voltamograma de limpeza eletroquímica em H₂SO₄ (0,5 mmol L⁻¹) a uma velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹, no qual o pico (área hachurada em a) representa a formação/dessorção de óxido (Figura 3.1a), enquanto que a parte destacada como zona da dupla camada capacitiva (Figura 3.1b), representa a capacitância interfacial.....**54**

Figura 3.2. Fluxograma ilustrando o processo de limpeza dos eletros e formação das superfícies moleculares nanoestruturadas com *probe* redox confinadas e receptivas.....**55**

Figura 5.1. Esquema representativo de uma superfície molecular nanoestruturada com *probe* redox confinada e receptiva composta de uma monocamada mista de pentadecanotiol (âncora para imobilização do anti-CRP) e ferroceno (“*probe*” redox confinada)(figura extraída e adaptada de Fernandes et al¹⁷)..... **61**

Figura 5.2. Voltamograma cíclico típico da atividade redox existente na monocamada mista de ferroceno/tiol. a) Voltametria cíclica obtida para monocamada mista, superfície molecular nanoestruturada receptiva e variação da concentração de CRP em uma taxa de varredura de 100 mV.s⁻¹ medido com eletrodo de referência de Ag/AgCl. SAM redox refere-se à monocamada mista sem o antiCRP imobilizado. Na primeira etapa, o sinal decresce devido à imobilização do anticorpo e, este processo continua em função da concentração de CRP, devido a ligação entre a proteína e ao anticorpo. Assim, o sinal de corrente pode ser utilizado como sinal transdutor. b) Comparação da resposta em densidade de corrente para o analito CRP onde é claro a insensibilidade relativa e a natureza não específica da perturbação. O conjunto de medidas do controle negativo (CN) e do controle da monocamada mista (MM) respondem de forma comparável para a densidade de corrente da curva analítica para CRP. As barras de erro indicam o desvio padrão de uma triplicada(figura extraída e adaptada de Fernandes et al¹⁷)... ..**62**

Figura 5.3. Representação do comportamento do sistema impedimétrico/capacitivo redox para detecção de CRP, onde se observa que pela variação no sinal impedimétrico (a) não é possível ajustar os valores de impedância ao circuito de Randle, sendo assim o R_{ct} do sistema não pode ser calculado. b) Valores de capacitância derivado da impedância onde é notável variação para o sinal capacitivo da interface de anti-CRP com diferentes concentrações de CRP. Todos os valores complexos de impedância e capacitância mostradas aqui são valores médios obtidos a partir de medições ao longo de três eletrodos diferentes(figura extraída e adaptada de Fernandes et al¹⁷)..... **63**

Figura 5.4. (a) Gráfico de Bode para o componente real da capacitância complexa da superfície nanoestruturada molecular com “*probe*” redox confinada no potencial de

máxima transferência de elétrons, $E_{1/2}$ (~-0,5 V), e em um potencial fora da região de transferência de elétrons, E_{out} (0,1 V). (b) A mesma análise conforme (a), mas mostrando o componente imaginário da resposta da capacitância complexa. Todos os gráficos são a média de análises obtidas a partir de 3 diferentes eletrodos funcionalizados (preparados sobre uma monocamada mista formada por incubação em uma solução de 11-ferrocenil-undecatiol e pentadecanotiol em proporção molar de 9:1. Para ambos os gráficos os valores de capacitância estão plotados em função da frequência que está representada em log usando apenas os expoentes na base 10 (figura extraída e adaptada de Fernandes et al¹⁷).64

Figura 5.5. Curva analítica obtida pelo inverso de C_r , obtida em 8 Hz para a superfície molecular nanoestruturada contendo *probe* redox confinada e receptiva. Também estão representadas a resposta do controle de especificidade, o controle negativo (CN) onde a resposta do biossensor foi avaliada frente a uma proteína não específica, e o controle da monocamada mista ferroceno/tiol (MM), onde foi avaliada a interação do analito, CRP, contra a monocamada contendo a “probe” redox sem a presença do Anti-CRP. O coeficiente de regressão linear obtido foi de 0.998 e as barras de erro representam o desvio padrão em três replicatas (ensaios em 3 superfícies independentes) (figura extraída e adaptada de Fernandes et al¹⁷).65

Figura 6.1. Representação esquemática de duas diferentes abordagens usadas no monitoramento da interação biomolecular analito/receptor com a finalidade de estudo de afinidade e sensoriamento. a) Esquema ilustrativo da SAM mista construída sobre a superfície de ouro, onde a SAM é composta por 1-pentadecanotiol, usado como suporte para o receptor (anticorpo), e 11-mercapto-1-undecanol usado como espaçador não redox(AQS-1). Nesta configuração estrutural, medidas impedimétricas podem ser com *probe* redox em solução, como por exemplo $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$. A monocamada não redox em (a) intermedia a transferência de elétrons (conforme mostrado com as setas em vermelho) entre a *probe* redox em solução e a superfície de Au e este fluxo eletrônico esta relacionado a cinética de transferência de elétrons através do R_{ct} . b) mostra esquematicamente a monocamada mista construída sobre a superfície de Au a ser usada em medidas redox, onde a monocamada mista é composta de 1-pentadecanotiol e 11-ferrocenilundecanotiol(AQS-2), em que o último é usado como espaçador com centros capacitivos redox proporcionando o surgimento da capacitância redox, C_r . (Figura extraída e adaptada do artigo de Fernandes et al¹⁸).69

Figura 6.2. Voltamogramas cíclicos tipicamente obtidos na caracterização para superfícies moleculares nanoestruturadas não redox por VC com *probe* redox em solução, e superfícies moleculares nanoestruturadas com atividade redox em que a *probe* redox está confinada na monocamada mista de ferroceno/tiol. A figura mostra o comportamento de cada voltamograma obtido para Au-polido, SAM mista, superfície receptiva (Branco) e a variação da concentração do analito em uma taxa de varredura de 100 mV s⁻¹ medido com eletrodo de referência de Ag/AgCl. Sendo: a) AQS-1; b) AQS-2 e c) AQS-3.71

Figura 6.3. a) Representação esquemática da impedância interfacial das superfícies receptivas de CRP usadas neste trabalho. b) Circuito equivalente capaz de ajustar os dados impedimétricos do biossensor (AQS-1). O elemento de Warburg (Z_w) representa as características de difusão de massa da *probe* redox e a R_{ct} . A resistência de do eletrólito (R_s) é ajusta em série com o total da impedância interfacial acima [veja (a)] e geralmente isto não é importante na análise predominante uma vez que R_s não varia. c)

É o circuito equivalente apropriado para ajustar os dados do biossensor capacitivo (AQS-2 e AQS-3). Note que a capacitância interfacial de uma monocamada dielétrica de eletrodo modificado é definido por duas capacitâncias em série, a capacitância da monocamada (C_m) e da dupla camada elétrica (C_{dl}) onde $C_{dl} \gg C_m$, o que significa que C_m é dominante em análises e, portanto, é a única capacitância representada no circuito equivalente mostrado aqui. Além disso, $C_m \ll C_t$ em uma forma que R_t and C_t , resistência e capacitância do filme, controlam a resposta dielétrica da monocamada (não-redox)^{94; 95; 96; 97}. (figura extraída e adaptada do artigo de Fernandes et al¹⁸).....72

Figura 6.4. Gráficos de Nyquist impedimétrico (a) e capacitivo (b) tipicamente obtidos para AQS-1. Note que (b) foi construído convertendo os dados de impedância em capacitância conforme explicado na seção experimental. A análise impedimétrica de (a) é prontamente usada para obter o ΔR_{ct} como sinal transdutor da interação do analito, com o sítio receptivo, nas concentrações indicadas em (d). Note que o R_{ct} [que é obtido pelo semicírculo dos gráficos em (a)], varia significativamente em função da concentração do analito, enquanto os valores de capacitivos de Nyquist pouco variam [gráfico inserido em (b)]. No entanto, para AQS-2 e AQS-3, os gráficos de Nyquist impedimétricos (c) e capacitivo (d) mostram não ser possível obter o R_{ct} a partir dos valores de impedância (c) enquanto a capacitância de Nyquist responde de forma claramente proporcional a diferentes concentrações do analito. Todos os valores complexos de impedância e capacitância mostradas aqui são valores médios obtidos a partir de medições em três eletrodos diferentes(figura extraída e adaptada do artigo de Fernandes et al¹⁸).....73

Figura 6.5. (a) Curva analítica construída com base no valor de resposta do ΔR_{ct} da superfície receptiva AQS-1 plotado contra o logaritmo da concentração de CRP. b) Curva analítica construída com base no valor de resposta do $1/C_r$ como função do log da concentração da CRP para a superfície receptiva AQS-2. c) A mesma análise em (b), mas baseada sobre uma superfície receptiva onde o anti-CRP foi imobilizado covalentemente (AQS-3) em contraste a imobilização hidrofóbica usada em AQS-2. O ajuste da regressão linear para as três superfícies receptivas usadas são superiores a 0.97. Os controles de superfície mostrados em cada gráfico evidenciam que todas as superfícies respondem especificamente para CRP. As barras de erro indicam a variação através de medidas em triplicatas para cada superfície receptiva (figura extraída e adaptada do artigo de Fernandes et al¹⁸).....74

Figura 6.6. Relação linear entre $1/\Delta C_r \times [\text{antígeno}]$, para as duas metodologias distintas. Foi possível calcular as constantes cinéticas de associação para estes dados utilizando a Equação 6.6. (figura extraída e adaptada do artigo de Fernandes et al¹⁸).....77

Figura 6.7. Voltamograma e gráfico de Nyquist mostrando a variação do datilograma para a corrente e capacitância redox, respectivamente, em virtude a preparação da superfície molecular nanoestruturada contendo *probe* redox confinada e receptivo para detecção de *hPAP*. a) Resposta voltamétrica para a superfície de ouro recém polida (linha sólida preta), SAM mista de PEGlate e ferroceno (linha tracejada vermelha), SAM mista modificada com anti-PAP (linha traço-pontilhada em azul). C_r é o valor de C' no interstício do gráfico de Nyquist. Todas as medidas foram realizadas em $E_{1/2}$ do

ferroceno (0.45V) versus o eletrodo de referência de Ag|AgCl, onde o valor de C_r é máximo [figura (b) extraída e adaptada do artigo de Lehr et al¹⁹]...... **80**

Figura 6.8. Análises de impedância faradaica ilustrando a ausência de resposta interfacial por meio de medidas impedimétricas e a sensibilidade por capacitância. (a) Gráficos de Nyquist para medidas impedimétricas de Z'' versus Z' para superfícies moleculares nanoestruturadas com atividade redox e receptiva para a hPAP. A resposta capacitiva análoga para determinação de hPAP é mostrada em (b), onde a variação de sinal em função da resposta ao analito é observado (a própria C_r é obtida no interstício do gráfico de Nyquist). A curva analítica foi obtida a partir de três diferentes eletrodos de trabalho. (figura extraída e adaptada do artigo de Lehr et al¹⁹).....**82**

Figura 6.9. (a) Representa a parte real da capacitância complexa proveniente da superfície molecular nanoestruturada contendo probe redox confinada e receptiva nos potenciais correspondentes a região redox e não-redox, determinada a partir do potencial de meia onda dos eletrodos de trabalho para detecção de hPAP. (b) Similar a (a), no entanto mostra a resposta da parte imaginária da capacitância complexa. Observe que o eixo da frequência é plotado como expoente na base dez. Todos os conjuntos de dados são as médias obtidas a partir de três diferentes eletrodos de trabalho, inicialmente modificados com anti-PAP (traço verde), em seguida, incubadas com concentrações crescentes do analito. (figura extraída e adaptada do artigo de Lehr et al¹⁹).....**82**

Figura 6.10 Resposta capacitiva da superfície receptiva para hPAP, na presença de proteínas inespecíficas, representada em valores de capacitância redox no gráfico de Nyquist (a) e expressa em termos de resposta relativa (RR) em porcentagem (b). A porcentagem de resposta foi calculada usando a relação $RR = (R_n - R_0) \times 100 / R_0$ onde R_0 é a resposta do branco para a superfície de reconhecimento (medida realizada pós-incubação em PBS sem a presença do analito). Ambas as proteínas inespecíficas, BSA e fetuína apresentaram menos de 4 % de resposta relativa contra aproximadamente 50% de resposta relativa para a hPAP na mesma concentração (10^{-8} mol L⁻¹). [Figura (b) extraída e adaptada do artigo de Lehr et al¹⁹]......**83**

Figura 6.11. Gráfico da variação do inverso da capacitância redox em função da variação do log da concentração da proteína alvo. Todos os valores foram obtidos a partir de um ajuste dos valores médios de conjuntos de dados independentes realizados em triplicata e as barras de erro representam o desvio padrão para os valores do sinal analítico ($1/C_r$). O coeficiente de regressão linear obtido foi de 0,989 (figura extraída e adaptada do artigo de Lehr et al¹⁹).....**84**

Figura 7.1. Resposta relativa em porcentagem, RR(%) em função da frequência em escala logaritmo (representada apenas pelos expoentes na base 10), para os 16 parâmetros analisados através da faixa de frequência estudada de 0,1–100 kHz. Os valores de concentração de CRP usados foram de: 0,5 nmol L⁻¹(círculo), 1,0 nmol L⁻¹ (triângulo preenchido), 10,0 nmol L⁻¹ (triângulo vazio), 50,0 nmol L⁻¹ (quadrado preenchido) and 100,0 nmol L⁻¹ (quadrado vazio), sobre eletrodo modificado com 16-MHDA. Conforme C^* , M^* , e Y^* são fasorialmente derivados a partir de Z^* , é evidente que diversas funções apresentem resposta similar (exemplo Z'' e M' , M'' e Z').....**94**

Figura 7.2. Um típico exemplo mostrando a variação da resposta relativa, RR(%), para o parâmetro Z'' de uma análise impedimétrica faradaica (EIE) em função da frequência em escala logaritmo (representada apenas pelos expoentes na base 10), para a superfície receptiva a CRP construída a partir da imobilização de anti-CRP sobre um eletrodo de

ouro modificado com 16-MHDA. Foi usada uma concentração de CRP na faixa de 0,5 a 100,0 nmo L⁻¹. A resposta é máxima por volta de 12 Hz, indicando assim a frequência analítica optmizada.....**95**

Figura 7.3. Curva analítica otimizada da detecção de CRP sobre eletrodo de ouro modificado com 16-MHDA, obtido usando ensaios faradaicos, mostrando que $|Z|$ e Z''/Z' (ambos com frequência otimizada = 0,1 Hz) mostram grande sensibilidade quando comparados a R_{ct} (12 vezes e 7 vezes, respectivamente)(figura extraída e adaptada de Amol et al Analytical Chemistry, v. 87, n. 2, p. 944-950, 2014).....**96**

Figura 7.4. a) Curvas analíticas otimizadas de análises não-faradaicas da CRP sobre eletrodos modificados com 16-MHDA mostrando que Z'' e a razão de M^* (M'/M'') sendo a sensibilidade relativa mais elevada encontrada para Z'' [$S = 3,4$ per cento por (pmol L⁻¹) x 10, $r^2 = 0,996$] enquanto que M'/M'' mostrou a valor mais baixo de sensibilidade [$S = 1,49$ per cento por (pmol L⁻¹) x 10, $r^2 = 0,978$]. O desvio padrão associado para cada ponto foram adquiridos a partir das análises na faixa de frequência 0,05 a 1,0 Hz. b) Um resumo das sensibilidades relativas dos parâmetros de ImF em uma detecção não-faradaica da CRP (0,5- 100,0 nmol L⁻¹). Estes dados foram obtidos por meio da média calculada através da faixa otimizada de frequência de 0,1 a 1 Hz. Medidas realizadas em triplicata (figura extraída e adaptada de Amol et al Analytical Chemistry, v. 87, n. 2, p. 944-950, 2014).....**97**

Figura 7.4.1. Gráfico capacitivo de Bode mostrando a variação no sinal de capacitância real em ambos potenciais $E_{1/2}$ (gráficos largos em preto) e E_{out} (gráficos finos em vermelho) para uma superfície molecular nanoestruturada contendo probe redox confinada e receptiva para a CRP. As concentrações representadas são 10 e 1000 pmol L⁻¹. Para as medidas realizadas no $E_{1/2}$, a variação em C' apresentou sensibilidade máxima foi encontrada ao redor de 4,0 Hz. Entretanto, para medidas similares realizadas no E_{out} , a variação de sinal é claramente insignificante como ferramenta analítica.....**102**

Figura 7.4.2. Gráfico capacitivo de Bode mostrando a resposta para a capacitância imaginária expressa em Faraday e RR (%) em função da frequência em escala logaritmo (representada apenas pelos expoentes na base 10). Figura (a) e (b), respectivamente, na detecção de CRP usando superfícies moleculares nanoestruturadas com probe redox confinada. O sinal "redox" foi medido no potencial de meia onda do ferroceno (~0,45 vs Ag|AgCl) e a contribuição não-faradaica foi medida em 0,1 V vs Ag|AgCl.....**102**

Figura 7.4.3. Resposta relativa em porcentagem, RR(%) em função da frequência em escala logaritmo (representada apenas pelos expoentes na base 10)., para os 28 parâmetros analisados através da faixa de frequência estudada de 0,05 a 100 kHz na faixa de concentração de CRP usada (10² a 10⁴ pmol L⁻¹). O filme receptivo foi construído sobre uma monocamada mista de 11-FcC e 16-MHDA. Conforme C^* , M^* , e Y^* são fasorialmente derivados a partir de Z^* , é evidente que diversas funções apresentem resposta similar (Z'' e M' , M'' e Z' , por exemplo).....**104**

Figura 7.4.4. a) Gráfico de Bode para variação da resposta relativa, RR(%), para Z'' em função da frequência em escala logaritmo (representada apenas pelos expoentes na base 10) para ensaios de detecção de Ab-syn sobre superfícies moleculares nanoestruturadas contendo probe redox confinada (construídas a partir de monocamadas mistas composta de 16-MHDA/11FcC imobilizadas sobre eletrodos de

ouro). A Figura (a) mostra que Z'' tem sensibilidade relativa otimizada similar entre a faixa de frequência de 13,0 a 5000,0 Hz (linhas tracejadas em preto) (Sensibilidade de $100,1 \pm 4,9$ contra a sensibilidade de 104,7, encontrada em 2423,0 Hz, $r^2 = 0,980 \pm 0,009$). b) Curva analítica obtida por Z'' para detecção redox do Ab-syn (10^2 a 10^4 pmol L⁻¹). A curva analítica foi construída agrupando os valores de cada concentração nas diferentes frequências dentro de tal faixa (13,0 – 5000 Hz)..... **105**

Figura 7.4.5 Gráfico de Bode mostra a resposta dos parâmetros de ImF , C' e Y'' em termos de valores absolutos e RR(%) para a detecção do anticorpo da α -synucleína com concentrações abrangendo a faixa de 10^2 a 10^4 pmol L⁻¹ sobre uma camada mista de 16-MHDA/11-FcC. a) e b) são os gráficos de Bode para a capacitância real na resposta absoluta e RR(%), respectivamente. Enquanto c) e d) mostram a mesma análise, mas para a capacitância imaginária (Y'') derivada a partir de C' . Como está claro a se notar, a função derivada (Y'' usada como um modelo) mostra exatamente o mesmo comportamento e valores da ImF original quando avaliada em termos de RR(%).. **106**

Figura 7.4.6. Um típico exemplo mostrando a variação na resposta relativa, RR(%), do parâmetro $1/C''$ de uma análise de medidas impedimétricas realizadas sobre uma superfície receptiva a Ab-syn com *probe* redox confinada. Foi usada faixa de concentração de Ab-syn entre 10^2 a 10^4 pmol L⁻¹. A resposta é máxima por volta de 40 Hz, indicando assim a frequência analítica otimizada..... **107**

Figura 7.4.7. Comparação de resposta analítica para superfícies moleculares nanoestruturadas contendo *probe* redox confinada e receptiva construídas sobre uma SAM mista composta de 16-MHDA/11FcC, os quais foram apropriadamente funcionalizados para detecção de ab-syn (a) e CRP (b). Em ambas as análises o ImF de maior sensibilidade foi o $1/C''$ e as frequências analíticas otimizadas para (a) e (b) foram de 40,47 Hz e 21,06 Hz, respectivamente. As respostas analíticas nestes casos se encontram comparadas a resposta obtida para $1/C_r$ em cada caso. As medidas foram realizadas em triplicata e todas as curvas analíticas aqui demonstradas apresentaram $r^2 > 0,996$ **109**

Figura 7.4.8. Comparativo entre a sensibilidade dos parâmetros de ImF para detecção de Ab-syn(a) e CRP(b), mostrando a existência de uma frequência em que a sensibilidade é equivalente, conforme indicado pelas barras de erros no eixo da frequência, no qual as sensibilidades são comparáveis ao valor otimizado. Está evidente que os parâmetros como $1/C''$ e Z' são os mais sensíveis e encontram-se confinados na faixa 0,1 a 100,0 Hz..... **110**

Figura 7.4.9. Representação em três dimensões curvas analíticas mostradas na Figura 7.4.8 para detecção de anti-synucleína e CRP (a e b, respectivamente). Entretanto, também considerando o tempo necessário para realizar as medidas referentes aos ensaios de todas as concentrações estudadas (7 e 8 concentrações para to anti-syn e CRP, respectivamente). O tempo necessário para as medidas foi aproximadamente de 70 minutos usando $1/C''$ e mais de 720 minutos por $1/C_r$, enquanto que no mesmo ensaio para a CRP o tempo consumido foi de 80 minutos usando $1/C''$ e mais de 810 minutos usando $1/C_r$ **111**

Lista de Tabelas

Tabela 6.1: Alguns parâmetros analíticos para determinação impedimétrica e capacitiva da CRP ¹⁸	75
Tabela 6.2: Alguns parâmetros analíticos para determinação capacitiva redox de hPAP ¹⁹	84
Tabela 7.1. Resposta dos parâmetros ImF ótimos para detecção de CRP sobre eletrodo de ouro modificado com 16-MHDA e com anticorpo anti-CRP. Os dados representados aqui são baseados em um eletrodo com três medições por concentração. A sensibilidade foi calculada pelo ajuste linear da resposta relativa RR (%) em função da concentração e o L.D calculado com base nos parâmetros linear desta curva analítica e o desvio padrão do branco.	93
Tabela 7.4.1. Todos os parâmetros de ImF avaliados na metodologia proposta...	100
Tabela 7.4.2. Parâmetros analíticos das ImF para detecção de CRP medidos no E_{out} . Os dados representados aqui são referentes a medidas em triplicata. A sensibilidade e o L.D. foram calculados pelo ajuste linear da média de cada resposta relativa, RR(%).	103
Tabela 7.4.3. Parâmetros analíticos ImF otimizados para detecção de ab-syn e CRP e medidos no $E_{1/2}$ sobre seus respectivos superfícies moleculares nanoestruturadas receptivos com <i>probe</i> redox confinada. Os dados representados aqui são referentes a medidas em triplicata. A sensibilidade e o L.D. foram calculados pelo ajuste linear da média de cada resposta relativa, RR(%).	107

Lista de abreviaturas

BCL-6	Sigla em inglês para <i>B-cell lymphoma 6 protein</i>
CRP	Sigla em inglês para <i>C-reactive protein</i>
hPAP	Sigla em inglês para <i>human Prostatic Acid Phosfatase</i>
A β	Sigla em inglês para <i>amyloid beta</i>
ELISA	Sigla em inglês para <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EIE	Espectroscopia de impedância eletroquímica
ECE	Espectroscopia de capacitância eletroquímica
SPR	Sigla em inglês para <i>surface plasmon resonance</i>
MCQ	Microbalança à cristal de quartzo
SAM	Sigla em inglês para <i>self-assembled monolayers</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
LSPR	Sigla em inglês para <i>localized surface plasmon resonance</i>
CNT FET	Sigla em inglês para <i>carbon nanotube field-effect transistor</i>
kDa	Kilodaltons
SQT	Sigla em inglês para <i>Stefin A Quadruple Tracy</i>
DA	Doença de Alzheimer
NAC	Sigla em inglês para <i>Non-Amyloid Component</i>
VC	Voltametria cíclica
EMCS	Sigla em inglês para <i>electroactive monolayer capacitance spectroscopy</i>
SAMCS	Sigla em inglês para <i>self-assembled monolayer capacitance spectroscopic</i>
DOS	Sigla em inglês para <i>density occupied state</i>
DOS-redox	Densidade de estados ocupados <i>da superfície redox</i>
DOS-metal	Densidade de estados ocupados <i>do metal</i>
DCM	Diclorometano
PBS	Sigla em inglês para <i>Phosphate buffered saline</i>
BSA	Sigla em inglês para <i>bovine serum albumin</i>
11-FcC	11-Ferrocenil-undecanotiol
CN	Controle negativo
MM	Monocamada mista
XPS	X-ray photoelectron spectroscopy
STM	Sigla em inglês para <i>scanning tunneling microscopy</i>
XANES	Sigla em inglês para <i>X-ray absorption near-edge extended fine structure</i>
AQS	Arquiteturas químicas de superfície diferentes
16-MHDA	16-mercaptohexadecanoico
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
NHS	N-hidroxissuccinimina
C_f	Capacitância do filme
L.D.	Limite de detecção
L.Q.	Limite de quantificação
DPR	Desvio padrão relativo
$ImFs$	Sigla em inglês para <i>Imittance Function</i>
RR(%)	Resposta relativa em porcentagem
R_n^ω	Resposta em uma dada concentração n a uma frequência específica ω
R_0^ω	Resposta do branco a uma frequência específica ω
Hz	Hertz

Lista de símbolos

R_u	Resistência não compensada
iR_u	Queda de potencial não compensada
Z_u	Impedância não compensada
iR_s	Resistência da solução
C_u	Capacitância não compensada
C_m	Capacitância eletrônica pura
i_p	Pico de corrente
v	Varredura do potencial
$E_{1/2}$	Potencial de meia onda
E_{out}	Potencial fora janela redox do sistema
ω	Frequência angular
ω_p	Frequência angular no pico de relaxação iônica do sistema
R_{ct}	Resistência à transferência de carga (inglês - <i>charge transfer resistance</i>)
C_r	Capacitância redox
C_e	Capacitância eletrostática
C_q	Capacitância quântica
τ	Tempo de relaxação
τ_r	Tempo de relaxação para o processo redox
τ_u	Tempo de relaxação para o processo não-faradaico
j	Densidade de corrente capacitiva
j_f	Densidade de corrente capacitiva faradaica
j_u	Densidade de corrente capacitiva não-faradaica
V	Potencial do eletrodo
q_r	Carga redox
n	Número de centros redox ocupados
e	Carga elementar ($1,6 \times 10^{-19}$)
q_e	Carga eletrostática da monocamada (com a contribuição iônica incluída)
β	Parâmetro de decaimento da distância
L	Espessura da monocamada
E_r	Potencial formal do estado redox
μ_e	Potencial químico do elétron (ou do nível de Fermi, E_F)
Γ	Grau de revestimento de centros redox na superfície
k_B	Constante de Boltzmann
T	Temperatura absoluta
g_r	Distribuição de estados redox ocupados
g_m	Distribuição de estados ocupados metálicos
f	Estatística de Fermi-Dirac
Ag/AgCl	Eletrodo de referência de prata cloreto de prata

K_a	Constante de afinidade
Z_w	O elemento de Warburg
C_{dl}	Dupla camada elétrica
Θ	Teta (recobrimento de sítios ativos de interação)
m	Quantidade de antígeno adsorvida sobre o sensor
$m_{m\acute{a}x}$	Máxima quantidade de antígeno adsorvida sobre o sensor
Z^*	Impedância complexa
Z'	Impedância real
Z''	Impedância imaginária
$ Z $	Módulo absoluto da impedância
C^*	Capacitância complexa
C'	Capacitância real
C''	Capacitância imaginária
$ C $	Módulo absoluto da capacitância
M^*	Modulo complexo
M'	Modulo real
M''	Modulo imaginário
$ M $	Módulo absoluto da função módulo
Y^*	Imitância complexa
Y'	Imitância real
Y''	Imitância imaginária
$ Y $	Módulo absoluto da imitância
G	Condutância ressonante do processo de transferência eletrônica
ϕ	Ângulo de fase
$\pi\nu$	Frequência angular, onde $\pi \cong 3.14$ e ν é dado em s^{-1} (Hz)

Sumário

1. Introdução.....	25
2. A espectroscopia de capacitância eletroquímica e a detecção de proteínas biomarcadoras.....	35
2.1 Teoria – aspectos gerais.....	35
2.2 O significado físico da capacitância redox.....	42
2.3 Capacitância redox e o (bio)sensoriamento	47
3. Protocolo geral de limpeza e polimento de eletrodos de trabalho.	52
3.1 Polimento e limpeza do eletrodo	52
3.1.1 Equipamentos e célula para as medidas eletroquímicas.....	52
3.1.2 Procedimentos	52
4. Objetivos	56
5 Plataformas <i>label free</i> de biossensoriamento capacitivo redox.....	57
5.1 Introdução.....	58
5.2 Parte experimental.....	59
5.2.1 Métodos e procedimentos experimentais	59
5.2.2 Controle negativo e superfícies moleculares nanoestruturadas não-receptivos.....	60
5.3 Resultados e discussões	60
5.4 Conclusão.....	65
6. Comparação entre biossensores <i>label free</i> impedimétricos e capacitivos	66
6.1 Introdução.....	67
6.2 Parte experimental.....	68
6.2.1 Métodos e procedimentos experimentais	68
6.2.1.1 Detecção impedimétrica e capacitiva redox da CRP.	68
6.2.2 Imobilização do receptor e construção da curva padrão.	70
6.3 Resultados e discussões	72
6.3.1 Conceitos teóricos	72
6.3.2 Arquitetura química de superfície e isoterma de Langmuir	75
6.4 Extensão do conceito de biossensor capacitivo redox para detecção de hPAP.....	78
6.4.1 Parte experimental.....	78
6.4.1.1 Métodos e procedimentos experimentais.....	78
6.4.1.2 Engenharia de superfície do biossensor capacitivo para detecção de hPAP.....	78
6.4.1.3 Medidas eletroquímicas.....	79
6.4.2. Resultados e discussão.....	80

6.5 Conclusão.....	85
7. Funções de imitância aplicadas ao sensoriamento de biomarcadores.....	86
7.1 Introdução.....	87
7.2 Detecção impedimétrica faradaica e não-faradaica da CRP.....	90
7.2.1 . Parte experimental	90
7.2.1.1 Métodos e procedimentos experimentais.....	90
7.2.1.2 Imobilização do receptor e construção da curva padrão.	90
7.2.1.3 Análises de dados	91
7.3 Resultados e discussões	92
7.3.1 Análises de funções de imitância sobre ensaios não-faradaicos para a detecção da CRP.....	96
7.4 Detecção impedimétrica de probe redox confinadas para a proteína CRP.	98
7.4.1 Análises por capacitância redox (C_r).....	99
7.4.2 Análise espectral de dados	99
7.5 Conclusão.....	112
8. Conclusões gerais.....	113
Referências.....	114

1 Introdução

Desde a antiguidade a humanidade tem buscado maneiras de inferir a existência de doenças por meio do conhecimento de sintomas relacionados a um dado evento patológico. Este processo de distinção de enfermidades foi denominado de *diagnóstico* por Hipócrates, palavra esta que é a junção do prefixo **dia** cujo significado é através de ou por meio de, com a palavra **gnosis** que significa conhecimento. Então, os primeiros métodos de diagnóstico propostos por Hipócrates consistiam basicamente em analisar o enfermo com base nos sentidos, como por exemplo, tato, visão, audição e olfato, para assim respectivamente realizar tomadas de pulso cardíaco, observar o doente, ouvir queixas e ruídos anormais nos doentes ou ainda sentir odores característicos de processos inflamatórios. Os procedimentos de diagnóstico foram evoluindo lentamente ao longo dos séculos, evolução esta que começou a ganhar força com o início da instrumentalização do médico, a qual teve início no século XIX com a invenção do estetoscópio por Laennec, seguida da introdução do uso do termômetro e do medidor de pressão.

Ao mesmo tempo em que sempre houve na medicina, e na ciência de forma geral, a preocupação de aperfeiçoar cada vez mais os meios de diagnósticos, também sempre foi constante a preocupação de se entender a causa das doenças. As primeiras explicações tinham praticamente uma denotação mística, como por exemplo, na fase denominada *humoral*, onde se acreditava que as doenças estavam relacionadas a alterações de “*humor*” do indivíduo, o que seriam alterações nos níveis do fluido corporal. Posteriormente, se passou a entender a relação de certas causas de doenças com disfunções de órgãos do corpo o que deu então início a fase denominada como orgânica. No entanto, o surgimento do microscópio possibilitou a descoberta da microbiologia, o que permitiu identificar os agentes causadores de muitas doenças e, adicionalmente, viabilizou a descoberta da estrutura celular dos seres vivos, possibilitando também a revelação e a identificação das alterações patológicas dos tecidos em decorrência de doenças. Assim, a descoberta do microscópio (com o seu posterior aperfeiçoamento) foi importantíssima tanto para o desenvolvimento do campo de diagnóstico de doenças, bem como ao entendimento de processos patológicos pondo fim às teorias da patologia humoral e orgânica que orientaram o pensamento médico por mais de

2.000 anos e introduzindo assim, a teoria da patologia celular. Um entendimento ainda melhor dos processos patológicos se deu com o desenvolvimento dos métodos de eletroforese bidimensional de alta resolução. Por meio destes métodos é possível estabelecer um detalhado mapeamento das proteínas expressas por um genoma ou tecido, abrindo assim uma nova área de conhecimento chamada por Wilkins, et al. de Proteoma¹. No campo do diagnóstico o proteoma se faz importante, pois tanto os tipos de proteínas bem como os seus níveis expressos por uma célula ou tecido, são alterados de acordo com a fase de desenvolvimento, ou de acordo com fatores externos, a qual um indivíduo se encontra (em meio a um evento patológico, por exemplo). Assim, comparando-se o proteoma de indivíduos saudáveis e enfermos foi possível entender a relação de expressão de proteínas (seja como causa ou consequência) com distúrbios patológicos. Atualmente, muitos métodos de diagnósticos usam como ferramenta justamente o monitoramento de proteínas as quais sua presença ou significativo aumento na concentração, é indicativo de eventos patológicos.

Devido a esta grande relação entre doenças e a variação na expressão de proteínas existe hoje um campo de estudo inteiramente dedicado a estudar esta relação o qual é denominado de proteômica e trata não somente do estudo da incidência de enfermidades, mas também do efeito de medicamentos sobre as estrutura e as funções das proteínas expressas em uma célula ou em tecidos¹. Em outras palavras, a proteômica busca identificar os tipos, quantificar os níveis de cada proteína e entender suas modificações pós-traducionais, em decorrência de um evento patológico¹. Como consequência, a base de dados contida na proteômica tem o potencial de conferir um melhor entendimento de um determinado organismo e sua evolução bem como a influência do meio sobre o mesmo. É importante enfatizar, que o foco de estudo da proteômica são proteínas relacionadas ao desenvolvimento de doenças, como por exemplo, câncer, mal de Alzheimer, doença de Parkinson, eventos inflamatórios, etc., e as proteínas relacionadas a estas enfermidades podem ser denominadas como proteínas biomarcadoras^{2; 3}.

Há diversas biomoléculas que são classificadas como biomarcadores e podem ser usadas no diagnóstico de doenças. Dentre essas, podemos destacar: (1) *BCL-6 (B-cell lymphoma 6 protein)*⁴, proteína envolvida na patogênese de muitos linfomas; (2) amiloide beta^{5; 6} a qual é a maior proteína constituinte encontrada em

plaquetas da doença de Alzheimer; (3) Alfa-sinucleína⁷, proteína relacionada a alterações fisiopatológicas envolvendo corpos de Lewis, tais como doença de Parkinson, (4) C-reativa(CRP, sigla em inglês para *C-reactive protein*)⁸, biomarcador para desordens envolvendo inflamações e a enzima fosfatase ácida prostática humana(hPAP, sigla em inglês para *human Prostatic Acid Phosphatase*), a qual está presente em indivíduos saudáveis, porém a elevação dos níveis desta enzima pode estar relacionado a progressão do câncer na próstata⁹.

Monitorar os níveis de proteínas biomarcadoras durante distúrbios fisiológicos é um ponto essencial não apenas dentro da proteômica, mas também em pesquisas de desenvolvimento de novos medicamentos e em análises clínicas². No caso da aplicação no desenvolvimento de novos fármacos, os biomarcadores são usados para prova biológica, correlação de dose-resposta e outras finalidades, desde a descoberta do medicamento até a fase pós aprovação². Já em análises clínicas, tais métodos podem ter importantes aplicações, tanto no diagnóstico precoce, quanto no acompanhamento do quadro clínico de doenças ligadas a expressão de proteínas. O diagnóstico de doenças em seus estágios iniciais pode vir a melhorar significativamente o resultado do tratamento. Já o monitoramento dos níveis de biomarcadores é importante para avaliar a eficiência de medicamentos e tomar novas decisões a respeito do tratamento². Em virtude disto, há um considerável interesse pelo desenvolvimento de novos sistemas que sejam mais sensíveis, precisos, confiáveis e de menor custo para análises de proteínas biomarcadoras³.

Os métodos modernos de detecção de proteínas (ou biomarcadores de forma geral) podem ser divididos em dois grupos de técnicas: a de derivatização ou marcação do analito ou do receptor (também conhecidas como *label-based*) e a de *label-free*. As técnicas de derivatização ou marcação se baseiam na modificação do analito através do uso de agentes cromóforos, radioisótopos, enzimas ativas, etc. Estas técnicas apresentam vantagens como instrumentação simples e uso de reagentes facilmente disponíveis. No entanto, o processo de derivatização pode ser moroso e pode afetar propriedades de ligação da proteína prejudicando, portanto, a repetibilidade e a sensibilidade das análises¹⁰. Por outro lado, as técnicas *label-free*, recebem este nome justamente porque, contrapondo as técnicas *label-based*, não fazem uso da derivatização do analito. As medidas são realizadas sobre propriedades intrínsecas da molécula em questão, tais como massa ou propriedades

dielétricas¹⁰. Historicamente, anticorpos têm sido usados para precipitação de antígenos (proteínas biomarcadoras) a partir de misturas complexas para subsequente quantificação por métodos enzimáticos (*ELISA*; sigla em inglês para *enzyme-linked immunosorbent assay*). Apesar dos métodos de análises por *ELISA*, em geral apresentam repetibilidade e sensibilidade suficientes para *screening* de proteínas, estes são suscetíveis às interferências causadas por substâncias corantes presentes em várias amostras, como por exemplo, sangue, urina e saliva⁸. Além disso, são ineficazes para miniaturização de biossensores, e muitas vezes ineficientes para detecção em baixos níveis de concentração⁶. Portanto, estes fatores somados tornam importante a investigação visando o desenvolvimento de análises ainda mais específicas e sensíveis para detecção de biomarcadores.

A demanda atual no campo de diagnóstico determina que plataformas de sensoriamento bem sucedidas devem ter como características: especificidade, baixo limite e ampla faixa de detecção¹⁰, alto rendimento e capacidade de miniaturização para desenvolvimento de métodos multiplex e/ou que possibilitem a realização de análises no local em que se encontra o paciente, métodos estes denominados *point of care*. Dentre as diversas técnicas de análises existentes, técnicas eletroquímicas são potencialmente capazes de agrupar tais características desejadas em métodos de diagnósticos baseados em detecção de proteínas^{11; 12}, em especial, a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)¹³ e a espectroscopia de capacitância eletroquímica (ECE)^{14; 15}. A EIE tem sido usada para quantificar proteínas em vários meios¹¹. De acordo com os resultados, a técnica mostra-se versátil, extremamente sensível e relativamente barata se comparada a outras técnicas de monitoramento usadas em conjunto com técnicas de detecção *label-free*¹¹ como, por exemplo, a ressonância de plasma de superfície (SPR – sigla em inglês para *surface plasmon resonance*) ou a microbalança à cristal de quartzo (MCQ) (ver Figura 1.1). A técnica de ECE, também oferece excelentes vantagens como rapidez, baixo custo, alta sensibilidade e resultados confiáveis. Além do mais, ECE é capaz de monitorar interações na interface do eletrodo sem a necessidade de adicionar amplificadores de sinais (tais como *probe redox*), com detecção *label-free* de biomoléculas^{16; 17; 18; 19; 20; 21}.

Uma proposta interessante, que vem sendo usada no desenvolvimento de biossensores (dispositivos usados na detecção de biomarcadores), busca

justamente conciliar técnicas de detecção *label-free* com técnicas eletroquímicas de monitoramento. Diversos trabalhos publicados na literatura descrevem o uso de técnicas *label-free* sobre uma plataforma eletroquímica para a detecção e quantificação de biomarcadores^{13; 22}. Estes dispositivos eletroquímicos de reconhecimento são constituídos de eletrodos, contendo uma superfície metálica, como por exemplo, eletrodos de carbono coberto de ouro⁵, ouro¹³, prata coberto de ouro²³, etc., funcionalizados com uma camada nanoestruturada a qual realiza uma interação específica com o analito. A obtenção destes eletrodos funcionalizados é um trabalho complexo. Geralmente, as etapas de construção envolvem a formação de uma monocamada auto-montada (SAM- sigla em inglês para *self-assembled monolayers*)²⁴, seguida da ativação desta SAM, com a finalidade de promover a sua funcionalização²⁵. A etapa de funcionalização consiste na adição de uma molécula que apresente interações específicas com a espécie de interesse, sendo tal molécula denominada como espécie de reconhecimento.

A SAM é uma monocamada montada espontaneamente sobre uma superfície sólida, com a espessura de uma molécula. Este processo é dirigido pela interação de ligações e forças intermoleculares²⁴. O composto a ser utilizado para formar a monocamada deve ser escolhido levando em conta características necessárias da interface, como, por exemplo, agrupamento com afinidade pelo substrato em questão, e um grupo funcional terminal que permita que a superfície possa ser modificada⁴.

A interação específica que ocorre na interface do sistema, pode ser obtida através do uso interações do tipo anticorpo-antígeno^{26; 27; 28}, interações de ácidos nucleicos tais como ADN (ácido desoxirribonucleico) e ARN (ácido ribonucleico) ADN/ARN aptâmeros^{28; 29; 30; 31}, peptídeos aptâmeros^{11; 28} ou por sistemas de inibição como por exemplo biodina-avidina^{32; 33}. Fornecendo assim, um importante meio para transdução de sinal analítico. Diversos trabalhos usando este caminho estão reportados na literatura^{13; 22; 23; 34}, demonstrando a viabilidade desta combinação de técnicas no desenvolvimento dos biossensores. Assim, este trabalho descreve justamente a aplicação da técnica de espectroscopia de capacitância eletroquímica para determinação de proteínas biomarcadoras.

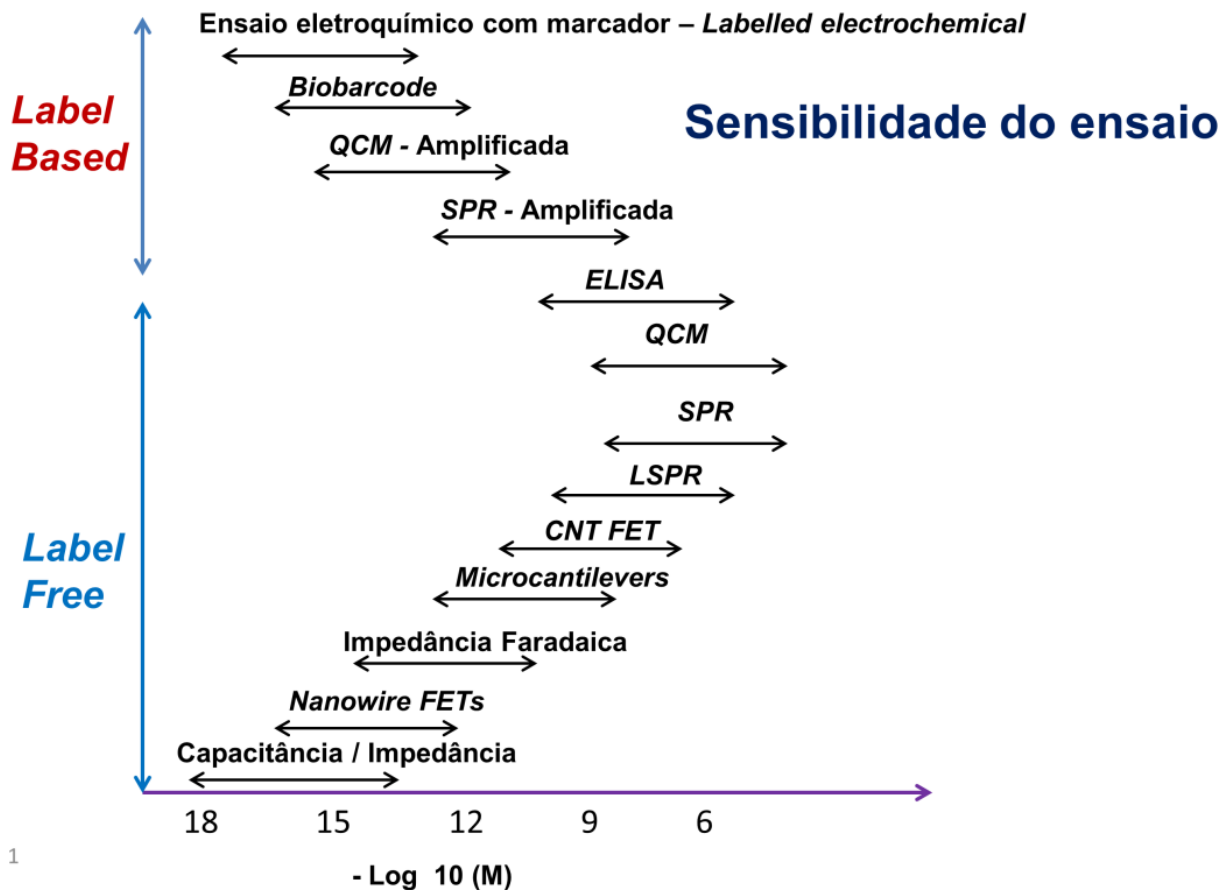


Figura 1.1. Ilustração comparativa da sensibilidade alcançável para diferentes técnicas usadas no desenvolvimento de biossensores. Conforme pode ser notado técnicas capacitivas impedimétricas tem o potencial de oferecer os mais métodos sensíveis e, adicionalmente, em uma plataforma *label-free* (figura extraída e adaptada de *Engineering the Bioelectronic Interface Applications to Analyte Biosensing and Protein Detection*, capítulo 7 *Label-free Field Effect Protein Sensing*³⁵).

1.1 Proteínas

Proteínas são moléculas biológicas de grandes dimensões compostas de sequências de aminoácidos altamente organizados. A massa molecular de proteínas varia entre algumas dezenas a centenas de kilodaltons (kDa) e são construídas a partir de um conjunto de 20 aminoácidos que nas proteínas se encontram ligados por meio de ligações peptídicas³⁶.

Para o desenvolvimento de novos métodos de detecção/quantificação de proteínas biomarcadoras, se faz necessário entender características estruturais e propriedades a respeito destas biomoléculas. Portanto, a seguir será apresentado um levantamento sobre importantes proteínas, tais como: *BCL-6*, beta amiloide, Alfa-sinucleína, proteína C-reativa e a enzima *hPAP*.

A *BCL-6* (sigla em inglês para *B-Cell 6*) é uma proteína encontrada em humanos a qual é codificada pelo gene *BCL-6*. Altos níveis desta proteína em centros germinativos de células B levam a recombinação de genes de imunoglobulina produzindo anticorpos de alta afinidade³⁷. Desta forma, é provável que tal afinidade entre a *BCL-6* e seu anticorpo, possa vim a fornecer um importante meio para transdução de sinal analítico. A região chave responsável pela função desta proteína é o *Poxvirus e zinc-finger* (domínio POZ)³⁸. Este domínio propicia interações com co-repressores transicionais e está sendo considerado como um alvo terapêutico para muitos linfomas B. Tal domínio tem sido utilizado no desenvolvimento de métodos para detecção da proteína *BCL-6*⁴. Um exemplo do referido uso do domínio *POZ* em métodos de análises quantitativas da *BCL-6*, é a utilização de peptídeos aptâmeros. Estes peptídeos são antagonistas da função da *BCL-6* pela ligação ao domínio *POZ*³⁹. Em um trabalho realizado na Universidade de Oxford⁴ os resultados mostraram considerável afinidade do aptâmero construído (HT-12-10 com 2 aptâmeros inseridos) à base da proteína *Stefin A Quadruple Tracy (SQT)* com a *BCL-6*. O limite de detecção alcançado foi de 50 nmol L⁻¹, o qual é superior em termos de sensibilidade comparado ao obtido por métodos ópticos desenvolvidos em paralelo nesse mesmo trabalho, em que o valor de 400 nmol L⁻¹ foi relatado como limite de detecção⁴. Desta forma, estes valores evidenciam o ganho de sensibilidade ao transferir o dispositivo de uma plataforma ótica para uma eletroquímica.

Outro importante biomarcador, o qual pode ser detectado por um sistema de biossensoriamento eletroquímico é a Beta-amilóide (*Aβ* – sigla em inglês para *amyloid beta*). Esta proteína é a maior constituinte encontrada em plaquetas da doença de Alzheimer (DA). A *Aβ* possui a capacidade de se ligar a membrana celular por meio de diversas biomoléculas como lipídeos e proteínas. Contudo, os eventos subsequentes da ligação com a membrana, os quais levam a morte celular, ainda não estão bem compreendidos⁴⁰. Infelizmente, as estratégias de tratamentos existentes para pacientes de Alzheimer, são ineficientes uma vez que o paciente já tenha desenvolvido a doença. Entretanto, terapias potencialmente modificadoras da DA - as quais alcançam maior eficiência em pacientes no estágio inicial da doença⁴¹ - reforçam a necessidade do desenvolvimento de métodos de diagnósticos precoces, antes que os sintomas evidentes apareçam^{6; 41}.

Chicae et al.⁵ desenvolveram um biossensor baseado na técnica de microscopia de tunelamento (*STM* sigla em inglês para: *scanning tunneling microscopy*) para monitorar a ocorrência de interações do tipo anticorpo-antígeno para $A\beta$. O sensor foi construído com nanopartículas de ouro funcionalizadas via *SAM* para imobilização do anticorpo de $A\beta$. O trabalho obteve sucesso na análise semiquantitativa desta proteína, mostrando assim que interações do tipo anticorpo-antígeno podem ser usadas com êxito para transdução de sinal analítico no desenvolvimento de métodos de detecção deste biomarcador.

A terceira proteína aqui descrita é a Alfa-sinucleína. Esta biomolécula não possui função conhecida em indivíduos saudáveis, apenas se conhece sua relação com alterações fisiopatológicas envolvendo corpos de Lewis, tais como doença de Parkinson⁴² e algumas formas da doença de Alzheimer⁴³. Por esta razão pode ser classificada como um biomarcador. A Alfa-sinucleína é uma proteína pequena constituída de 140 aminoácidos e massa molar de 14,4 kDa. Sua estrutura pode ser dividida em três partes denominadas como regiões chaves⁴⁴. A primeira parte é uma região N-terminal consistindo de seis repetições imperfeitas da sequência KTKEGV, com tendência a formar alfa hélices. A segunda parte denominada *NAC* (sigla do inglês *Non-Amyloid Component*), é um domínio central hidrofóbico, o qual corresponde à faixa de aminoácidos 61-95. A última região chave é uma cauda rica em prolina, altamente ácida e desestruturada.

Esta proteína tem um anticorpo correspondente o qual é desenvolvido naturalmente no organismo de um indivíduo que apresenta os primeiros sintomas da doença⁴⁵. Portanto, isto é útil para desenvolver métodos sensíveis para análises de anticorpo de Alfa-sinucleína. Potencialmente, isto seria aplicado ao diagnóstico e rastreamento da doença.

Recentemente, Yanamandra et al.⁷ propuseram o uso do anticorpo de Alfa-sinucleína como biomarcador para doença de Parkinson. A técnica de *SPR* foi usada para quantificação do anticorpo em amostras de soro sanguíneo de pacientes com a doença de Parkinson e amostras controles. A situação inversa, em que a Alfa-sinucleína é usada como biomarcador e o anticorpo é usado como espécie de reconhecimento, também foi avaliada por van Geel et al.⁴⁶. Neste trabalho, os autores desenvolveram um método de quantificação de Alfa-sinucleína em líquido

cefalorraquidiano através da técnica *ELISA*. O limite de detecção alcançado foi de $3,8 \text{ ng mL}^{-1}$ e a faixa linear até 300 ng mL^{-1} .

Porém em outros trabalhos os resultados foram conflitantes, como por exemplo nos casos em que o anticorpo foi usado como espécie de reconhecimento, este apresentou interação com diferentes epítomos desta proteína^{47; 48}. Conseqüentemente, apresentaram diferentes especificidades para diferentes oligômeros de Alfa-sinucleína. Uma alternativa que pode ser vantajosa para detecção do anticorpo da Alfa-sinucleína consiste na aplicação da interação específica deste anticorpo com seu antígeno⁴⁵, no desenvolvimento de técnicas *label free* usando MCQ e EIE, por exemplo.

A quarta proteína a ser descrita é a proteína C-reativa (CRP sigla em inglês para *C-Reactive protein*). Esta proteína é produzida no fígado⁴⁹ e está presente no sangue de indivíduos saudáveis. Em processos inflamatórios o nível dessa proteína pode atingir valores 10.000 vezes acima do normal⁵⁰. Portanto, esta biomolécula é um importante biomarcador para diagnosticar um significativo número de processos inflamatórios. A *CRP* é um pentâmero de 118 kDal de massa molecular, composto por monômeros idênticos os quais são unidos por interações não covalentes. Há diversos métodos usados em análises clínicas para detecção e quantificação de *CRP*, entre os principais estão os métodos enzimáticos como, por exemplo, *ELISA*⁸. O desenvolvimento de novos métodos para detecção de *CRP* livres de interferências e que também apresentem sensibilidade e robustez suficiente para determinar pequenas elevações nos níveis de *CRP* no organismo se faz necessário para que venha a ser possível o diagnóstico de processos inflamatórios em seu estágio inicial.

Kim et al.⁸ relatou o desenvolvimento de um eletrodo de cristal de quartzo, com o corte AT, com dois eletrodos de ouro de 5 mm depositados sobre a sua superfície, o qual foi usado na construção do transdutor. O referido sistema monitora a variação de massa sobre o eletrodo ocorrida em função da interação de *CRP* e o anticorpo da *CRP* (anti-CRP). O limite de detecção alcançado foi de $0,130 \text{ ng mL}^{-1}$, demonstrando a alta sensibilidade da técnica.

A quinta e última proteína a ser descrita nesta seção trata-se de uma enzima denominada fosfatase ácida prostática humana (*hPAP*, sigla em inglês para *Human Prostatic Acid Phosphatase*). A *hPAP* é uma importante enzima fosfatase de células epiteliais diferenciadas da próstata⁵¹ biossintetizados por epitélios secretores

colunares da glândula da próstata⁵². Níveis circulantes de *hPAP* têm sido considerados úteis para fins de diagnóstico pois os níveis séricos desta proteína são baixos em indivíduos saudáveis, no entanto sua elevação ocorre devido a progressão do câncer da próstata⁹. Além disso, a *hPAP* tem demonstrado ser um bom marcador de prognóstico para pacientes em estágio avançado da doença os quais são submetidos à terapia local e tem alto risco de reincidência do câncer de próstata⁵³. De acordo com o melhor do nosso conhecimento, os métodos existentes para detecção de *hPAP* baseiam-se em ELISA⁵⁴, assim, não existem na literatura métodos impedimétricos para a detecção de *hPAP*, sendo os resultados a serem apresentados nesta tese os primeiros obtidos na detecção deste biomarcador¹⁹.

De acordo com o levantamento bibliográfico aqui discutido, é possível constatar que o uso de interações específicas entre biomoléculas são ferramentas potencialmente úteis para análises de detecção/quantificação de proteínas biomarcadoras. Um estudo detalhado e aprofundado pode ajudar a alcançar sistemas altamente sensíveis e seletivos, para análises de proteínas de importância clínica. Para tal propósito, técnicas como EIE e a ECE são excelentes ferramentas para o desenvolvimento de métodos de detecção e quantificação de biomoléculas, em especial proteínas de importância clínica^{11; 16}. Os resultados apresentados na literatura descrevem o desenvolvimento de biossensores os quais usam interações específicas do tipo anticorpo/antígeno, sobre uma plataforma eletroquímica, para transdução de sinal analítico⁴. As principais características destes métodos são: baixos limites de detecção e quantificação, amplas faixas de trabalho para curvas de calibração, grande especificidade e repetibilidade nas análises, bem como a possibilidade de aplicação em análises de rotina. Estas qualidades reunidas em um sistema eletroquímico de análise podem vir a culminar em uma importante ferramenta para o monitoramento da evolução de doenças, assim como, para o diagnóstico precoce de desordens relacionadas a biomarcadores em geral, especialmente proteínas.

2 A espectroscopia de capacitância eletroquímica e a detecção de proteínas biomarcadoras

2.1 Teoria – aspectos gerais

A caracterização impedimétrica de superfícies moleculares nanoestruturadas com *probe* redox confinada tem como vantagem a possibilidade de eliminar na análise dos dados os efeitos de difusão que são comumente limitantes em análises impedimétricas realizadas na configuração convencional, ou seja, aquela em que a *probe* redox está em solução (no eletrólito de suporte)⁵⁵. Adicionalmente, importantes fundamentos inerentes dos processos de transferência elétrica e eletrônica molecular podem ser mais profundamente compreendidos pela análise de tais superfícies moleculares nanoestruturadas eletroativas^{14; 56; 57}.

O uso da voltametria cíclica (VC) para a análise de superfícies moleculares nanoestruturadas com *probe* redox confinada pode ser algo complicado e induzir a erros causados principalmente devido à elevada contribuição da corrente capacitiva na corrente elétrica total a ser medida (veja Figura 2.1), ou ainda devido a efeitos resistivos⁵⁶. Por exemplo, a análise redox pode ser especificamente distorcida devido à resistência não compensada (R_u) que leva a uma queda de potencial não compensada (iR_u) a qual classicamente existe em série com a resistência da solução (iR_s). Estas resistências em série são diretamente sensíveis a características da cela eletroquímicas sendo então propriedades ligadas ao eletrólito suporte, assim, não são propriedades intrínsecas da SAM podendo inclusive ser subtraídos da magnitude total do sinal de corrente⁵⁶. Desta forma, ambos os tipos de contribuição não-faradaica (corrente capacitiva e resistência da solução) podem levar a valores distorcidos do sinal de corrente referente ao processo de transferência de elétrons entre *probe* redox e eletrodo, e conseqüentemente, causar erros de cálculos dos parâmetros cinéticos envolvidos em tal processo^{56; 58}. Em casos particulares a contribuição faradaica pode ser inclusive mascarada pelo ruído e desta forma não ser notado nenhum sinal associado à transferência de elétrons (que é bem caracterizado por picos de correntes catódicos e anódicos no voltamograma) ocorrida devido à *probe* redox adsorvida. Tal efeito de distorção também é visualizado por outros meios como a clássica e fenomenológica análise

de Butler-Volmer onde os efeitos que não são negligenciáveis, tais como a resistência não compensada, iR_u , podem distorcer o gráfico do pico de corrente (i_p) versus a velocidade de varredura do potencial (v) em análises por VC (Figura 2.1a). Para medidas com a *probe* redox livre em solução, a análise Butler-Volmer descreve como sendo linear a relação i_p versus $v^{1/2}$, e como sendo linear para *probe* redox adsorvida a relação i_p versus v . Contudo, os efeitos de distorção causados pelo ruído de fundo elevado ou devido à elevada queda de potencial, iR_u , não permitem a obtenção da relação linear de i_p versus v que é esperada para análises de *probe* redox adsorvida no eletrodo, o que pode levar a várias interpretações termodinâmicas e cinéticas errôneas a respeito dos processos de transferência de carga nesta configuração⁵⁶.

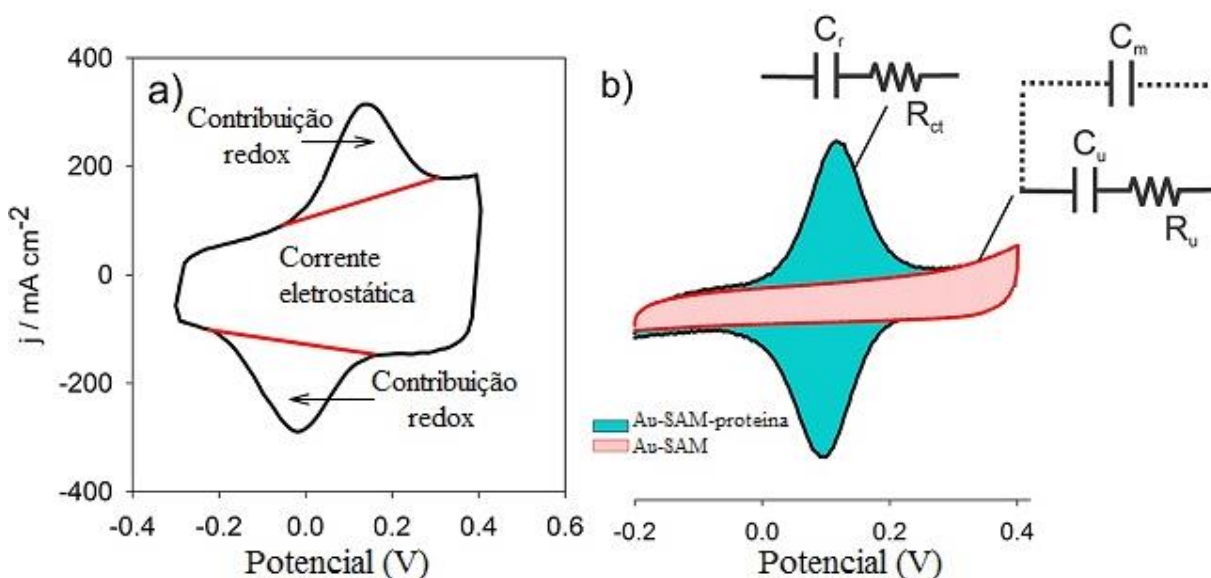


Figura 2.1. (a) Uma análise experimental de VC típica de uma superfície com *probe* redox confinada compreendendo um filme de proteína (azurina) imobilizado sobre uma monocamada de dodecanotiol. Está em destaque a larga contribuição da corrente capacitiva à corrente total, causada por uma distorção dielétrica. A velocidade de varredura foi de 100 mV s^{-1} e o eletrodo de calomelano saturado foi usado como referência. (b) Uma outra representação experimental de voltamograma cíclico (com diferente comportamento do anterior) de uma superfície com *probe* redox confinada compreendendo um filme de proteína no qual os parâmetros dominantes do circuito equivalente responsáveis pela corrente estão representados em termos dos componentes faradaicos (R_{ct} e C_r) e não-faradaico (C_m , R_u , e C_u). O elemento capacitivo da monocamada de suporte, C_m não gera contribuições significantes em nenhum potencial conforme discutido no trabalho de Góes et al¹⁵. (figura extraída e adaptada a partir de Bueno et al. Analytical Chemistry v. 85, n. 1, p. 411-417)⁵⁶.

Existe de fato uma necessidade de entender melhor a contribuição da corrente total medida em ensaios eletroquímicos realizados em superfícies moleculares nanoestruturadas contendo *probe* redox confinada e, assim,

estabelecer uma abordagem que permita segregar de forma mais clara o termo faradaico e não-faradaico no sinal (resistivo e capacitivo)(ver Figura 2.2). Desta forma é importante ter em mente que a natureza do primeiro está associada características particulares da espécie redox acoplada: como o nível de Fermi que determina a região de energia onde o fenômeno de oxidação e redução ocorre (ou o potencial de meia onda, $E_{1/2}$,) ou, ainda, a densidade de núcleo redox por área do eletrodo que determina a intensidade da corrente. Enquanto que o segundo (termo não-faradaico) tem grande influência do papel dielétrico desempenhado pela SAM (que depende da espessura da superfície nanoestruturada construída sobre o eletrodo gerando a separação de cargas na interface) que serve como suporte para o centro redox¹⁵. Portanto, qualquer que seja a abordagem adotada, esta deve levar em conta a atividade redox e o efeito dielétrico do sistema.

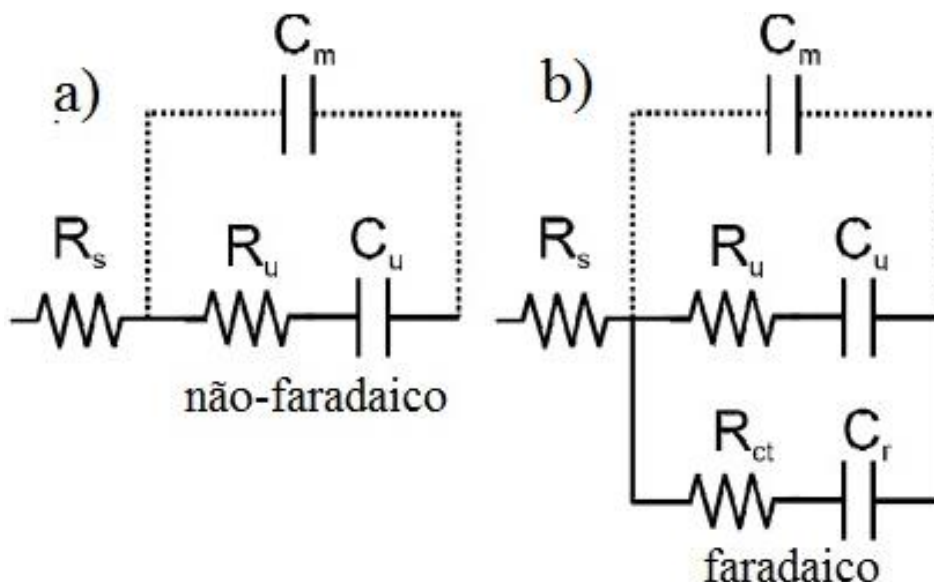


Figura 2.2 (a) O modelo proposto de circuito equivalente, para uma SAM, o qual considera os efeitos dielétricos onde R_u e C_u são a resistência não compensada e a capacitância, respectivamente. (b) O mesmo que em (a), mas com centros redox associados a SAM com a contribuição faradaica representada por uma ramificação na qual R_{ct} é a resistência a transferência de carga, C_r é a capacitância redox, R_s é a resistência da solução ou do eletrólito e C_m é a capacitância eletrônica pura, como por exemplo, a capacitância da monocamada sem a contribuição iônica (a linha pontilhada indica que a contribuição deste termo é baixa). (figura extraída e adaptada a partir de Bueno et al. Analytical Chemistry v. 85, n. 1, p. 411-417)⁵⁶.

Uma abordagem apropriada que permite justamente mapear ambas as contribuições dielétricas e faradaicas redox (quando existente) é a espectroscopia de capacitância eletroquímica (ECE). O surgimento da ECE foi embasada no estudo desenvolvido por Góes et al¹⁵ que visou justamente mostrar a tendência dos valores da capacitância obtidos em virtude da variação da espessura de SAMs sem

atividades redox, espessuras que foram controladas por meio do uso de alcanotióis de diferentes tamanhos (por exemplo, com 6, 10 e 12 carbonos alinhados na cadeia) dentro de uma abordagem que foi nomeada pelos autores como algo do tipo “espectroscopia de capacitância de monocamadas auto-montadas” (SAMCS – sigla em inglês para *self-assembled monolayer capacitance spectroscopic*¹⁵). Os resultados obtidos por Góes e colaboradores¹⁵ se mostraram concordantes com o modelo de placas paralelas de Helmholtz. No entanto a análise por SAMCS mostrou-se mais detalhada resolvendo a tendência da capacitância e os efeitos de distorção da resistência em função da espessura de cada superfície molecular nanoestruturada com *probe* redox confinada¹⁵.

Experimentalmente, a aplicação da SAMCS consistiu em realizar medidas não-faradaicas de impedância usando um sistema de três eletrodos mergulhados em uma solução salina como eletrólito de suporte (por exemplo, NaClO₄ em H₂O). As medidas impedimétricas foram realizadas no potencial de 0,22 V contra o eletrodo de Ag/AgCl e a partir destas medidas, os valores de impedância complexa (Z^*) foram convertidos em capacitância complexa (C^*) usando a relação $Z^* = 1/j\omega C^*$, onde ω é a frequência angular. Os valores de impedância e capacitância devem ser representados em termos de circuito equivalente que considere ambos os termos faráicos e não-faradaicos, conforme ilustrado na Figura 2.2.

Com base no sucesso da abordagem aplicada por Góes na resolução do termo não-faradaico da capacitância para SAMs sem atividade redox, Bueno et al¹⁴ propuseram uma metodologia também baseada em medidas de espectroscopia de capacitância que possibilita o mapeamento das características faradaicas e dielétrica de monocamadas eletroativas, algo denominado pelos autores como “espectroscopia de capacitância de monocamadas eletroativas” (EMCS – sigla em inglês para *electroactive monolayer capacitance spectroscopy*¹⁴), ou ainda, conforme definida neste trabalho, espectroscopia de capacitância eletroquímica (ECE).

O primeiro passo experimental nesta abordagem é a caracterização eletroquímica de monocamadas com atividade redox por medidas de voltametria cíclica, VC, com a finalidade de determinar o nível de Fermi do sistema, ou seja, o potencial elétrico onde ocorre a máxima transferência eletrônica. De forma geral, este potencial é denominado como potencial formal dos sistemas e em sistemas

altamente reversíveis (como aqueles usados neste trabalho) é o mesmo potencial de meia onda do sistema ($E_{1/2}$) (ver novamente a Figura 2.1, pg. 40). As análises por VC também são importantes para determinar a região de potencial fora região redox do sistema (E_{out}), ou seja, a região onde não há transferência eletrônica do sistema. Assim, medidas de impedância realizadas no E_{out} configuram um sistema não-faradaico que é equivalente ao uso de uma monocamada sem qualquer atividade redox intrínseca e, portanto, o termo resistivo, R_u , representa uma resistência iônica típica da SAM acoplada com o termo capacitivo, C_u , o qual existe devido à penetração de íons na monocamada que contribuem para o tempo de relaxação do sistema ($Z_u = R_u C_u$)¹⁵. O circuito equivalente e a C_u em função da frequência para os valores obtidos nas medidas realizadas no E_{out} , estão representados na Figura 2.2a e pelo círculo preto da Figura 2.3, respectivamente.

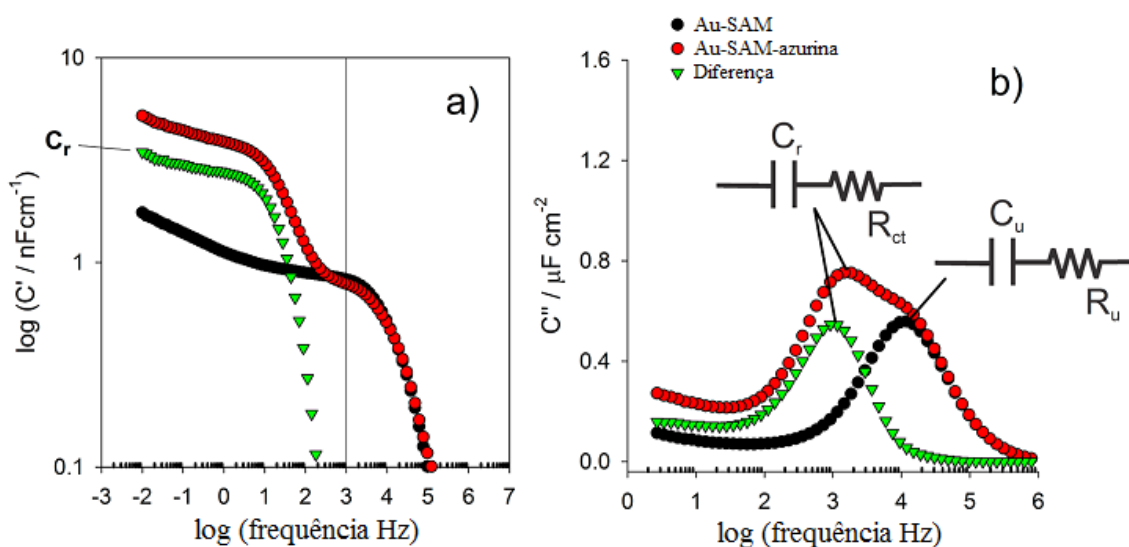


Figura 2.3 Gráficos de Bode ilustrando o componente real (a) e o componente imaginário (b) da capacitância estando ambos os componentes resolvidos na frequência (representada apenas com a expoente na base 10). Os resultados em vermelho são para medidas obtidas no $E_{1/2}$, os resultados em preto são para medidas realizadas no E_{out} e os triângulos em verde representam a subtração dos dados obtidos no E_{out} a partir dos dados obtidos no $E_{1/2}$. As contribuições dos termos faradaico e não-faradaico da resposta capacitiva estão ilustrados em (b). (figura extraída e adaptada a partir de Bueno et al. Analytical Chemistry v. 85, n. 1, p. 411-417)⁵⁶.

Uma vez definidos a exata escala de tempo e o valor para C_u , o valor de R_u pode então ser calculado usando a relação $R_u = 1/\omega_p C_u$ onde ω_p é a frequência angular no pico de relaxação iônica do sistema (Figuras 2.3b e 2.4). Esta resistência intrínseca é a fonte da queda de potencial e pode ter uma significativa contribuição na resistência não compensada do sistema^{15; 56} e, também, permite obter C_u e

calcular R_u para SAMs com diferentes espessuras¹⁵, por exemplo. Subsequentemente, esta abordagem permite calcular a resistência à transferência de carga (R_{ct}) e obter a capacitância redox (C_r) quando o componente redox é incorporado, ou seja, neste caso realizando a medida no $E_{1/2}$ para monocamadas eletroativas (ou superfícies eletroativas nanoestruturadas em geral). Para tal, os valores de capacitância medidos no E_{out} devem ser subtraídos dos valores medidos no $E_{1/2}$, conforme ilustrado nas Figuras 2.3b e 2.4c. Então, a partir destes valores que são referentes apenas ao processo faradaico, se determina a capacitância redox, C_r , bem como se calcula a resistência à transferência de carga por meio da relação $R_{ct} = 1/\omega_p C_r$ onde ω_p é a frequência de pico de relaxação eletrônica do sistema (ressonância elétrons na superfície molecular nanoestruturada com *probe* redox confinada)(Figuras 2.3b e 2.4).

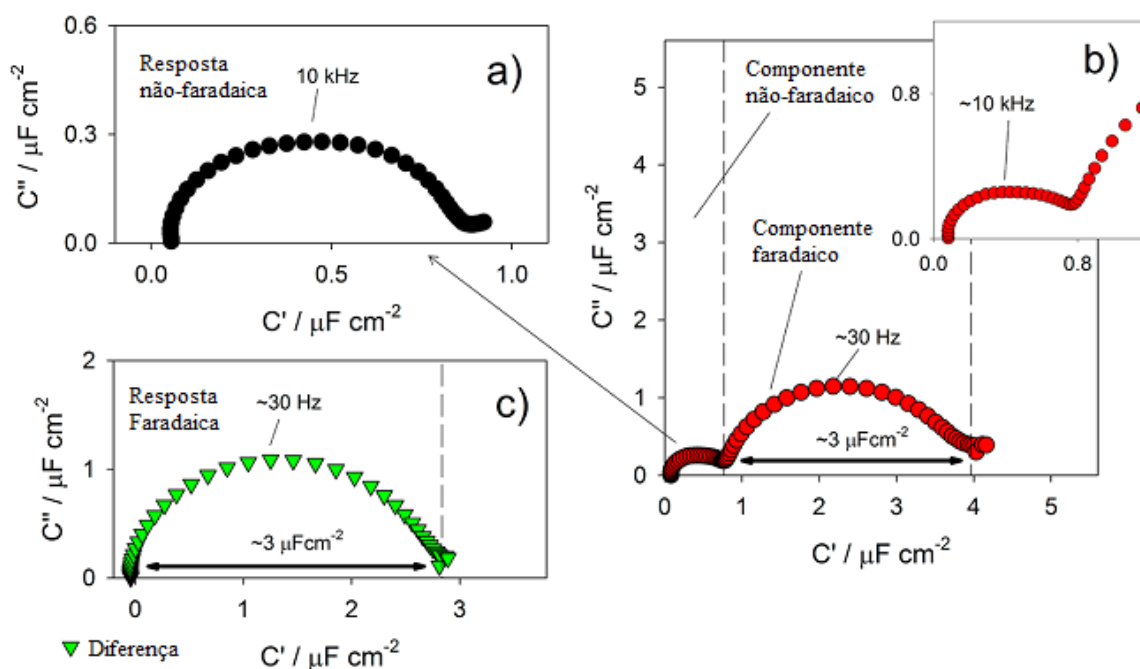


Figura 2.4. Gráficos capacitivos de Nyquist de análises por espectroscopia de capacitância com eletrodos medidos no potencial E_{out} (a) onde a resposta é dominada pelo processo não-faradaico (de um filme de azurina imobilizado sobre dodecanotiol) e também com os eletrodos medidos no potencial de meia onda, $E_{1/2}$ (b). O espectro de capacitância resultante da subtração de (a) a partir de (b) está mostrado em (c), onde a contribuição não-faradaica está corrigida e permanece apenas um semicírculo. O gráfico inserido em (b) corresponde a uma ampliação da região espectral de alta frequência. Em (c) está demonstrado os mesmos dados contidos em (b) após subtração da resposta não-faradaica. O sucesso da subtração da resistência não compensada e da contribuição não-faradaica em (c) pode ser confirmada pela total eliminação da relaxação observada em (b) (amplificação inserida), onde o sinal é totalmente ausente em (c)(figura extraída e adaptada a partir de Bueno et al. Analytical Chemistry v. 85, n. 1, p. 411-417)⁵⁶.

As Figuras 2.3 e 2.4, que foram extraídas/adaptadas do trabalho de Bueno et al⁵⁶, representam todas as etapas desta caracterização por ECE de uma superfície molecular nanoestruturada composta de azurina (molécula com atividade redox) imobilizada sobre uma monocamada de dodecanotiol. Desta forma, se encontram resolvidas espectroscopicamente por capacitância complexa (C^*), a soma das contribuições redox, eletrostática e dipolar iônica presentes nesta superfície molecular nanoestruturada com azurina, conforme representado no gráfico de Bode (Figura 2.3) e Nyquist (Figura 2.4). Este experimento fornece diretamente a cinética de transferência de elétrons que é determinada na frequência onde ocorre o pico de capacitância imaginária (C'') do processo redox (observado na Figura 2.3b). Conforme já explicado, ao subtrair a capacitância/impedância adquirida no E_{out} a partir dos valores medidos no $E_{1/2}$, obtém-se o valor de C_r ao mesmo tempo em que C_u é obtido diretamente das medidas realizadas no E_{out} (Figura 2.3a). Uma vez tendo em mãos os valores de C_r e C_u , e o tempo de relaxação (τ) dos processos faradaicos e não-faradaicos, os quais são resolvidos pelo inverso da frequência (ω) do pico em C'' , é possível calcular os valores de R_{ct} e R_u usando as relações $\tau_r = (R_{ct}C_r)^{-1}$ e $\tau_u = (R_uC_u)^{-1}$ para os processos faradaicos e não-faradaicos, respectivamente.

No caso dos resultados que estão sendo discutidos como modelo nesta seção, os autores reportaram a escala de tempo para os processos não-faradaicos e faradaicos da superfície molecular nanoestruturada composta por dodecanotiol/azurina como sendo de 10 kHz (0.1 ms) e 30 Hz (~30 ms), respectivamente (Figura 2.4a e 2.4c). Esta mesma figura (gráfico de Nyquist) também permite observar os valores de C_u e C_r , sendo estes de $\sim 0.8 \mu F cm^{-2}$ para o processo não-faradaico (C_u) e de $\sim 3.0 \mu F cm^{-2}$ para o processo faradaico (C_r), Figuras 2.4b e 2.4c, respectivamente (a referência Bueno et al⁵⁶ traz maiores detalhes).

Contudo, fica evidente que as características de geração de corrente em superfícies moleculares nanoestruturadas com *probe* redox confinada podem ser definidas em termos de circuito equivalente resolvido por espectroscopia de capacitância, possibilitando assim reportar de forma bem definida as características dipolares e cinéticas e adicionalmente subtrair a distorção causada pela contribuição não-faradaica nas análises cinéticas.

2.2 O significado físico da capacitância redox

Até a subsecção anterior foi descrito de uma forma generalizada como a espectroscopia de capacitância eletroquímica é usada experimentalmente com a finalidade de se obter um sinal capacitivo puramente faradaico em superfícies moleculares nanoestruturadas com *probe* redox confinada, o qual foi nomeado de capacitância redox (C_r). Nesta subsecção o objetivo é definir fisicamente os termos resistivo e capacitivo redox que são associados à caracterização eletroquímica de superfícies moleculares nanoestruturadas eletroativas. Para tal, será usada a tradução de parte do trabalho publicado por Bueno e seus colaboradores⁵⁶, os quais descrevem que:

Uma vez que experimentos de espectroscopia de impedância/capacitância constituem análises em estado estacionário, a variação de corrente com o tempo (ou de fato a velocidade de varredura de voltagem) pode ser simulada pela análise de como os termos constitutivos da capacitância e resistência (faradaico e não-faradaico) do sistema respondem como uma função do tempo. Esta informação é diretamente adquirida conforme detalhado no procedimento experimental (deste referido artigo) e ajustado ao modelo da Figura 2.2 (pg. 40).

O circuito equivalente mostrado na Figura 2.2a foi usado para ajustar os dados de espectroscopia de capacitância obtidos no E_{out} , enquanto que o circuito equivalente da Figura 2.2b foi usado para ajuste dos dados de espectroscopia de capacitância obtidos no $E_{1/2}$. Em outras palavras, uma vez que as contribuições resistivas e capacitivas foram resolvidas dentro do domínio da frequência, a resposta capacitiva que dependente da frequência é então ajustada (conforme procedimento experimental descrito no referido artigo), antes da comparação com os dados de voltametria cíclica adquiridos experimentalmente. A Figura 2.5 resume os resultados em duas taxas de varredura de voltagem, mostrando ambas CVs simuladas a partir das análises de impedância/capacitância (linha vermelha) e aqueles adquiridos independentemente por experimentos (linha preta). Está evidente que a simulação, baseada puramente sobre a geração de dados no domínio de tempo para todos os componentes do circuito equivalente na Figura 2.5, está em excelente concordância com a observação experimental da tendência de voltagem-corrente.

Desde que a capacitância pura da monocamada (C_m) (obtida desconsiderando o efeito ion/solvente do eletrólito suporte) é muito pequena, C_m pode ser desconsiderada e o total da densidade de corrente capacitiva, j , que é então a soma de duas contribuições, a faradaica (j_f) e a não faradaica (j_u), são definidas de acordo com as relações matemáticas a seguir:

$$j_f = \frac{dq_r}{dt} = C_r \frac{dv}{dt} = C_r s \quad (2.1)$$

e

$$j_u = \frac{dq_e}{dt} = C_u \frac{dv}{dt} = C_u s \quad (2.2)$$

Onde todas as capacitâncias são determinadas por unidade de área. V é o potencial com relação ao eletrodo de referência (note que o potencial real de eletrodo é $V - i(R_u + R_s)$), para

a contribuição não-faradaica, e $V - i(R_{ct} + R_s)$ para faradaica, assumindo que os dois termos são responsáveis pela queda da resistência, iR (conforme estabelecido na introdução⁵⁶) e $s = dV/dt$ é a velocidade de varredura do potencial, $q_r = ne$ é a carga redox associada com o centro redox enquanto e denomina a carga elementar, onde n é o número de centros redox ocupados. É importante notar que C_r não é uma capacitância eletrostática comum, cuja o potencial depende exclusivamente sobre a dimensão do capacitor. Isto é, preferencialmente, uma capacitância redox, a qual a ocupação/magnitude depende do nível de centros redox ocupados. q_e é a carga eletrostática da monocamada (com a contribuição iônica incluída¹⁵).

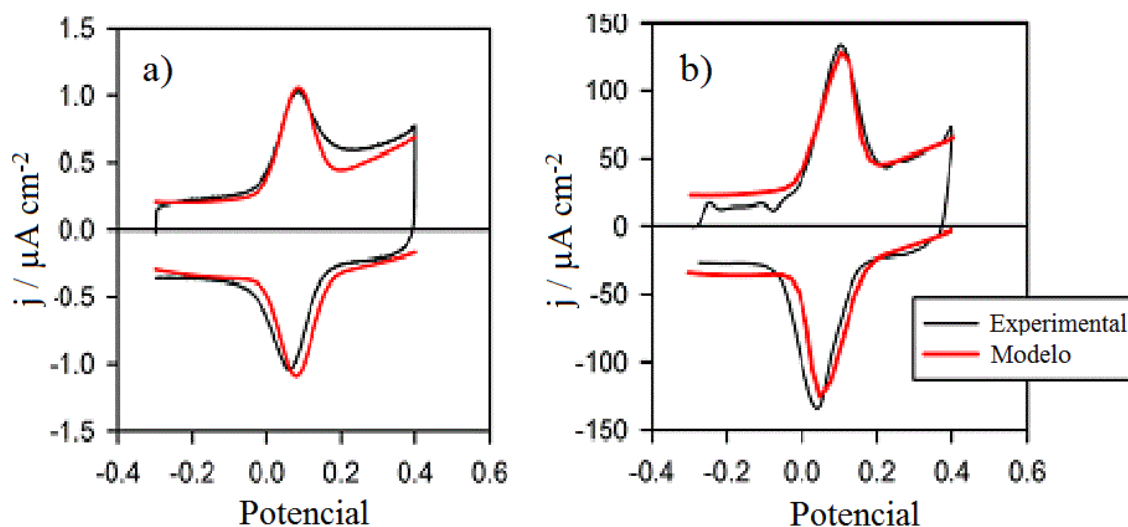


Figura 2.5. Comparação da voltametria cíclica simulada padrão e a obtida experimentalmente para o filme de azurina imobilizada sobre uma monocamada de dodecanotiol. O primeiro foi obtido a partir dos parâmetros de ECE após ajuste ao circuito equivalente mostrado na Figura 2.2 (que considera as características dipolar/eletrostática de monocamadas para medidas realizadas no E_{out} e o termo redox adicional para medidas realizadas no $E_{1/2}$). (a) Voltametria Cíclica obtida/gerada na velocidade de varredura de 4 mV s^{-1} e (b) a 1200 mVs^{-1} . (figura extraída e adaptada a partir de Bueno et al. Analytical Chemistry v. 85, n. 1, p. 411-417)⁵⁶.

Conforme demonstrado em um trabalho prévio por Góes et al, é esperado que a magnitude de R_u dependa linearmente da espessura da SAM¹⁵. Da mesma forma, se espera que o R_{ct} também aumente com a espessura da SAM, no entanto, exponencialmente, uma vez que o R_{ct} neste caso responde especificamente ao sitio redox acoplado ao eletrodo de acordo com a relação $1/R_{ct} \propto \exp(-\beta L)$, onde β é a constante (o “parâmetro de decaimento da distância”), e L é a espessura da monocamada. Assim, para qualquer dado L , o R_{ct} será mínimo no potencial reversível do eletrodo ($E_{1/2}$) conforme mostrado na Figura 2.6a. Uma vez entendido as bases físicas destes componentes do circuito, é então possível examinar a direta contribuição destes componentes nos resultados experimentais observados por VC.

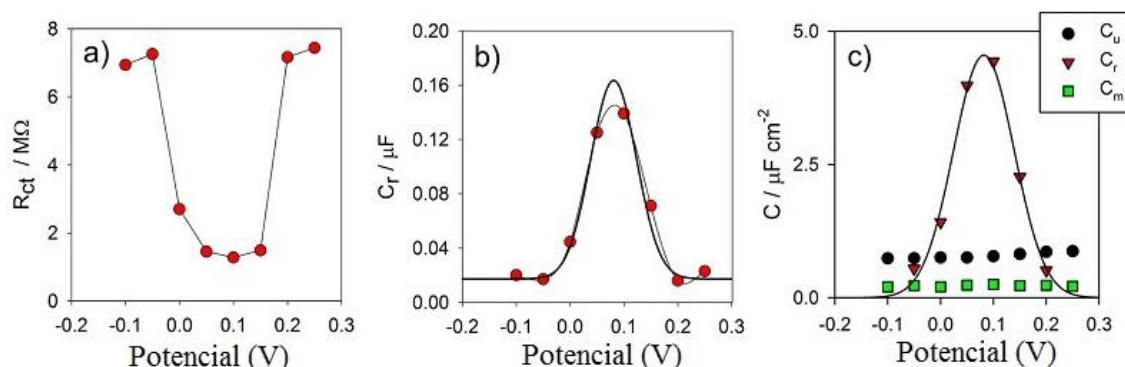


Figura 2.6. (a) Resistência de transferência de carga como uma função de potencial conforme obtido a partir do ajuste dos dados de capacitância/impedância ao circuito equivalente da Figura 2.2b, mostrando que o valor mínimo está por volta do potencial reversível para qualquer espessura fixada da SAM. (b) A capacitância redox (A Gaussiana ajustada em preto) como uma função do potencial obtido (em vermelho) a partir dos dados de capacitância/impedância ajustados ao circuito da Figura 2.2b em diferentes potenciais do estado estacionário. Esta capacitância controla a corrente redox de acordo com a Eq. 2.1 e, conforme discutido no texto principal, reporta diretamente a interação da distribuição Fermi-Dirac do eletrodo com o sítio de densidade de estados ocupados redox. Através da dependência de potencial desta interação (carregamento), a função C_r , controla diretamente o formato do pico voltamétrico. (c) A comparação da magnitude de todos os termos capacitivos com respeito à C_r , expressos como uma função de potencial, mostrando que C_r é dominante sobre os demais termos capacitivos na janela redox. (figura extraída e adaptada a partir de Bueno et al. Analytical Chemistry v. 85, n. 1, p. 411-417)⁵⁶.

Anteriormente ficou definida a origem física do termo resistivo que contribuem e potencialmente distorcem as análises de voltametria e, adicionalmente, destacado que este termo capacitivo, C_r , reporta diretamente a eficiência da transferência de carga. A população deste termo (o pico de VC) é dependente sobre a estatística de Fermi-Dirac, em uma forma que a contribuição não-faradaica, a qual envolve a relaxação iônica, não é. Especialmente, a corrente faradaica, j_f , depende do potencial de acordo com $f = n/\Gamma = F(E_r, \mu_e)$ e também da densidade/cobertura da superfície do grupo redox, onde:

$$f = F(E_r, \mu_e) = \frac{1}{1 + \exp[(E_r - \mu_e)k_B T]} \quad (2.3)$$

E_r é o potencial formal do estado redox ou $E_{1/2}$, e μ_e é o potencial químico do elétron (ou do nível de Fermi, E_F) que é relacionado ao potencial do eletrodo V pela relação:

$$dV = -\left(\frac{1}{e}\right) d\mu_e \quad (2.4)$$

A partir da derivada da Eq. 2.3, é possível definir C_r , para um estado singular de energia redox, E_r ^{14; 56}, como sendo.

$$C_r = e^2 \Gamma \frac{df}{d\mu_e} = \frac{e^2 \Gamma}{k_B T} f(1-f) \quad (2.5)$$

Note que k_B e T são a constante de Boltzmann e a temperatura absoluta. Assim, a correspondência (pela combinação das Equações 2.1 e 2.5) entre o pico de corrente resolvido em VC (atividade faradaica) e a função de ocupação redox, $f = n/\Gamma$, onde Γ é o grau de revestimento de centros redox na superfície, que então de acordo com a Eq. 2.1, apresenta o máximo valor de C_r quando $f = 1/2$ e $f(1-f) = 1/4$.

Se considerarmos, mais realisticamente, a distribuição de estados, $g_r(\mu_e)$, por volta de E_r , ao invés de um estado singular de energia redox, a capacitância redox é obtida integrando a contribuição de todo o estado de energia disponível, assim:

$$C_r = e^2 \int_{-\infty}^{\infty} g_r(\mu_e) \frac{df}{d\mu_e} d\mu_e = \frac{e^2 \Gamma}{k_B T} \int_{-\infty}^{\infty} g_r(\mu_e) f(1-f) d\mu_e \quad (2.6)$$

Ao considerar a temperatura próxima de zero para a estatística de Fermi temos:

$$C_r(\mu_e) = e^2 g_r(\mu_e). \quad (2.7)$$

[por exemplo, a capacitância redox é proporcional à densidade de estados ocupados do sistema (DOS – sigla em inglês para *density occupied state*), $g_r(\mu_e)$. Finalmente, $g_r(\mu_e)$ pode ser escrita como:

$$g_r(\mu_e) = \frac{1}{\sigma_g \sqrt{2\pi}} \exp \left[-\frac{(E_r - \mu_e)^2}{2\sigma_g^2} \right] \quad (2.8)$$

Desde que a distribuição de E_r será representada pela função Gaussiana reportando sobre a propagação, combinando as Equações 2.7 e 2.8, a mesma função Gaussiana fornece a tendência de C_r em função da potencial (Figura 2.6b), Isto possibilita a resolução de E_r ($\sim 82 \pm 4$ meV versus Calomelano Saturado), σ ($\sim 57 \pm 4$ meV) (indicativo de uma distribuição Nerstiniana dos estados redox), e finalmente como já demonstrado em trabalhos prévios, também a determinação de Γ ($1,6 \pm 0.2$ pmol cm^{-2}).

Em termos de estatística de Fermi-Dirac f não pode ser considerado como n/Γ , uma vez que esta relação descreve a capacitância considerando a adsorção de um estado redox de energia singular. O caso de capacitância distribuída como na Eq 2.6, a ocupação de Fermi-Dirac é descrita como $f(\mu_e) = n/g_r(\mu_e)$, (lembrando que μ_e é o potencial químico do elétron, ou do nível de Fermi, E_F e $g_r(\mu_e)$ é a distribuição de estados) onde $g_r(\mu_e)$ tem a forma de Gaussiana (Eq. 2.8). Este modelo de estrutura da energia distribuída indica o fato que os estados redox que foram acoplados não estão unicamente adsorvidos (quimicamente independentes do estado dos metais), mas estes estados estão firmemente presos à superfície metálica formando um estado hibridizado⁵⁹, por exemplo, associado e quimicamente acoplado ao estado eletrônico do metal. Isto de fato dá origem a estados quânticos confinados e para tal conjunto de configuração, os elétrons nos centros redox confinados, não são mais considerados partículas de Boltzmann, mas em vez disto, níveis energéticos prolongados dos estados metálicos⁵⁶. Assim, a concentração total de elétrons que ocupam o estado redox na camada é dado por:

$$n = \int_{-\infty}^{\infty} \frac{g_r(\mu_e)}{1 + \exp[(E_r - \mu_e)/k_B T]} d\mu_e \quad (2.9)$$

Conforme já explicado, usando a EMCS é possível obter a contribuição eletroquímica (ou faradaica) destituído da relaxação dipolar da monocamada (contribuição não-faradaica).

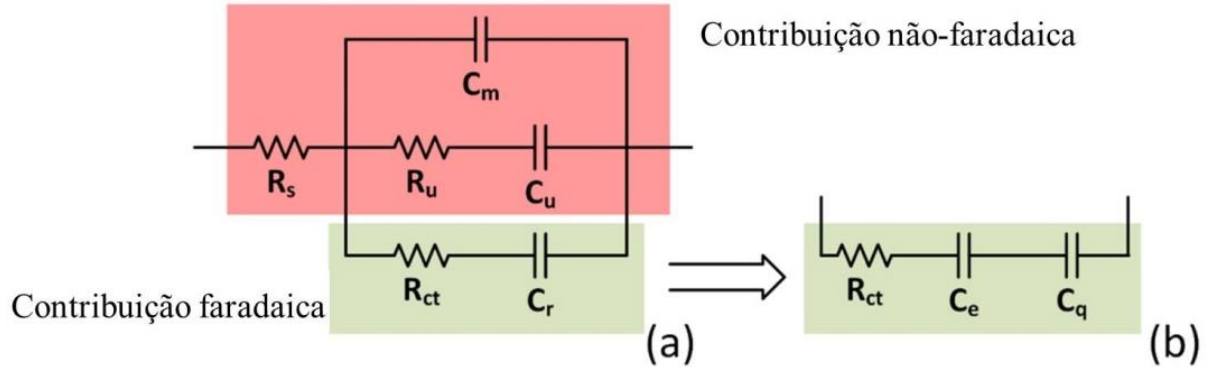


Figura 2.7. Modelo de circuito equivalente de uma monocamada auto-montada com *probe* redox confinada. R_s é a resistência da solução, R_u e C_u são a resistência e capacitância não compensada, respectivamente, C_m é a capacitância da monocamada. Estes termos constituem a contribuição não-faradaica^{14; 56}. A contribuição não-faradaica é constituída pela resistência de transferência de carga (R_{ct}) e a capacitância redox (C_r)[Figura (a)]. O termo C_r é ainda composta de um termo quântico e outro eletrostático, C_q e C_e , respectivamente [Figura (b)].

Na configuração faradaica ou o circuito mostrado na Figura 2.7a, o termo C_r pode ainda ser dividido em duas contribuições em série (Figura 2.7b), sendo um deles um termo eletrostático clássico, e o outro decorrente do carregamento dos orbitais de estado moleculares quantizados. Assim, o termo C_r é composto da soma duas contribuições capacitivas em série $1/C_r = 1/C_e + 1/C_q$ ^{60; 61}, onde por definição C_e é a contribuição puramente eletrostática associada com a separação de cargas em si e C_q é a capacitância quântica a qual a definição é baseada na densidade de estados ocupados (DOS - sigla em inglês para *density occupied state*)⁶⁰, e dada por

$$\frac{1}{C_q} = \frac{1}{e^2} \left(\frac{1}{g_r(\mu_e)} + \frac{1}{g_m(\mu_e)} \right) \quad (2.10)$$

Onde $g_r(\mu_e)$ foi previamente definido como a densidade de estados ocupados do sistema redox (DOS-redox) e $g_m(\mu_e)$ é o DOS na superfície metálica (DOS-metal). Desde que $g_m(\mu_e) \gg g_r(\mu_e)$ assim a partir da Eq. 2.10, $C_q = e^2 g_r(\mu_e)$, equivalentemente ao que foi obtido pela integração da Eq. 2.6, considerando a temperatura aproximadamente zero, C_r é aproximadamente C_q .

2.3 Capacitância redox e o (bio)sensoriamento

Na subseção anterior foram descritos importantes aspectos experimentais relacionados à coleta de dados, bem como foi realizada a definição teórica da caracterização por espectroscopia de capacitância eletroquímica (ECE) de superfícies moleculares nanoestruturadas com *probe* redox confinada, onde o termo redox da capacitância pode ser isolado do termo eletrostático (não-faradaico). Toda a definição da capacitância redox, C_r , foi discutida e definida fisicamente tomando-se como exemplo uma superfície molecular nanoestruturada eletroativa construído pela imobilização da azurina sobre uma monocamada de dodecanotiol. C_r é um termo dependente da frequência e do potencial e apresentou neste referido caso a magnitude aproximadamente 3.5 vezes maior que a contribuição de Helmholtz⁵⁶ (veja subseção 2.2). A magnitude de C_r depende basicamente do DOS na superfície molecular nanoestruturada com *probe* redox confinada que foi construída sobre o eletrodo e, conseqüentemente, o DOS depende do grau de revestimento de núcleos redox sobre a superfície, Γ . Por exemplo, no estudo de superfícies moleculares nanoestruturadas de azurina o valor obtido para o Γ foi de $1,6 \pm 0,2$ pmol cm⁻² (centros metálicos de cobre). Entretanto, outros tipos de superfícies moleculares nanoestruturadas com *probe* redox confinada, como aqueles a base de ferrocenotióis, o Γ pode chegar a valores de 283 ± 27 pmol cm⁻² (quase duas centenas maior, o que está de acordo com a diferença de tamanho das moléculas de azurina e ferroceno)⁵⁷. Conseqüentemente, o sinal de capacitância redox é então centenas de vezes maior do que aquele gerado pela contribuição de Helmholtz⁵⁷ (capacitância não-faradaica C_u) e, também aproximadamente duzentas vezes maior do que o valor de C_r obtida com a superfície moleculares nanoestruturada de azurina^{56;57} ($\sim 3,0$ $\mu\text{F cm}^{-2}$ e $360\mu\text{F cm}^{-2}$ para a superfície moleculares nanoestruturada de azurina e para a monocamada de 11-ferrocenylundecatiol, respectivamente).

O uso da capacitância em sistemas não-faradaicos, apresenta uma conhecida baixa sensibilidade ao monitoramento de modificações sobre a superfície de eletrodos modificados com SAMs⁶². O que torna o uso da capacitância, neste tipo de configuração, difícil para a construção de biossensores baseados em interações específicas (por exemplo, anticorpo/antígeno). A razão física para isto é bem

simples, neste caso o valor de capacitância depende de forma inversamente proporcional à distância de separação de cargas e, considerando a larga espessura da superfície molecular nanoestruturada composta de SAM/anticorpo, a magnitude da capacitância será pequena (1 a 3 $\mu\text{F cm}^{-2}$) o que torna o monitoramento de alteração dielétrica da interface, devido à agregação do antígeno, quase imperceptível (pouca variação no valor de capacitância em função da imobilização do analito). Porém, quando se faz uso de superfícies moleculares nanoestruturadas com centros redox metálicos confinados, como por exemplo, grupos ferroceno, a magnitude da capacitância é enorme (de 100 a 300 $\mu\text{F cm}^{-2}$)^{17; 19} devido a contribuição redox no valor total da capacitância e, mais importante, as superfícies moleculares nanoestruturadas redox respondem sensivelmente a modificações na sua interface.

Diante de tudo o que foi descrito até o momento, a hipótese de nosso grupo foi que o uso de monocamadas mistas contendo grupos ferrocenos e centros receptivos, sendo o último obtido por meio da imobilização de espécies receptivas (ex. anticorpo) sobre porções funcionalizáveis de SAMs mistas, tais como alcanotióis ou mercapto alcanotióis ácidos, poderia servir de plataformas para a detecção de analitos usando a capacitância redox como sinal transdutor^{17; 18; 19; 20; 21}. De fato, esta abordagem mostrou-se extremamente eficiente conforme será mostrado no decorrer desta tese.

A priori o objetivo é explicar a natureza eletrônica da capacitância redox, bem como o mecanismo de variação do sinal, C_r , em função de modificações na interface do eletrodo funcionalizado. Primeiramente, vale lembrar que a determinação de C_r é obtida por medidas de impedância derivadas em capacitância realizadas por meio de uma perturbação de pequena magnitude no potencial de máxima transferência eletrônica do sistema ($E_{1/2}$), onde o valor de C_r é determinado na frequência de relaxação do sistema (ver novamente as Figuras 2.3a e 2.4c, pg. 43 e 44, respectivamente). Este valor de C_r é definido como um estado singular de energia redox E_r ^{14; 56} sendo que a distribuição deste E_r ao longo da faixa de potencial de atividade faradaica é representável pela função Gaussiana. Assim, combinando as Eq 2.7 e 2.8, a mesma função Gaussiana faz a tendência de C_r com o potencial (Figura 2.6b). A somatória de toda a transferência de carga na faixa de potencial de

atividade faradaica permite o mapeamento da densidade de estados ocupados redox (DOS-redox) do sistema^{57; 61}, ou seja, permite determinar a quantidade de núcleo redox por área que estão recebendo elétrons na superfície molecular nanoestruturada com *probe* redox confinada que se encontra imobilizado na superfície do eletrodo (assim, C_r é proporcional ao DOS-redox). Portanto, o DOS-redox é produto do nível de energia molecular quantizada e fornece uma contribuição quântica a natureza de C_r (além da natureza eletrostática – ver Eq. 2.10 na *Subsecção 2.2*). Assim, a variação do sinal de C_r em função de modificações sobre a superfície de uma superfície molecular nanoestruturadas com *probe* redox confinada se deve a variação desta capacitância quântica associada.

A natureza quântica da variação de C_r em função de modificações na superfície começou a ser entendida a partir da publicação do trabalho de Bueno & Davis⁵⁷ onde, usando diferentes superfícies moleculares nanoestruturadas com *probe* redox confinada, os autores elucidaram o efeito dielétrico no nível de dispersão da atividade redox ao longo do potencial aplicado. Resumidamente, os autores provaram que a densidade de elétrons por volume de uma superfície moleculares nanoestruturada com *probe* redox confinada não varia devido à variação da constante dielétrica do meio, variando unicamente a forma de distribuição da energia total do sistema (quantizada) (o efeito dielétrico sobre o montante de estados ocupados, ou concentração de elétrons é essencialmente independente dos efeitos dielétricos ou das entidades redox acopladas com o estado metálico)⁵⁷ (Figura 2.8a). Com base nesta informação se passou a trabalhar na hipótese de que a variação do sinal C_r causado por imobilizações sobre a superfície molecular nanoestruturada com *probe* redox (tais como a ligação do analito no sítio receptivo, como por exemplo, um antígeno ligando ao anticorpo imobilizado) não pode ser atribuída a um efeito de distribuição dielétrica particular, como no caso reportado por Bueno & Davis⁵⁷, mas sim ao fato que a capacitância redox está relacionada com a densidade de ocupação de elétrons na camada molecular redox. Portanto, nossa hipótese é de que a referida sensibilidade a modificações na superfície está associada à uma variação da densidade de centros metálicos que estão com orbitais ocupados por elétrons, ou em outras palavras, pela variação da densidade de estados ocupados (DOS).

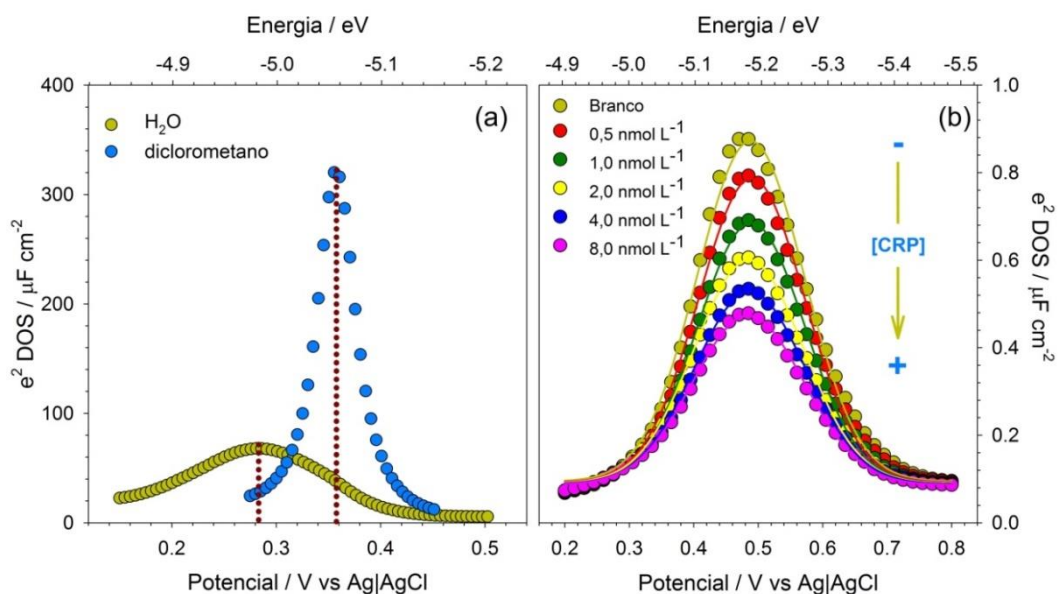


Figura 2.8. (a) O efeito da constante dielétrica do meio (solução aquosa e diclorometano, DCM) sobre formato do DOS, ou seja, sobre a distribuição de energia de uma camada bioreceptiva. Note que o efeito da constante dielétrica do meio leva a um espalhamento do DOS e a uma variação no nível de energia de Fermi dos estados moleculares (indicado pela linha pontilhada), o qual é drasticamente afetado pela constante dielétrica do meio, embora a densidade volumétrica de elétrons não é afetada sendo esta em torno de 10^{19} estados por cm^{-3} , independente do meio de suporte (H_2O ou DCM). (b) Variação do DOS devido a interação entre o anti-CRP, imobilizado sobre a monocamada com *probe* redox confinada, com o analito CRP em concentrações abrangendo de 0,5 a 8,0 nmol L^{-1} em PBS. Medidas realizadas em solução de 20 mmol L^{-1} de TBAClO_4 dissolvidos em acetonitrila/ H_2O 20:80 usada como eletrólito de suporte. Valores obtidos através de medidas realizadas em triplicata.

Com base na última hipótese levantada, um dos pontos investigados neste trabalho de doutorado foi o impacto da ligação da proteína CRP nos sítios de reconhecimento bioquímico do anticorpo anti-CRP imobilizado em monocamadas redox. Primeiramente, se observando em termos de impacto dielétrico do ambiente de medida (Figura 2.8a), nenhuma variação foi observada no DOS-redox das medidas mostradas na Figura 2.8a, porém existe uma grande variação na distribuição de energia e no nível energético de Fermi, com o último variando de 0,28 V em H_2O para 0,36 V em diclorometano vs. Ag|AgCl (veja *Bueno & Davis*⁵⁷ para maiores detalhes). Por outro lado, conforme mostrado na Figura 2.8b, a variação da energia da densidade de estado é mínima devido à ligação da CRP, pois não foi encontrada variação na energia redox do nível de Fermi, ou $E_{1/2}$, (constante ao redor de 0,5 V vs. Ag|AgCl), mas a variação na ocupação da densidade dos estados ocupados redox, DOS-redox, decresceu 70% (calculado pelas áreas das Gaussianas) até a concentração de 8,0 nmol L^{-1} de CRP. Adicionalmente, foram realizados controles negativos a fim de comprovar que estas

respostas são específicas para a proteína CRP (Figura 2.9). As análises de controle negativo foram realizadas de duas formas: *i*) Primeiro foi avaliada a resposta de superfícies moleculares nanoestruturadas puramente compostos por 11-Ferrocenilundecatiol sem o anti-CRP contra a equivalente concentração de CRP. *ii*) Em segundo, a superfície molecular nanoestruturada com *probe* redox confinada e receptiva (com o anti-CRP imobilizado sobre uma monocamada mista de 11-Ferrocenilundecatiol e 16-Mercapto-hexadecanotiol ácido), foi testado contra uma faixa de concentração de fetuína equivalente a usada de CRP. Em ambas as análises de controle a resposta foi inferior a 3% (contra 70% de variação do DOS-redox para a superfície receptiva em função da ligação da CRP).

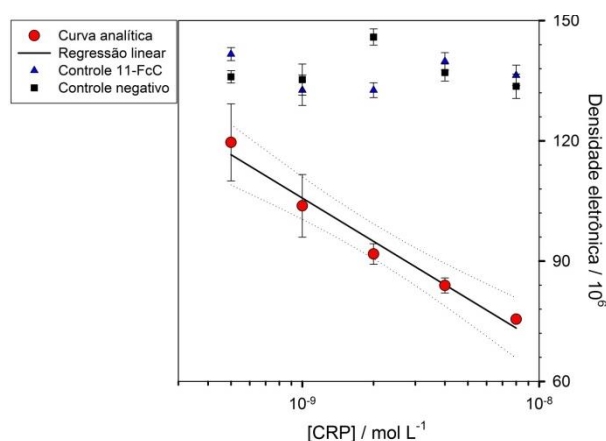


Figura 2.9. Relação linear entre o logaritmo natural da concentração de CRP (curva analítica) e o sistema de densidade de elétron. A densidade eletrônica foi calculada pela integração das curvas normalizadas pelo volume das SAMs (um comprimento de 3,5 nm foi usado para o 11-ferrocenilundecanotiol). Adicionalmente, o desvio padrão foi calculado através de medidas em triplicatas. A figura também mostra dois controles de superfícies, o primeiro da superfície receptiva usada contra uma faixa de concentração de fetuína-A equivalente a usada para CRP (0,5 a 8,0 nmol L⁻¹) e o segundo controle mostrando a ausência de interação da CRP, em diferentes concentrações, sobre uma monocamada composta apenas de 11-ferrocenilundecanotiol.

Estas observações se correlacionam bem com a hipótese assumida de que o decréscimo em C_r é meramente em termos do decréscimo na densidade de estados ocupados redox que ocorre conforme o anti-CRP adjacente interage com a CRP “capturada” da solução em que a proteína se encontra diluída. Uma vez que não há interação química direta entre o anti-CRP e os grupos ferrocenos, estes centros redox são sensíveis a ligação da CRP muito provavelmente devido a perturbações causados pela presença das proteínas próximo aos orbitais eletrônicos dos centros metálicos presentes, fazendo com que este orbital não possa mais ser “ocupado” por elétrons e, conseqüentemente, fazendo com que o DOS-redox diminuía (assim como C_r).

3 Protocolo geral de limpeza e polimento de eletrodos de trabalho.

Esta secção descreve a etapa de pré-tratamento dos eletrodos usada para realização de todas as medidas relatadas nesta tese. Neste procedimento de preparação, a rugosidade da superfície dos eletrodos polidos foi rigorosamente controlada com o intuito controlar a qualidade de formação das monocamadas⁶³ usadas para construção das superfícies moleculares nanoestruturadas contendo *probe* redox confinada

3.1 Polimento e limpeza do eletrodo

3.1.1 Equipamentos e célula para as medidas eletroquímicas

Para as medidas eletroquímicas foi utilizado um potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT302N (Metrohm), uma célula eletroquímica de vidro comum contendo o eletrodo de trabalho de ouro convencional (tarugos de disco rotativos com diâmetros de 2 ou 1,6 mm da METROHM e BASi, respectivamente), um eletrodo auxiliar de platina em forma de rede ($A_{geom} = 1,0 \text{ cm}^2$) e um eletrodo de referência de Ag|AgCl, KCl (3 mol L⁻¹). O polimento físico dos eletrodos(Au) foram realizados em uma polítriz usando-se pasta de alumina com granulometria de diferentes tamanhos (1,0; 0,3 e 0,5 μm).

3.1.2 Procedimentos

A primeira etapa consiste no polimento mecânico, em polítriz, dos eletrodos com pastas de alumina composta de partículas de diferentes granulometrias (1,0; 0,3 e 0,5 μm sempre usadas do maior para o menor tamanho de partículas). Após cada etapa de polimento o eletrodo é colocado para sonificação em água em um banho de ultrassom por 1 minuto. Em seguida, é aplicada uma dessorção redutiva ao eletrodo de ouro com a finalidade de remover impurezas adsorvidas

covalentemente na superfície do eletrodo (por exemplo, tióis previamente estudados)⁶⁴. Para tal, se realiza a voltametria cíclica aplicando uma varredura de potencial (50 mV s^{-1}) (400 ciclos) entre $-0,5$ e $-1,5 \text{ V}$ [Ag|AgCl, KCl (3 mol L^{-1})] em solução aquosa de NaOH ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$). Para realização desta etapa o eletrólito deve ser aquecido a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ e, em seguida, purgado por cinco minutos com um fluxo gás Ar (argônio) ou N_2 para remoção de O_2 dissolvido no meio eletrolítico [o fluxo deve ser mantido no decorrer da obtenção das medidas eletroquímicas em menor fluxo (próximo de uma bolha por segundo)]. Em seguida, o eletrodo é lavado e seco sob fluxo de Ar ou N_2 . Na etapa seguinte deve ser realizado o processo de limpeza eletroquímica que consiste em uma varredura de potencial linear entre $-0,2$ e $1,5 \text{ V}$ (25 ciclos), seguido por uma varredura de potencial entre $0,2$ e $0,75 \text{ V}$ (Ag|AgCl, KCl [3 mol L^{-1}]) (10 ciclos), ambos a uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} em solução aquosa de H_2SO_4 $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. A área eletroquimicamente ativa (ou área geométrica) pode ser então calculada por meio da integração da área do pico anódico de remoção de óxido, do último ciclo (25 ciclos) dos voltamogramas obtidos na limpeza eletroquímica, sendo que a corrente capacitiva também deve ser subtraída no cálculo⁶³. O valor obtido da integração foi dividido por um valor médio de constante de condutividade do ouro ($390 \pm 10 \text{ } \mu\text{C cm}^{-2}$ descrito por Trasatti et al⁶⁶), ou seja, a determinação da área real (A_r) do eletrodo se dá pela razão do valor de integração do pico anódico pela constante de condutividade de Au^{65; 66} (ver figura 3.1). Com base na área real obtida foi calculado o fator de rugosidade (F_R) usando a relação $F_R = A_r/A_g$, onde A_g , é a área geométrica do eletrodo. Para garantir uma boa qualidade das SAMs formadas sobre o eletrodo, o F_R deve ser mantido entre 1,1 e 1,3⁶³ e, dependendo do grau de imperfeição da superfície (F_R acima de 1,3), o procedimento de polimento mecânico e limpeza eletroquímica devem ser repetidos até se atingir o F_R desejado. A imersão do eletrodo em etanol absoluto após essas etapas é recomendada para a redução química do óxido de ouro na superfície, sendo que esta imersão deve ser realizada em temperatura ambiente e em condições sem agitação durante 15 a 20 minutos.

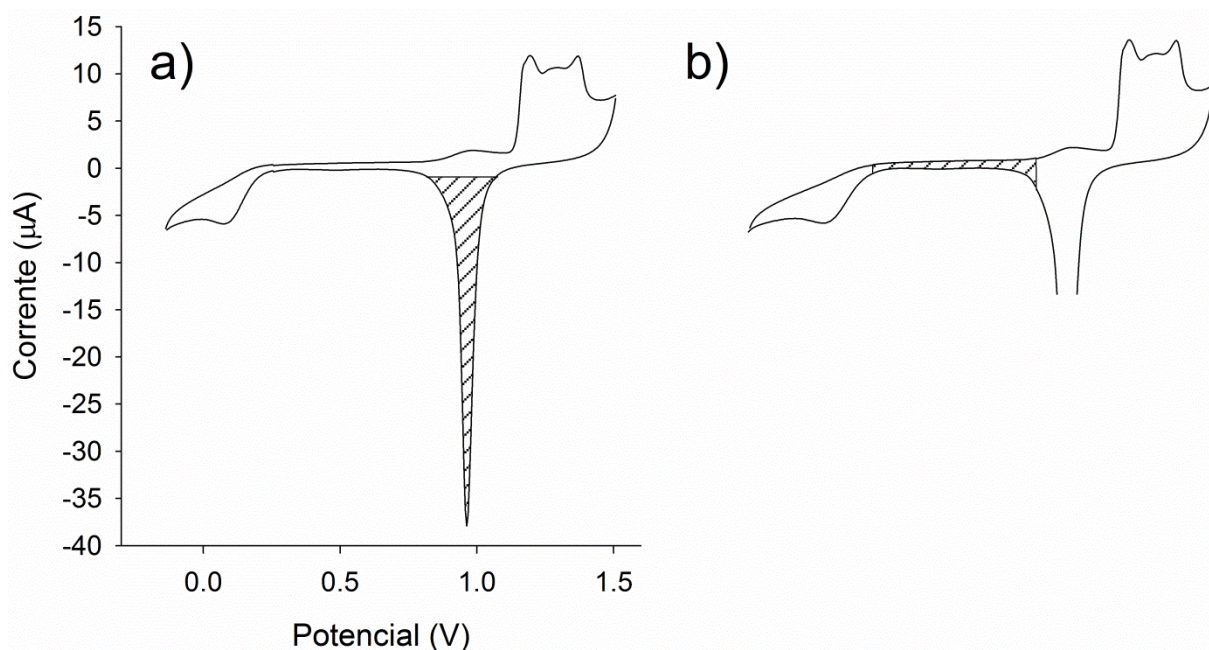


Figura 3.1 Voltamograma de limpeza eletroquímica em H_2SO_4 ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) a uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , no qual o pico (área hachurada em a) representa a formação/dessorção de óxido (Figura 3.1a), enquanto que a parte destacada como zona da dupla camada capacitiva (Figura 3.1b), representa a capacitância interfacial.

Após a etapa de limpeza, os eletrodos foram devidamente caracterizados de acordo com cada abordagem a ser usada (EIE faradaica, EIE não-faradaica, ECE – detalhes reportados nas respectivas secções) e novos procedimentos de dessorção e polimento eletroquímico realizados para garantir a total limpeza da superfície do eletrodo antes da imobilização das respectivas SAMs. O tempo de incubação nas soluções de tióis para formação das SAMs foi fixado em 16 h. Todo o procedimento de polimento dos eletrodos e formação das superfícies moleculares nanoestruturadas receptivos estão resumido no fluxograma da Figura 3.2.

Detalhes Experimentais

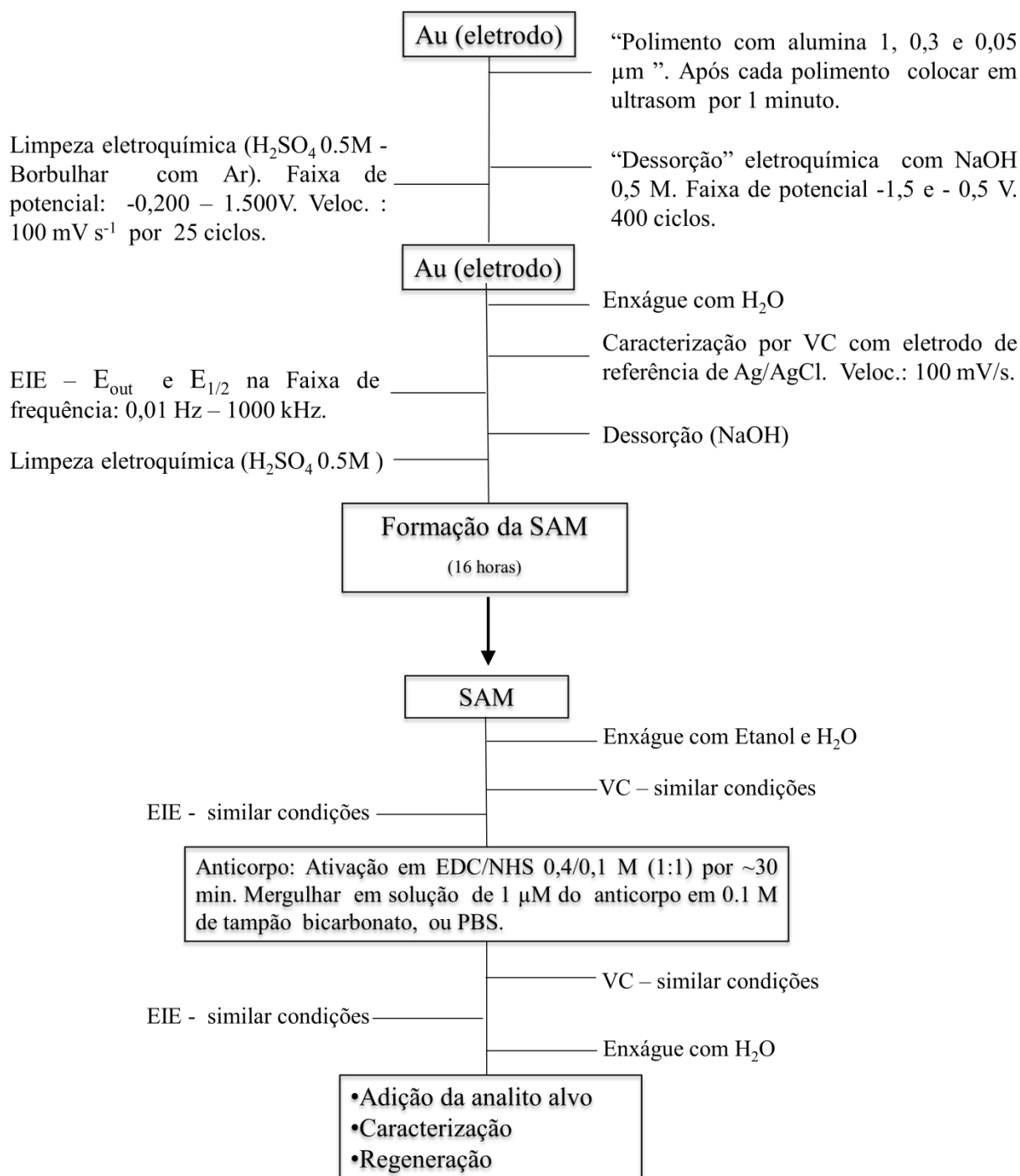


Figura 3.2. Fluxograma ilustrando o processo de limpeza dos eletros e formação das superfícies moleculares nanoestruturadas com probe redox confinadas e receptivas.

4. Objetivos

O objetivo geral neste trabalho é aplicar a técnica de espectroscopia de capacitância eletroquímica no desenvolvimento de biossensores capacitivos, assim como, entender os mecanismos de funcionamento destes biossensores. Desta forma, integrar o processo de caracterização ao desenvolvimento de superfícies moleculares nanoestruturadas eletroativas funcionalizados visando o aperfeiçoamento dos biossensores em estudo. Já os objetivos específicos são:

- Avaliar o desempenho de superfícies moleculares nanoestruturadas com *probe* redox confinadas e receptivas em termos de sensibilidade, especificidade e confiabilidade das análises.
- Aperfeiçoar as metodologias de medidas e tratamento de dados a fim de dinamizar e otimizar a obtenção dos resultados.

5 Plataformas *label free* de biossensoriamento capacitivo redox

Esta seção apresenta os resultados das análises por ECE de superfícies moleculares nanoestruturadas contendo “probe” redox integrada a superfície, ou em mais detalhes, superfícies moleculares nanoestruturadas mistas contendo centro redox conjugados com moléculas âncoras (alcanotióis) utilizados para imobilizar o anticorpo da proteína CRP (anti-CRP) para detecção específica deste analito. A ênfase é analisar como o sinal capacitivo redox se comporta, nesta esta arquitetura de superfície, frente às sucessivas incubações em concentrações crescente da proteína alvo, bem como avaliar a estabilidade e especificidade de superfícies moleculares nanoestruturadas com *probe* redox confinada e receptivas. Vale ainda ressaltar que os resultados descritos a seguir encontram-se publicados na *Biosensors and Bioelectronics* (F.C.B. Fernandes et al. / *Biosensors and Bioelectronics* 50 (2013) 437–440)

5.1 Introdução

A investigação eletroquímica de interfaces artificiais de reconhecimento biológico, potencialmente, fornecem formas poderosas de ensaios em diagnósticos as quais são altamente efetivas, baratas e portáteis^{55; 67; 68; 69; 70; 71}. Dentre as técnicas eletroquímicas utilizadas, os métodos impedimétricos baseados em medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) realizadas sobre superfícies de eletrodos apropriadamente modificados constituem uma potente forma de monitoramento de interações específicas (por exemplo, anticorpo-antígeno) em uma configuração *label free* e altamente sensível^{72; 73; 74; 75; 76; 77}. Na forma mais simples e comum em que EIE é usada para monitoramento de interações biológicas, a formação de complexos por bioafinidade sobre a superfície do eletrodo leva, obviamente, a um aumento na espessura da superfície molecular que por consequência causa retardamento na cinética de transferência interfacial de elétrons entre o eletrodo e a *probe* redox em solução. A variação nesta resistência de transferência de carga (R_{ct}) é então usada como sinal transdutor da interação biológica ocorridas na superfície receptiva permitindo quantificar o analito em concentrações da ordem de nanomolar a picomolar^{72;75; 78; 79} com análises realizadas inclusive em amostras clínicas reais^{73; 74; 77}.

Resumidamente, o uso da R_{ct} como sinal transdutor requer a adição de uma *probe* redox em solução na cela de medida eletroquímica, e subsequentemente é necessário ajustar os dados a um “circuito equivalente”. Em contra partida, análises de capacitância realizadas em superfícies moleculares nanoestruturadas moleculares com *probe* redox confinada (ou superfícies moleculares nanoestruturadas redox), por meio da técnica de espectroscopia de capacitância eletroquímica, ECE, introduzidas por Bueno e co-autores^{14; 56} permite monitorar de forma sensível e confiável modificações na superfície do eletrodo sem que nenhum tipo de amplificador de sinal seja adicionado na solução de eletrólito de suporte contida na cela eletroquímica, ou ainda, não requer o uso de um “circuito equivalente” para ajuste dos dados (ver o completo detalhamento da técnica de ECE na seção 2). Assim, este trabalho mostra a aplicação de superfícies moleculares nanoestruturadas com uma *probe* redox confinada e receptiva na detecção de proteínas biomarcadoras. A capacitância redox, C_r , da *probe* confinada pode ser

usada como uma função sensível a modificações na superfície de tal sistema e, conseqüentemente, sensível à concentração do analito alvo¹⁷.

5.2 Parte experimental

5.2.1 Métodos e procedimentos experimentais

Para obtenção dos superfícies moleculares nanoestruturadas moleculares com *probe* redox confinada, os eletrodos pré-tratados (conforme descrito na seção 3.1) foram imersos em uma solução de 0.2 mM de pentadecanotiol e 2.0 mM de 11-Ferrocenil-undecanotiol (11-FcC) por 16 horas. Em seguida os eletrodos foram lavados com etanol absoluto extra puro e água deionizada e secos sob fluxo de nitrogênio gasoso antes da caracterização por voltametria cíclica (VC) e ECE. O anticorpo anti-CRP foi imobilizado imergindo diretamente o eletrodo revestido com a superfície molecular nanoestruturada com *probe* redox confinada composto de tiol/ferroceno, em 200 μl de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de anti-CRP em tampão fosfato salino (PBS – sigla em inglês para *phosphate buffered saline*), pH 7,4 durante 1 hora. Em seguida foi realizado o bloqueio com BSA (sigla em inglês para *bovine serum albumin*) por imersão do eletrodo funcionalizado em solução de BSA 0,1% em água deionizada por 1 h. Após a repetição das etapas de lavagem, secagem e caracterização eletroquímica por VC e ECE, a CRP foi adicionada em aliquotas de 20 μl à interface em uma variação de concentração entre 0,5 nM a 10,0 nM preparadas em PBS à pH 7,4. A densidade de corrente (ou a sua variação como uma função da interação da CRP sobre a superfície) na medidas por CV (Figura 5.2), é diretamente obtida a partir das medidas realizadas no potencial de meia onda ($E_{1/2}$). A capacitância redox, C_r , é diretamente resolvida no mesmo potencial em uma frequência específica (neste caso em 8 Hz, por exemplo valor próximo da escala de tempo da transferência faradaica de eletrons).

5.2.2 Controle negativo de superfícies moleculares nanoestruturadas contendo probe redox confinada receptivas e não receptivas

Primeiramente foi realizado um controle negativo para o biossensor (Anti-CRP/BSA/ SAM mista) usando a BSA como proteína não específica em concentrações equivalentes a de CRP. Em seguida, o filme composto apenas de 11-Ferrocenil-undecanotiol foi incubado nas diferentes concentrações de CRP estudadas nesta etapa do trabalho a fim de testar a interatividade da CRP com o filme de 11-Ferrocenil-undecanotiol.

5.3 Resultados e discussões

Nessa etapa, o objetivo principal do trabalho foi o de controlar e reproduzir os superfícies moleculares nanoestruturadas contendo uma “probe” redox confinada. A construção deste filme teve como finalidade a obtenção de uma plataforma eletroquímica para detecção de interações específicas do tipo anticorpo/antígeno. O referido processo consiste em monitorar os sinais cinéticos e termodinâmicos associados a grupos com atividade redox que se encontram confinados em superfície, os quais, apresentam uma conhecida função de sensibilidade a solvatação e acesso dos contra ions/eletrólitos suporte^{77; 80; 81}. Nossa hipótese foi que este sinal que é bem caracterizado por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), pode resultar na derivação de métodos capacitivos que são sensíveis a interações biológicas entre analitos alvos e as superfícies receptivas. Estas interações sobre a superfície geram variação no sinal de capacitância que estão associadas a alterações na constante dielétricas na região da superfície e ao acesso ao eletrólito de suporte. Como uma prova inicial do conceito, foi desenvolvida e utilizada uma interface capaz de detectar seletivamente a proteína CRP. AO superfície composta de uma monocamada mista de 11-Ferrocenil-undecanotiol e pentadecanotiol (9;1) associado com o anti-CRP (Figura 5.1) foram especialmente usados para reportar a ligação do analito alvo CRP sobre a superfície receptora. Conforme apresentado na Figura 5.2, uma simples resposta de medidas de VC do sistema é uma adequada função da concentração da CRP (porém não pode ser

mapeada em função da frequência e nem mesmo determinar a contribuição da atividade redox, da resistência ou do acúmulo de carga), mas nesta configuração estudada a resposta da corrente em função da concentração do analito não pode ser considerada analiticamente útil^{14;82}. Em maiores detalhes, a imobilização do anti-CRP sobre o filme redox, quando caracterizado por VC, está associado a uma mudança anódica e redução da resposta de corrente de pico. Após a imobilização do anticorpo, ambos potencial de pico e correntes são estáveis para medidas em branco (sem a presença de CRP). No entanto, a ligação da CRP resulta em uma variação progressiva na resposta voltamétrica do sistema, embora estas mudanças não sejam analiticamente úteis, conforme mostrado na Figura 5.2b. Entretanto, a perturbação causada pela ligação do analito a superfície receptiva contendo *probe* redox confinada é, de fato, melhor mapeada pela capacitância redox as superfície onde o sinal é capaz de monitorar os eventos de interação do analito de forma bem mais sensível do que por impedância, EIE, ou VC (Figuras 5.3 e 5.2, respectivamente).

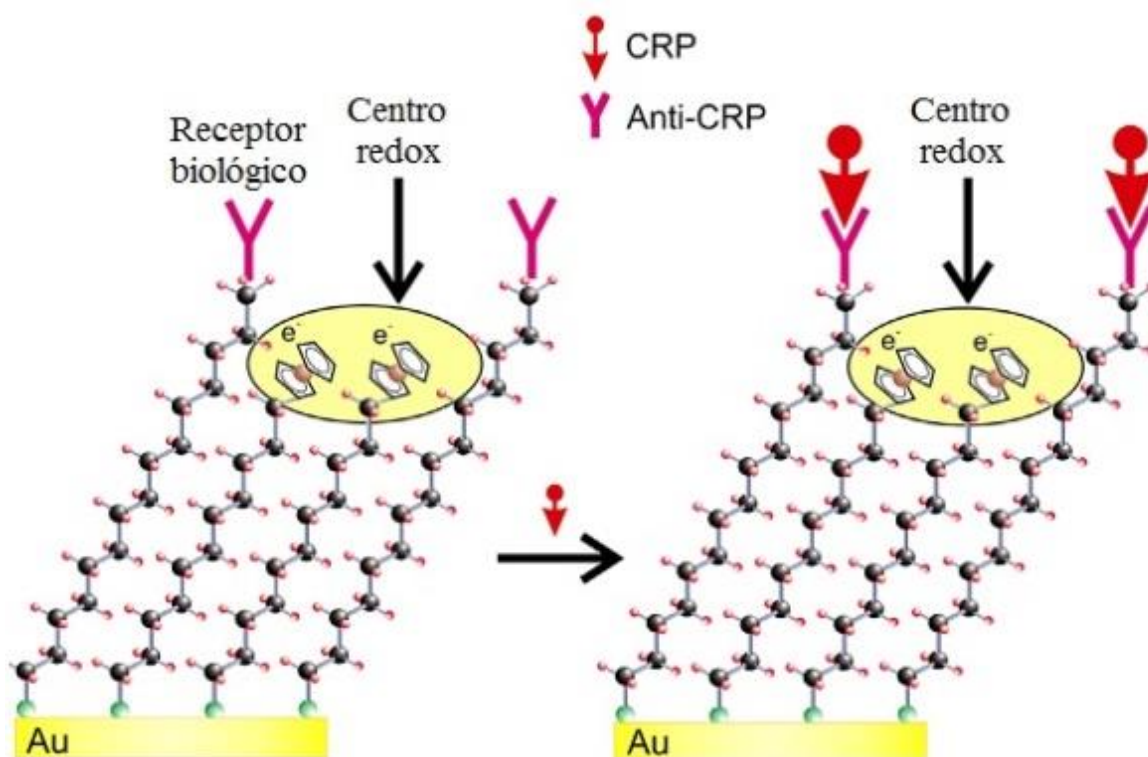


Figura 5.1. Esquema representativo de uma superfície molecular nanoestruturada com *probe* redox confinada e receptiva composta de uma monocamada mista de pentadecanotiol (âncora para imobilização do anti-CRP) e ferroceno (“*probe*” redox confinada)(figura extraída e adaptada de Fernandes et al¹⁷).

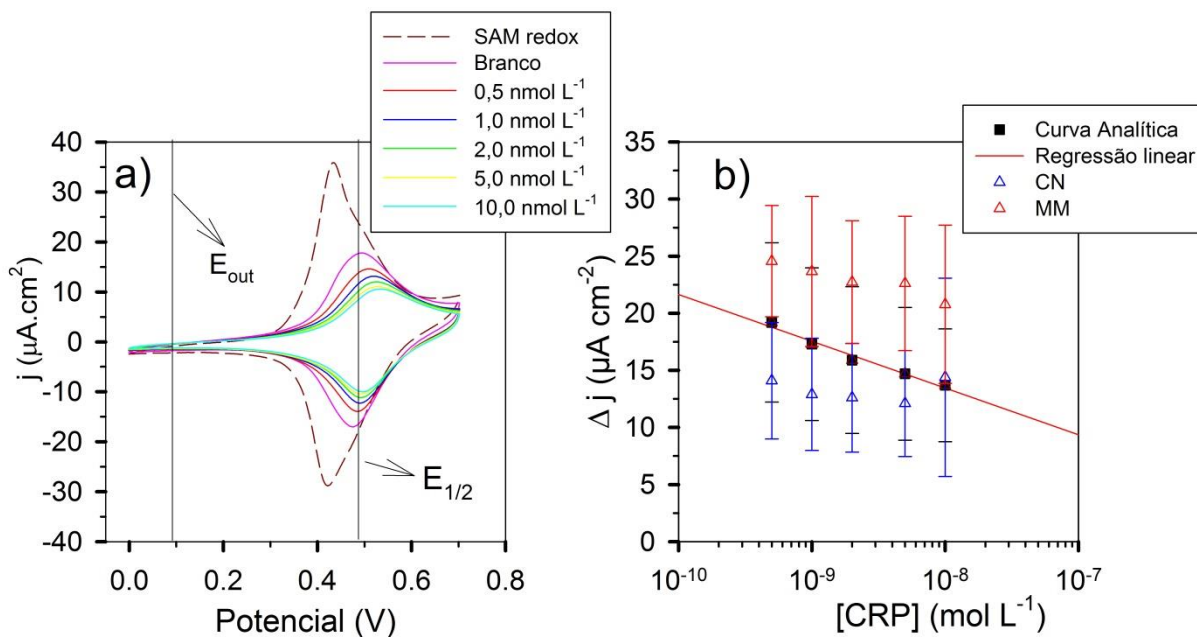


Figura 5.2. Voltamograma cíclico típico da atividade redox existente na monocamada mista de ferroceno/tiol. a) Voltametria cíclica obtida para monocamada mista, superfície molecular nanoestruturada receptiva e variação da concentração de CRP em uma taxa de varredura de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ medido com eletrodo de referência de Ag/AgCl. SAM refere-se à monocamada mista sem o antiCRP imobilizado. Na primeira etapa, o sinal decresce devido à imobilização do anticorpo e, este processo continua em função da concentração de CRP, devido a ligação entre a proteína e ao anticorpo. Assim, o sinal de corrente pode ser utilizado como sinal transdutor. b) Comparação da resposta em densidade de corrente para o analito CRP onde é claro a insensibilidade relativa e a natureza não específica da perturbação. O conjunto de medidas do controle negativo (CN) e do controle da monocamada mista (MM) respondem de forma comparável para a densidade de corrente da curva analítica para CRP. As barras de erro indicam o desvio padrão de uma triplicada (figura extraída e adaptada de Fernandes et al¹⁷).

Os resultados mostram claramente que a metodologia analítica aqui descrita é distinta das metodologias tradicionalmente propostas, em que o componente imaginário da impedância (Z'') ou o R_{ct} são usados como sinal transdutor (o último mediante a ajuste matemático dos dados)⁷⁴. Na Figura 5.3a, a forma obtida para o gráfico de Nyquist deixa claro que não é possível obter o R_{ct} deste sistema uma vez que o sinal medido não é baseado na resistência de transferência de carga, mas sim no carregamento capacitivo faradaico¹⁷. Desta forma ao converter o mesmo conjunto de dados para a capacitância complexa e representar estes dados em um gráfico de Nyquist análogo (Figura 5.3b) fica evidente que a interação do analito na interface pode ser detectada sensivelmente. Conforme mostrado na Figura 5.4, ambos componentes, real e imaginário da capacitância (C' e C'' , respectivamente) são altamente responsivos para as medidas realizadas no potencial de equilíbrio da superfície, ou seja, $E_{1/2}$ do grupo ferroceno. Assim, ao se obter em paralelo as medidas no potencial não-faradaico do sistema (E_{out}), e então subtrair dos valores

de $E_{1/2}$, é possível isolar a capacitância redox do sistema, C_r ¹⁴ (Secção 2). Ao fazer estas análises fica evidente que as medidas realizadas no potencial não-faradaico do sistema, ou seja, fora do potencial de máxima transferência de elétrons da interface ferroceno/Au (E_{out}), apresentam baixíssima resposta no sinal capacitivo bem como baixa linearidade^{17; 19}. Outro importante ponto a ser notado é com relação à diferença de magnitude para os valores de capacitância em ambos componentes, real e imaginário, onde as valores de C' medidos para cada concentração de CRP, no $E_{1/2}$ são de aproximadamente 80 a 220 vezes maiores que os valores encontrados em E_{out} na frequência de 8 Hz (frequência em que C_r foi determinada neste sistema). Isso pode ser explicado pelo fato que a contribuição quântica da capacitância é dominante em sistemas em que o grupo redox esta imobilizado sobre superfícies metálicas (ver secção 2).

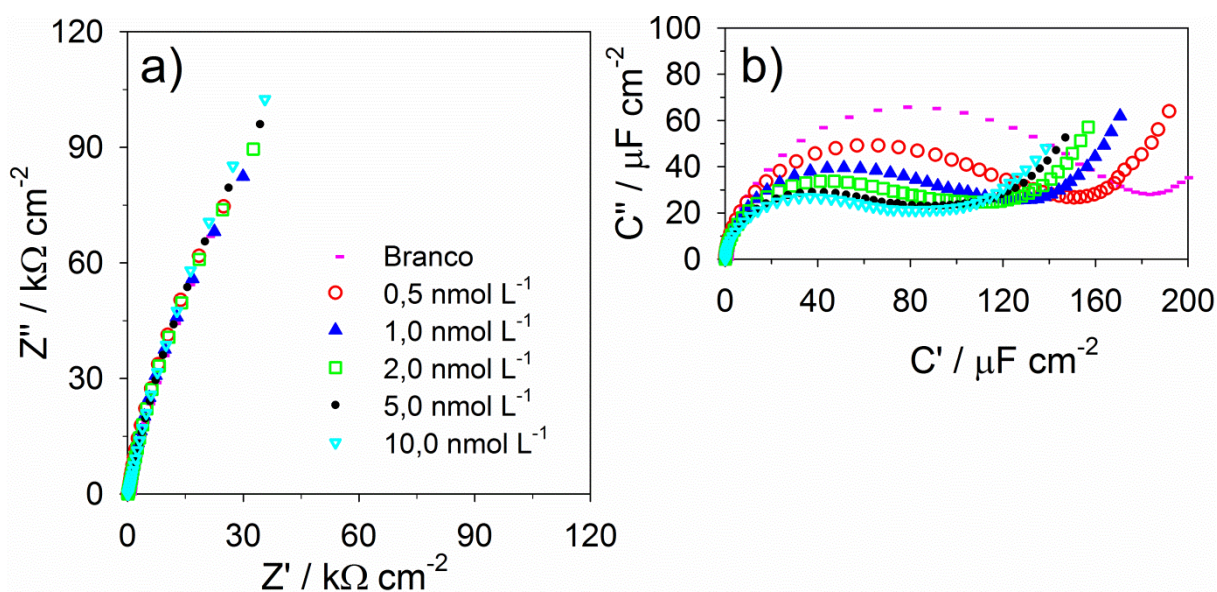


Figura 5.3. Representação do comportamento do sistema impedimétrico/capacitivo redox para detecção de CRP, onde se observa que pela variação no sinal impedimétrico (a) não é possível ajustar os valores de impedância ao circuito de Randle, sendo assim o R_{ct} do sistema não pode ser calculado. b) Valores de capacitância derivado da impedância onde é notável variação para o sinal capacitivo da interface de anti-CRP com diferentes concentrações de CRP. Todos os valores complexos de impedância e capacitância mostradas aqui são valores médios obtidos a partir de medições ao longo de três eletrodos diferentes (figura extraída e adaptada de Fernandes et al¹⁷).

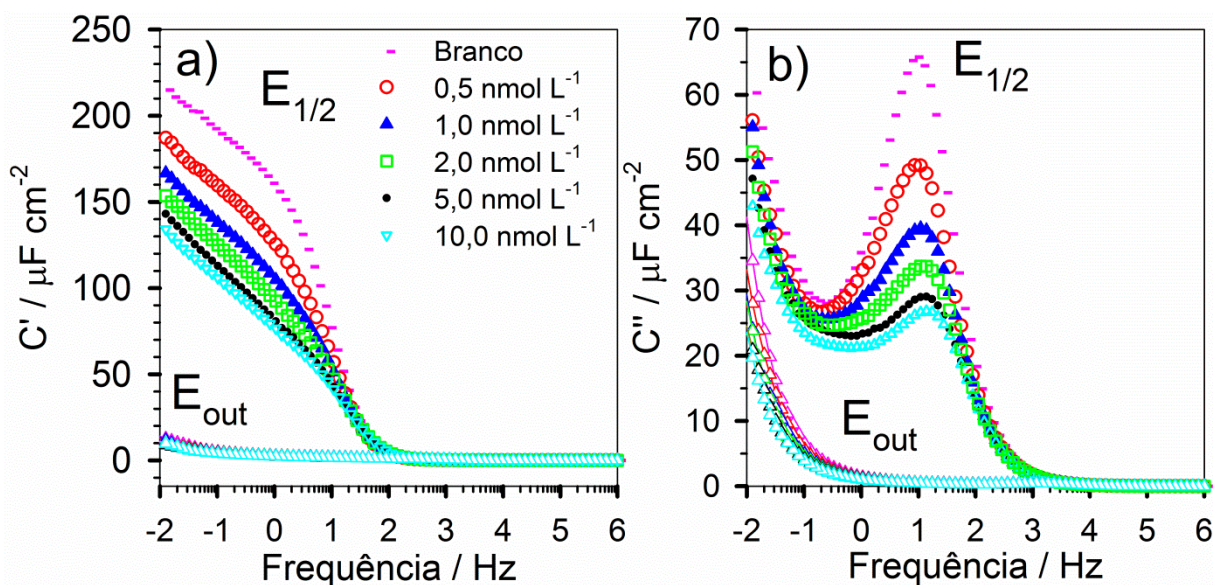


Figura 5.4. (a) Gráfico de Bode para o componente real da capacitância complexa da superfície nanoestruturada molecular com “probe” redox confinada no potencial de máxima transferência de elétrons, $E_{1/2}$ ($\sim 0,5$ V), e em um potencial fora da região de transferência de elétrons, E_{out} (0,1 V). (b) A mesma análise conforme (a), mas mostrando o componente imaginário da resposta da capacitância complexa. Todos os gráficos são a média de análises obtidas a partir de 3 diferentes eletrodos funcionalizados (preparados sobre uma monacamada mista formada por incubação em uma solução de 11-ferrocenil-undecatíol e pentadecanotíol em proporção molar de 9:1. Para ambos os gráficos os valores de capacitância estão plotados em função da frequência que está representada em log usando apenas os expoentes na base 10 (figura extraída e adaptada de Fernandes et al¹⁷).

Uma vez obtida a capacitância redox, C_r , o inverso desta função ($1/C_r$) é uma função analítica altamente sensível, conforme mostrado na Figura 5.5. Esta mesma figura ilustra claramente a especificidade deste biossensor para a CRP, em que a resposta média do controle negativo desta interface para uma proteína não específica é menor que 8% da resposta obtida para a mesma faixa de concentração do analito (CRP). O filme misto não-receptivo de tiol/ferroceno não responde a CRP na mesma faixa de concentração utilizada para construção da curva analítica. A partir destas análises, o limite de detecção (L.D.), limite de quantificação (L.Q.) e a sensibilidade em porcentagem por década de concentração do analito foram estimados, respectivamente, 200 pmol L^{-1} , 600 pmol L^{-1} e 95% de acordo com a padronização estipulada pela IUPAC⁸³, valores estes favoráveis se comparados a outros métodos de análise da CRP previamente publicados^{73; 74}.

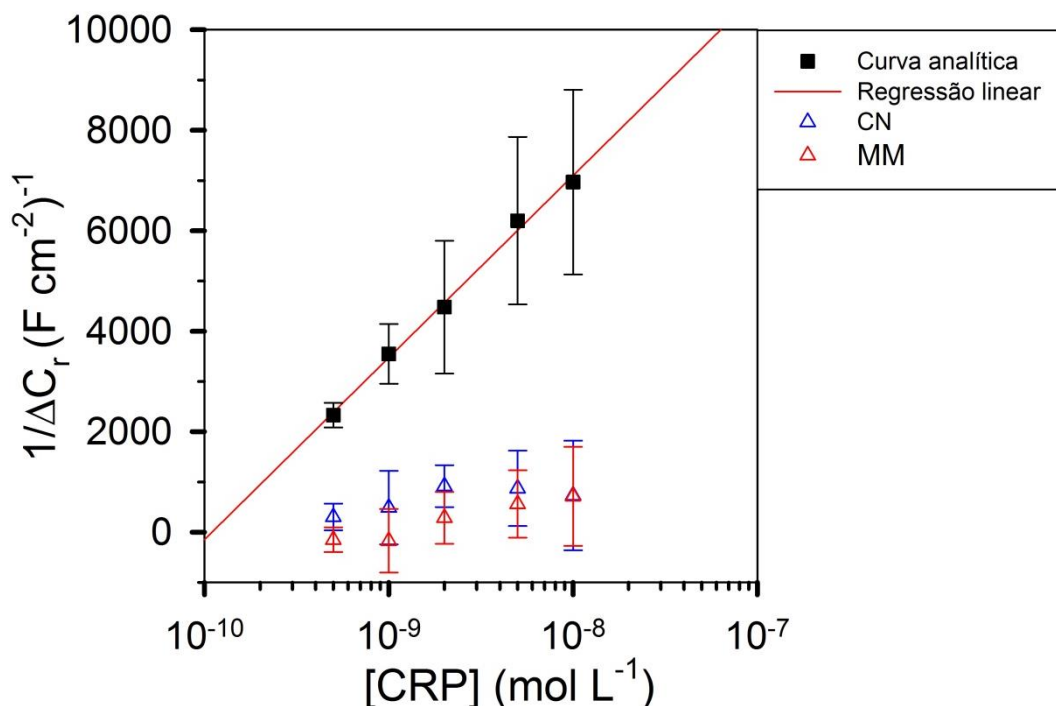


Figura 5.5. Curva analítica obtida pelo inverso de C_r , obtida em 8 Hz para a superfície molecular nanoestruturada contendo *probe* redox confinada e receptiva. Também estão representadas a resposta do controle de especificidade, o controle negativo (CN) onde a resposta do biossensor foi avaliada frente a uma proteína não específica, e o controle da monocamada mista ferroceno/tiol (MM), onde foi avaliada a interação do analito, CRP, contra a monocamada contendo a “probe” redox sem a presença do Anti-CRP. O coeficiente de regressão linear obtido foi de 0.998 e as barras de erro representam o desvio padrão em três replicatas (ensaios em 3 superfícies independentes) (figura extraída e adaptada de Fernandes et al¹⁷).

5.4 Conclusão

Resumidamente, neste capítulo foi demonstrado um novo meio *label free*, para detecção específica de proteínas biomarcadoras, com boa sensibilidade e reprodutibilidade por meio de eletrodos adequadamente modificados. Esta nova forma de detecção é totalmente baseada na resposta capacitiva de um eletrodo modificado com uma “probe” redox confinada e a sensibilidade deste sistema depende do estado dielétrico local e do estado redox local estabelecendo assim, uma potente forma de ensaio para a CRP. Ao contrário dos métodos de impedância desenvolvidos tradicionalmente, nesta abordagem não é adicionado qualquer *probe* redox na solução de eletrólito suporte da cela eletroquímica e os resultados não precisam ser necessariamente ajustados a um circuito equivalente ou matematicamente corrigidos. Experimentalmente a metodologia é simples, opera em frequência otimizada e, como será demonstrado nos capítulos a seguir, pode ser aplicada a diversos outras combinações de anticorpo/antígenos.

6. Comparação entre biossensores *label free* impedimétricos e capacitivos

Os estudos subsequentes aos resultados descritos no capítulo 5 deste trabalho, tiveram como objetivo central consolidar a aplicação de biossensores capacitivos redox na detecção de biomarcadores. Assim, usando a detecção de CRP como modelo, a resposta analítica de superfícies moleculares nanoestruturadas redox e receptivas, construídos a partir de dois diferentes tióis, foi comparada a resposta analítica de um biossensor impedimétrico tradicional (referente a resultados obtidos em um trabalho de mestrado o qual foi realizado paralelamente a este trabalho de doutorado) em que a arquitetura de todos os superfícies moleculares nanoestruturadas receptivos usados foram projetadas semelhantemente. Ainda dentro do mesmo propósito de consolidação, um biossensor capacitivo redox foi desenvolvido para detecção de um segundo biomarcador, a enzima *hPAP*, onde um terceiro tiol foi usado como “âncora” para a espécie receptiva (Anti-PAP) e, também, uma nova proporção tiol/ferroceno foi adotada. Vale ainda ressaltar que os resultados descritos a seguir encontram-se publicados na *Biosensors and Bioelectronics* (F.C.B. Fernandes et al. / *Biosensors and Bioelectronics* 57 (2014) 96–102) e na *Analytical Chemistry* (*Anal. Chem.* 2014, 86, 2559–2564).

6.1 Introdução

A preparação de sensores para aplicações biológicas, em muito, faz uso de eletrodos com superfícies metálicas os quais requerem uma apropriada funcionalização da interface do eletrodo, pois interfaces de metal geralmente são fontes de desnaturação de proteínas⁸⁴. Além do mais, existe certa dificuldade em se promover ligações eletrônicas entre metal e proteínas (ou entidades biológicas)⁸⁴. Assim, uma metodologia bastante empregada na funcionalização de dispositivos metálicos é o uso de monocamadas auto-montadas (SAM, sigla em Inglês para *self assembled monolayers*), desde que SAMs são construídas de forma muito simples baseada na ligação química covalente entre o metal e moléculas com grupamento tiol. Desta forma, possibilitam projetar em escala nanométrica superfícies moleculares nanoestruturadas e receptivas nas mais diversas configurações para aplicação em biosensores eletroquímicos, óticos e piezoelétricos⁸⁵. Por exemplo, na construção de imunossensores, tióis com grupamentos metila, carboxila ou hidroxila são usados para criar superfícies hidrofóbicas, carregadas negativamente ou hidrofílicas, respectivamente⁸⁶. Então estas superfícies são usadas de acordo as melhores características necessárias para imobilização da espécie receptiva, sendo este o ponto chave na determinação da estabilidade e sensibilidade dos imunossensores⁸⁷.

A caracterização de SAMs a base de alcanotióis tem sido realizada extensivamente⁸⁸ usando XPS⁸⁹, infravermelho⁹⁰ e espectroscopia Raman⁹¹ onde tem sido especialmente confirmada a natureza de ligação enxofre entre superfícies metálicas e moléculas tioladas por medidas de STM⁸⁶ e XANES⁹². Em se tratando de caracterização eletroquímica de monocamadas, em especial as de alcanotióis, estudos por EIE usando fatores cinéticos (resistência à transferência de carga, R_{ct}) permitem monitorar a formação das monocamadas bem como avaliar a qualidade de sua compactação⁶³ e, obviamente, caracterizar modificações posteriores como imobilização de espécies receptivas e a ligação do analito nos sítios de reconhecimento⁷³. Complementarmente, a técnica de espectroscopia de capacitância, EC, a qual é derivada de medidas de impedância, permite mapear as características dipolar/eletrostáticas de monocamadas não eletroativas (SAMEC)¹⁴;⁹³. A teoria desta técnica foi exemplificada pela primeira vez por Góes e co-autores

por meio da caracterização de uma gama de alcanotóis¹⁵ onde os valores de capacitância obtidos estavam em concordância e ainda melhores detalhados do que a análises realizada pelo modelo clássico de Helmholtz para capacitor de placas paralelas. Aplicando este novo modelo, foi então possível obter-se uma clara resolução da tendência dos efeitos de distorção em ambas as capacitância e resistência de monocamadas com *probe* redox confinada (redox), e, conseqüente, usar esta ferramenta de caracterização (aqui nominada espectroscopia de capacitância eletroquímica – ECE) para mapear não somente as características intrínsecas da SAM redox, bem como modificações posteriores destas (por exemplo, uso em biossensores que envolve funcionalização com espécies receptivas e monitoramento dos analitos alvos). De fato, esta abordagem foi aplicada em um biossensor para detecção de CRP¹⁷ como sinal transdutor uma resposta puramente capacitiva baseada em um eletrodo modificado com uma *probe* redox confinada (conforme já detalhado no capítulo 5).

A partir de todos os conceitos estabelecidos acima, o principal objetivo desta seção é comparar o desempenho de biossensores capacitivo redox frente a biossensores impedimétricos. A comparação será feita por determinação das principais figuras de mérito das curvas analíticas obtidas em cada sistema, bem como pela constante afinidade (K_a) entre o analito e a respectiva superfície receptiva calculada pela isoterma de Langmuir.

6.2 Parte experimental

6.2.1 Métodos e procedimentos experimentais

6.2.1.1 Detecção impedimétrica e capacitiva redox da CRP.

Sensores eletroquímicos com detecção por EIE ou ECE operam por diferentes conceitos e cada forma de abordagem requer uma arquitetura de superfície do eletrodo adequada ao sinal transdutor adotado, resistivo ou capacitivo, respectivamente. Assim, para comparar o potencial analítico das técnicas de EIE e ECE e, adicionalmente, também comparar a eficiência de superfícies receptivas construídas por imobilização hidrofóbica e covalente da espécie de reconhecimento

(neste caso, o anticorpo). Três arquiteturas químicas de superfície diferentes (AQS) foram utilizadas nesta etapa do trabalho para detecção da proteína CRP (usada como modelo). AQS-1, AQS-2 e AQS-3 foram estrategicamente planejadas a fim de apresentar morfologias similares (em termos de espessura e estequiometria química dos componentes). A AQS-1 foi construída para análises por EIE enquanto a AQS-2 e AQS-3 foram construídas para análises por ECE (veja a ilustração apresentada na Figura 6.1) em que a AQS-2 e AQS-3 se diferiram com respeito a forma de imobilização do anti-CRP.

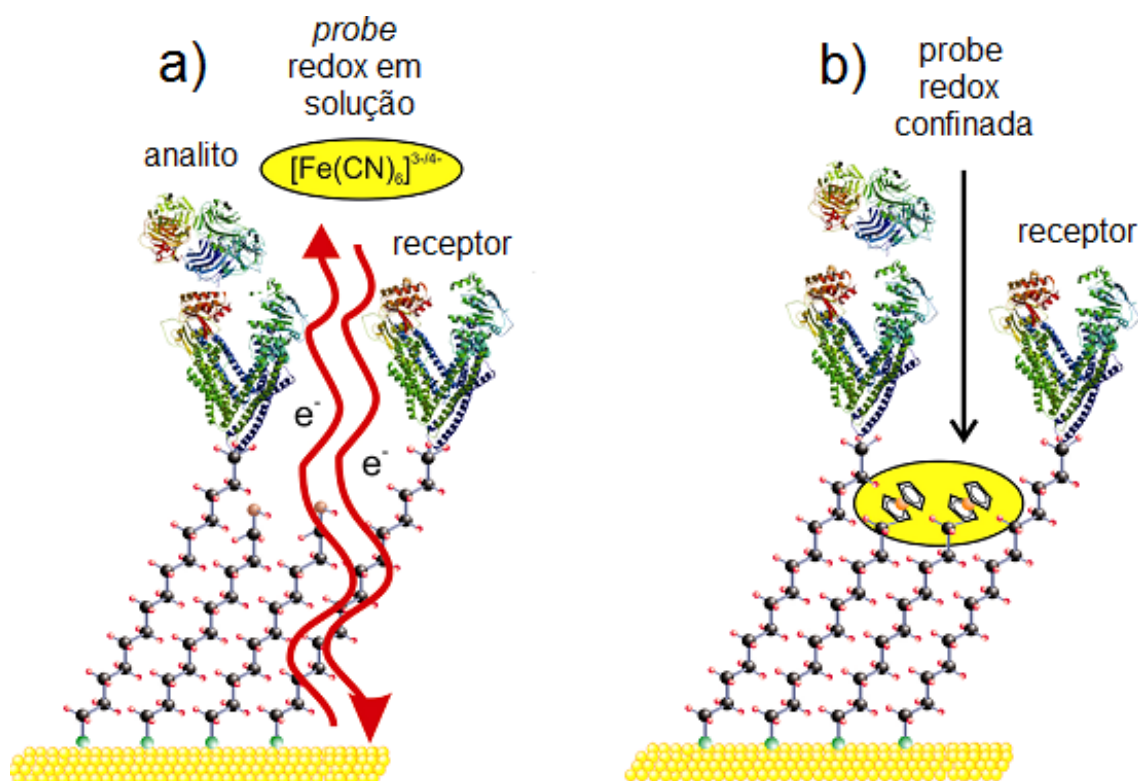


Figura 6.1. Representação esquemática de duas diferentes abordagens usadas no monitoramento da interação biomolecular analito/receptor com a finalidade de estudo de afinidade e sensoriamento. a) Esquema ilustrativo da SAM mista construída sobre a superfície de ouro, onde a SAM é composta por 1-pentadecanotiol, usado como suporte para o receptor (anticorpo), e 11-mercapto-1-undecanol usado como espaçador não redox(AQS-1). Nesta configuração estrutural, medidas impedimétricas podem ser com *probe* redox em solução, como por exemplo $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$. A monocamada não redox em (a) intermedia a transferência de elétrons (conforme mostrado com as setas em vermelho) entre a probe redox em solução e a superfície de Au e este fluxo eletrônico está relacionado a cinética de transferência de elétrons através do R_{ct} . b) mostra esquematicamente a monocamada mista construída sobre a superfície de Au a ser usada em medidas redox, onde a monocamada mista é composta de 1-pentadecanotiol e 11-ferrocenilundecanotiol(AQS-2), em que o último é usado como espaçador com centros capacitivos redox proporcionando o surgimento da capacitância redox, C_r . (Figura extraída e adaptada do artigo de Fernandes et al¹⁸).

Para todos os tipos de superfícies estudadas, um eletrodo de Au devidamente polido (mecanicamente e electroquimicamente conforme descrito na *subsecção* 3.1) foi imerso numa solução de etanol absoluto extra puro contendo as moléculas apropriadas para cada tipo de biossensor desejado. Para a construção da SAM

mista na AQS-1 o eletrodo de Au foi imerso numa solução de *pentadecanotiol* 0,2 mmol L⁻¹ (para ligação hidrofóbica de anti-CRP) e 2,0 mmol L⁻¹ de 11-mercaptopundecanol (usado como espaçador). Para a AQS-2, o eletrodo de Au foi imerso numa solução de pentadecanotiol 0,2 mM (para ligação hidrofóbica de anti-CRP) e 2,0 mM de 11-ferrocenil-undecanotiol, usado neste caso como *probe* redox confinada e também espaçador no filme. (ver Figura 6.1). Já na AQS-3, o eletrodo de Au foi imerso numa solução de 0,2 mmol L⁻¹ de ácido 16-mercaptophexadecanoico (16-MHDA) (para ligação covalente do anti-CRP) e 2,0 mmol L⁻¹ de 11-ferrocenil-undecanotiol. Em todos os procedimentos o tempo de imersão foi de 16 horas. Ao final da etapa de formação da SAM o eletrodo foi lavado com etanol e água desionizada e seco com nitrogênio gasoso.

6.2.2 Imobilização do receptor e construção da curva padrão.

Na AQS-1 e AQS-2, a superfície receptora foi preparada por imersão direta do eletrodo revestido pela SAM mista em 200 µl de 1 µM de anti-CRP em tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4 durante 1 hora antes da análise por EIE e VC. Para a AQS-3, que é baseado na ligação covalente do anticorpo, primeiramente foi realizado a ativação adequada da SAM por meio do método biocunjugado com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/N-hidroxissuccinimida (NHS). Para tal, o eletrodo foi imerso, durante 30 minutos, em uma solução de 0,4 mol L⁻¹ de EDC e de NHS 0,1 mol L⁻¹ para promover a ativação dos grupos terminais carboxila presentes no tiol. Então foram realizadas as etapas de imobilização do anti-CRP e bloqueio dos grupos carboxílicos remanescentes com BSA (sigla em inglês para *bovine serum albumin*) com posterior caracterização eletroquímica. Finalmente, CRP foi adicionada em aliquotas de 20 µl à interface em uma variação de concentração entre 0,5 nmol L⁻¹ a 10,0 nmol L⁻¹ preparadas em PBS (pH 7,4). O eletrodo foi então lavado com mais PBS e as medidas de voltametria cíclica e impedância, realizadas. Após a interação e leitura de cada concentração de CRP, a AQS-3 foi regenerada com a adição de uma solução de 6 mM de NaOH em etanol 0,6 % por 5 minutos.

Todas as etapas de construção dos biossensores foram caracterizadas eletroquimicamente. A caracterização da AQS-1 foi realizada por medidas de VC e

EIE em 1 mmol L^{-1} de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (*probe* em solução) diluídos na solução de eletrólito suporte de KNO_3 1 mol L^{-1} . A caracterização por VC foi realizada a uma taxa de varredura de 100 mV s^{-1} na faixa de potencial de 0,0 a 0,7 V em relação ao eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl 3M), enquanto que as medidas de EIE foram realizadas em uma faixa de frequência de 10 mHz a 1MHz no potencial de circuito aberto do sistema (0,22 V) obtidos a partir das medidas VC. Para AQS-2 e AQS-3, foi usado como eletrólito suporte uma solução de 20 mmol L^{-1} TBAClO₄ (perclorato de tetrabutilamônio) dissolvido em acetonitrila (ACNT) e H₂O (20:80) e não foi usado nenhum tipo de *probe* redox na solução. A caracterização por VC foi realizada a uma taxa de varredura também de 100 mV s^{-1} , na faixa de potencial de 0,0 a 0,7 V em relação ao eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl 3M) e as medidas de EIE foram realizadas em uma faixa de frequência de 10 mHz a 1MHz no potencial de meia onda, $E_{1/2}$ (região redox) obtido em $\sim 0,45 \text{ V}$ a partir das medidas VC (ver Figura 6.2). Adicionalmente, também foram realizadas medidas EIE no potencial de 0,1 V (região não redox) com a finalidade de subtrair a contribuição eletrostática no valor de capacitância para assim isolar o valor de C_r . Vale ressaltar que todas as medidas foram realizadas em triplicata.

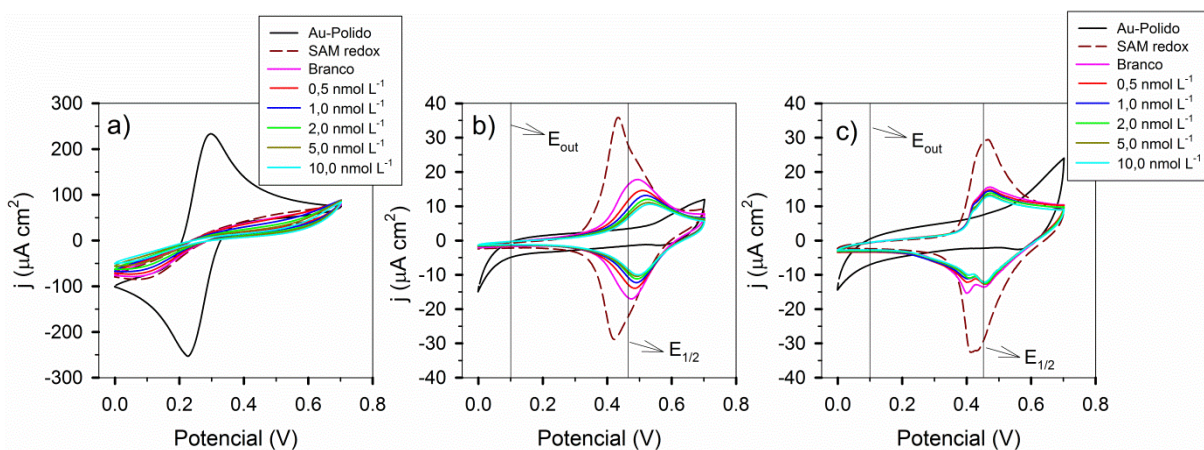


Figura 6.2. Voltamogramas cíclicos tipicamente obtidos na caracterização para superfícies moleculares nanoestruturadas não redox por VC com *probe* redox em solução, e superfícies moleculares nanoestruturadas com atividade redox em que a *probe* redox está confinada na monocamada mista de ferroceno/tiol. A figura mostra o comportamento de cada voltamograma obtido para Au-polido, SAM mista, superfície receptiva (Branco) e a variação da concentração do analito em uma taxa de varredura de 100 mV s^{-1} medido com eletrodo de referência de Ag/AgCl. Sendo: **a)** AQS-1; **b)** AQS-2 e **c)** AQS-3.

6.3 Resultados e discussões

6.3.1 Conceitos teóricos

As características das medidas EIE sobre as interfaces AQS-1 são bem descritas em todos os pontos pelo circuito equivalente da Figura 6.3 (capaz de obter a R_{ct} precisamente pelo ajuste matemático das análises). Vale notar que as características de relaxação dipolar da monocamada ajustada dentro da R_t e C_t , são considerados no circuito equivalente de Randle modificado (Figura 6.3b). O erro no cálculo do R_{ct} é consideravelmente maior se uma adequada consideração desta contribuição dielétrica da monocamada não for feita. Estes pontos a respeito da caracterização de SAMs foram previamente bem descritos na literatura^{15; 56; 73}.

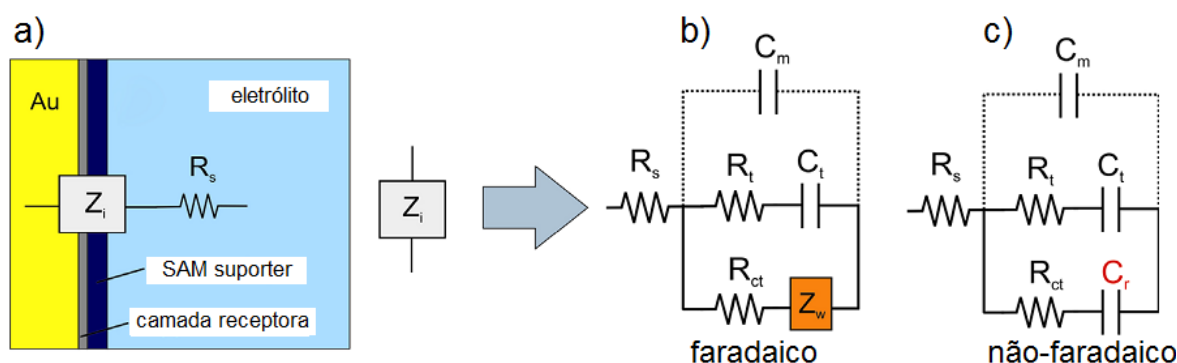


Figura 6.3. a) Representação esquemática da impedância interfacial das superfícies receptoras de CRP usadas neste trabalho. b) Circuito equivalente capaz de ajustar os dados impedimétricos do biossensor (AQS-1). O elemento de Warburg (Z_w) representa as características de difusão de massa da *probe* redox e a R_{ct} . A resistência do eletrólito (R_s) é ajustada em série com o total da impedância interfacial acima [veja (a)] e geralmente isto não é importante na análise predominante uma vez que R_s não varia. c) É o circuito equivalente apropriado para ajustar os dados do biossensor capacitivo (AQS-2 e AQS-3). Note que a capacitância interfacial de uma monocamada dielétrica de eletrodo modificado é definido por duas capacitâncias em série, a capacitância da monocamada (C_m) e da dupla camada elétrica (C_{dl}) onde $C_{dl} \gg C_m$, o que significa que C_m é dominante em análises e, portanto, é a única capacitância representada no circuito equivalente mostrado aqui. Além disso, $C_m \ll C_t$ em uma forma que R_t and C_t , resistência e capacitância do filme, controlam a resposta dielétrica da monocamada (não-redox)^{94; 95; 96; 97} (figura extraída e adaptada do artigo de Fernandes et al¹⁸).

A caracterização impedimétrica (resistiva) sobre a interface AQS-1, quando representada no gráfico de Nyquist, permite visualizar a forma sensível e clara como Z' e Z'' respondem aos eventos de ligação da CRP sobre esta superfície (Figura 6.4a). Estes dados possibilitam o cálculo preciso do R_{ct} para cada concentração medida e o uso desta função como sinal transdutor geralmente resulta em uma curva analítica altamente sensível e com bom coeficiente de regressão linear ($r^2 =$

0.973)(Figura 6.5a, curva padrão). No entanto, o mesmo conjunto de dados coletado para AQS-1, quando analisado por capacitância (derivada dos valores de impedância), não pode ser usado como ferramenta útil no monitoramento da interação da CRP com a superfície receptiva (ampliação no canto superior direito da Figura 6.4b), pois apresenta baixa linearidade e/ou baixa sensibilidade em qualquer uma das frequências estudadas.

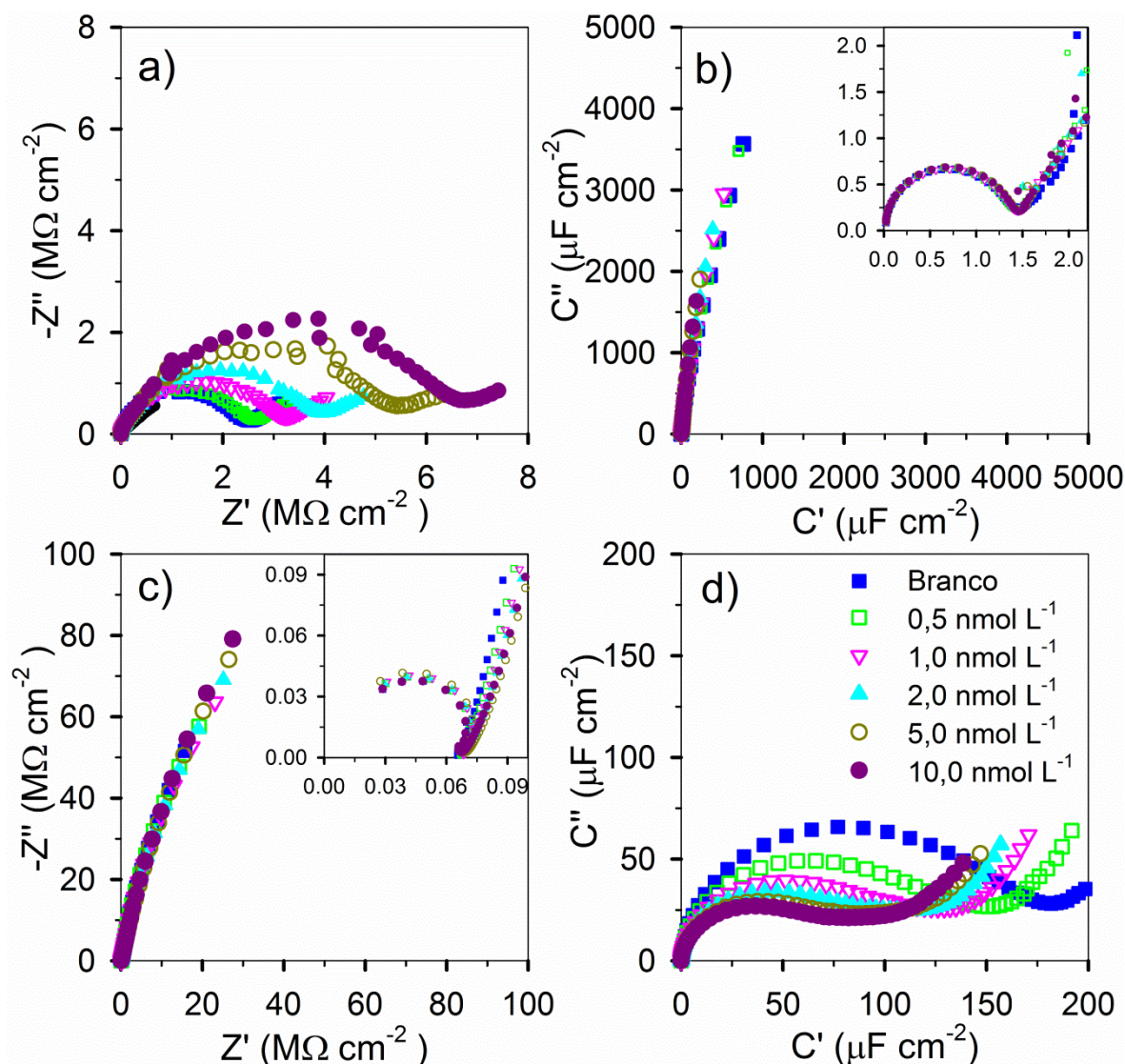


Figura 6.4. Gráficos de Nyquist impedimétrico (a) e capacitivo (b) tipicamente obtidos para AQS-1. Note que (b) foi construído convertendo os dados de impedância em capacitância conforme explicado na seção experimental. A análise impedimétrica de (a) é prontamente usada para obter o ΔR_{ct} como sinal transdutor da interação do analito, com o sítio receptivo, nas concentrações indicadas em (d). Note que o R_{ct} [que é obtido pelo semicírculo dos gráficos em (a)], varia significativamente em função da concentração do analito, enquanto os valores de capacitivos de Nyquist pouco variam [gráfico inserido em (b)]. No entanto, para AQS-2 e AQS-3, os gráficos de Nyquist impedimétricos (c) e capacitivo (d) mostram não ser possível obter o R_{ct} a partir dos valores de impedância (c) enquanto a capacitância de Nyquist responde de forma claramente proporcional a diferentes concentrações do analito. Todos os valores complexos de impedância e capacitância mostradas aqui são valores médios obtidos a partir de medições em três eletrodos diferentes (figura extraída e adaptada do artigo de Fernandes et al¹⁸).

Por outro lado, conforme evidente na Figura 6.4c e 6.4d para superfícies moleculares nanoestruturadas com *probe* redox confinada (AQS-2 e AQS-3) a resposta da interação Anti-CRP/CRP claramente afeta a resposta capacitiva no diagrama de Nyquist, mas o valor de R_{ct} não pode ser determinado com base nos valores impedimétricos. Em termos dos elementos do circuito equivalente a diferença entre a abordagem impedimétrica e capacitiva consiste na substituição do elemento de Warburg pelo C_r (Figuras 6.3b e 6.3c). Em outras palavras SAMs contendo *probe* redox confinada são sistemas eletroquímicos sem difusão^{14; 98}.

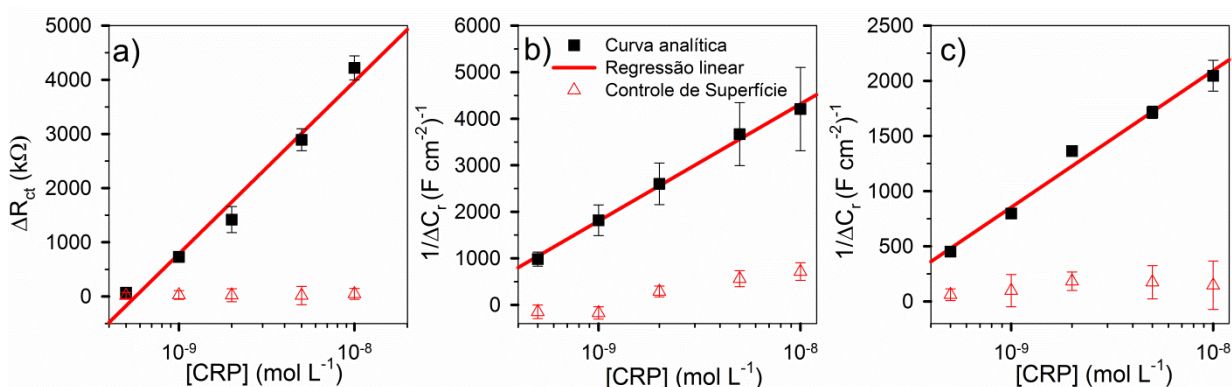


Figura 6.5. (a) Curva analítica construída com base no valor de resposta do ΔR_{ct} da superfície receptiva AQS-1 plotado contra o logaritmo da concentração de CRP. b) Curva analítica construída com base no valor de resposta do $1/C_r$, como função do log da concentração da CRP para a superfície receptiva AQS-2. c) A mesma análise em (b), mas baseada sobre uma superfície receptiva onde o anti-CRP foi imobilizado covalentemente (AQS-3) em contraste a imobilização hidrofóbica usada em AQS-2. O ajuste da regressão linear para as três superfícies receptoras usadas são superiores a 0.97. Os controles de superfície mostrados em cada gráfico evidenciam que todas as superfícies respondem especificamente para CRP. As barras de erro indicam a variação através de medidas em triplicatas para cada superfície receptiva (figura extraída e adaptada do artigo de Fernandes et al¹⁸).

Finalmente o desempenho analítico das abordagens sensorial por EIE e ECE para detecção de CRP foram comparadas com base no limite de detecção (L.D.), limite de quantificação (L.Q.), repetibilidade e sensibilidade encontrados para cada uma das AQS, valores estes mostrados na Tabela 1 os quais foram obtidos por meio da construção das curvas analíticas mostradas na Figura 6.5. Os valores encontrados foram de 265 pmol L⁻¹ e 200 pmol L⁻¹ para o L.D.; 760 pmol L⁻¹ e 600 pmol L⁻¹ para o L.Q. e 0,9767 e 0,9878 para o r^2 para AQS-1 (impedimétrico) e AQS-2 (capacitivo redox), respectivamente. Com base nestes valores é possível afirmar que analiticamente a técnica de ECE possuiu desempenho similar à EIE. Adicionalmente, a mesma comparação de eficiência analítica entre AQS-1, AQS-2, que foram construídas via imobilização hidrofóbica do Anti-CRP, frente a AQS-3 a

qual foi construídas por meio da imobilização covalente do mesmo anticorpo, mostra claramente uma maior robustez desta abordagem. AQS-3 apresentou melhor repetibilidade, estimada com base no desvio padrão relativo (DPR) entre as medidas de cada concentração estudada (barra de erro na curva analítica), sendo o DPR inferior a 7% de variação em todos os pontos da curva analítica, ao mesmo tempo em que o DPR alcançou 28% para a medida de algumas concentrações nas interfaces AQS-1 e AQS-2. Esta melhor repetibilidade obtida para AQS-3 está alinhada com observações da literatura que descrevem uma melhor robustez para sensores construídos por meio de ligação covalente da espécie receptiva⁹⁹. Ademais, esta melhor robustez da interface AQS-3 refletiu diretamente em menores valores de L.Q. (315 pmol L⁻¹ contra 760 e 600 pmol L⁻¹ para AQS-1 e AQS-2, respectivamente) o que traz maior potencial analítico para esta abordagem.

Tabela 6.1: Alguns parâmetros analíticos para determinação impedimétrica e capacitiva da CRP¹⁸.

	AQS-1	AQS-2	AQS-3
Faixa Linear (nmol L ⁻¹)	0,5 – 10	0,5 – 10	0,5 - 10
Coeficiente de Correlação (r ²)	0,973	0,992	0,987
Sensibilidade <i>L. nmol⁻¹/ΔC_r (μF. cm⁻²)</i>	5540	2515	1248
L.D.(pmol L ⁻¹)	265	200	240
L.Q.(pmol L ⁻¹)	760	600	315
K _a (L pmol ⁻¹)	(7,6 ± 0,2) x 10 ⁸	(5,4 ± 0,5) x 10 ⁸	(5,0 ± 0,3) x 10 ⁸

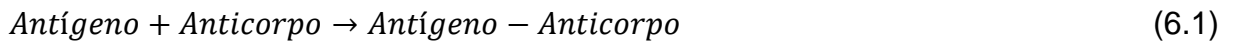
(Tabela extraída e adaptada do artigo de Fernandes et al¹⁸).

Resumidamente, imunossensores eletroquímicos podem ser projetados usando tanto a abordagem impedimétrica quanto a capacitiva redox, ressaltando-se que a última é mais vantajosa por não requerer *probe* redox em solução.

6.3.2 Arquitetura química de superfície e isoterma de Langmuir

A determinação da constante de afinidade, K_a , entre a superfície de detecção e a substância de interesse, é outra importante forma avaliar a influência da engenharia de superfície sobre a construção do biossensor. Uma vez que fornece o grau de interação entre a superfície e o analito alvo. A constante de associação do complexo antígeno-anticorpo pode ser determinada tanto a partir do sinal de R_{ct}

quanto pelo inverso do sinal de capacitância redox ($1/C_r$) obtidos para cada concentração de antígeno. O mais comumente usado modelo para obtenção de K_a , é a isoterma de adsorção de Langmuir. Ao assumir uma isotérmica de Langmuir para o cálculo de K_a , podem ser consideradas duas situações ocorrendo sobre a superfície do sensor: uma em que o sitio ativo de anticorpo se encontra ocupado pelo antígeno e outra situação em que os sítios do anticorpo se encontram livres. A reação entre o antígeno e o anticorpo pode ser expressa:



e a constante de associação, K_a , é dado pela relação:

$$K_a = \frac{[\text{Antígeno} - \text{Anticorpo}]}{[\text{Antígeno}][\text{Anticorpo}]} \quad (6.2)$$

Assumindo que a cobertura da superfície é θ , a cobertura da superfície desacoplada será $1-\theta$. Assim, a Equação (2) pode ser reescrever como se segue:

$$K_a[\text{Antígeno}] = \frac{\theta}{1-\theta} \quad (6.3)$$

Resolvendo a Equação (3) para θ :

$$\theta = \frac{K_a[\text{Antígeno}]}{1+K_a[\text{Antígeno}]} \quad (6.4)$$

A quantificação de CRP adsorvida, m , é proporcional a θ . Então, isto pode ser assumido como $m = \theta m_{m\acute{a}x}$, no qual $m_{m\acute{a}x}$ é a máxima quantidade de antígeno adsorvida sobre o sensor. Então:

$$m = \frac{m_{m\acute{a}x} K_a [\text{Antígeno}]}{1 + K_a [\text{Antígeno}]} \quad (6.5)$$

A Equação (5) pode ser reescrita para a forma linear:

$$\frac{[\text{Antígeno}]}{m} = \frac{[\text{Antígeno}]}{m_{m\acute{a}x}} + \frac{1}{K_a m_{m\acute{a}x}} \quad (6.6)$$

K_a , pode ser determinada por meio da razão entre os coeficientes angulares e lineares de obtidos a partir da regressão linear dos dados experimentais utilizando-se a Equação (6). Assumindo que m está relacionado com o sinal do transdutor (R_{ct} ou $1/C_r$), K_a pode ser calculado (ver Tabela 6.1) a partir dos dados das metodologias desenvolvidas, substituindo m , pelo o sinal transdutor em função da concentração do analito alvo (Figura 6.6).

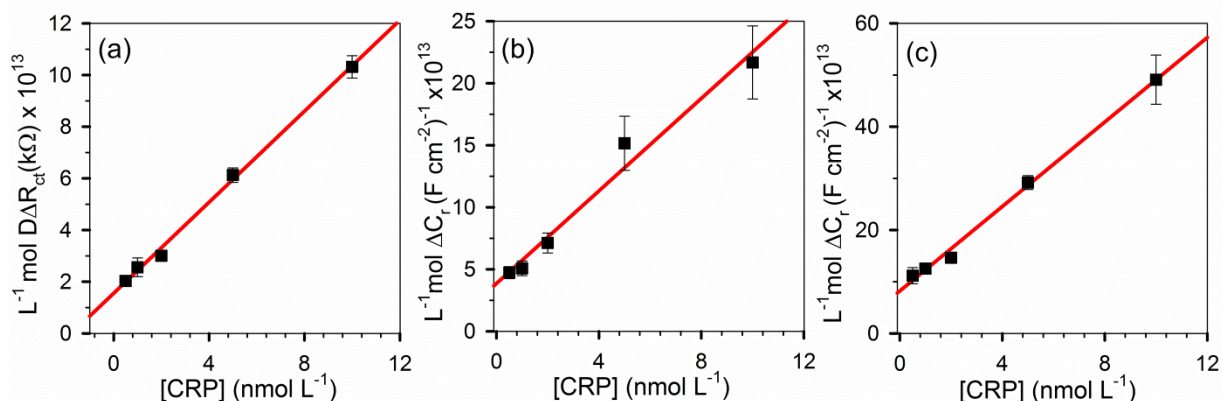


Figura 6.6. Relação linear entre $1/\Delta C_r$, x [antígeno], para as duas metodologias distintas. Foi possível calcular as constantes cinéticas de associação para estes dados utilizando a Equação 6.6. (figura extraída e adaptada do artigo de Fernandes et al¹⁸).

O K_a foi determinado para as três metodologias desenvolvidas (AQS-1, AQS-2 e AQS-3) onde os valores encontrados foram $(7,6 \pm 0,2) \times 10^8$, $(5,4 \pm 0,32) \times 10^8$ e $(5,0 \pm 0,32) \times 10^8 \text{ L mol}^{-1}$ para AQS-1, AQS-2 e AQS-3, respectivamente. Valores estes que são muito próximos daqueles reportados em trabalhos prévios ($8,3 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1}$ e $9,1 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1}$)^{73; 100}. Por fim, a similaridade dos valores de K_a evidencia fortemente a afinidade biológica que é pouca influenciada pela química de superfície usada (imobilização hidrofóbica ou covalente do anti-CRP).

6.4 Extensão do conceito de biosensor capacitivo redox para detecção de hPAP.

Diante do bom desempenho da técnica de ECE em comparação a técnica de EIE, no desenvolvimento de biossensores. O passo seguinte deste trabalho foi estender o uso da ECE na detecção de um segundo marcador, com um tiol diferente daqueles usados até o momento e adicionalmente com uma diferente proporção de tiol/ferroceno usado na preparação do filme com *probe* redox confinada. Assim, foi adotado como segundo marcador a *hPAP*, uma importante enzima derivada da próstata¹⁰¹. Esta enzima é abundante no fluido seminal humano e foi proposta como biomarcador para câncer de próstata^{102; 103}, tendo sido a *hPAP* estudada extensivamente para esta finalidade. Nos recentes anos, o interesse no uso da *hPAP* como marcador ressurgiu, uma vez que a sobre expressão desta enzima no sêmen e no plasma de homens sofrendo de câncer de próstata tem sido confirmado^{102; 103}.

Para a obtenção do novo filme redox, foi usado o PEGlate, um tiol que fornece uma superfície resistente a interações inespecíficas de proteínas devido a hidrofobicidade e neutralidade de cargas presentes na estruturas deste tiol, assim reduzindo a probabilidade de eventuais ligações inespecíficas¹⁰⁴. A biocompatibilidade e propriedades anti-encrustante^{105; 106} de tais superfícies moleculares nanoestruturadas são suficientes para assegurar a especificidade de medidas em fluidos biológicos complexos^{107; 108}.

6.4.1 Parte experimental

6.4.1.1 Métodos e procedimentos experimentais

6.4.1.2 Engenharia de superfície do biosensor capacitivo para detecção de hPAP.

Um electrodo de Au recentemente limpo(mecanicamente e electroquimicamente conforme detalhado na *Subsecção 3.1*) foi imerso numa solução de etanol absoluto extra puro contendo 1,98 mM de 11-ferrocenilundecanotiol (11-FcC) e 0,02 mM de PEGlate (**HS-(CH₂)₁₁-EG₃-OCH₂-COOH**) para ligação covalente do anti-PAP) por 16 h. Ao final da etapa de formação da

monocamada mista o eletrodo foi lavado com etanol e água deionizada e seco com nitrogênio gasoso. Após a formação da monocamada mista e sua devida caracterização por VC e ECE, os grupos carboxilas do PEGlate foram ativados usando o método biocunjugado com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/N-hidroxissuccinimina (NHS) por incubação durante 30 minutos, em uma solução de $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ de EDC e de NHS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Então foram realizadas as etapas de imobilização do anti-PAP e bloqueio dos grupos carboxílicos remanescentes com BSA (Sigla em inglês para *bovine serum albumin*) com posterior caracterização eletroquímica. Após a caracterização eletroquímica da etapa de imobilização do anticorpo, a hPAP foi adicionada em aliquotas de $20 \mu\text{l}$ à interface em uma variação de concentração entre $0,01 \text{ nmol L}^{-1}$ a $10,0 \text{ nmol L}^{-1}$ preparadas em PBS (pH 7,4). O eletrodo foi então lavado com mais PBS e as medidas de voltametria ciclica e impedância, realizadas. Após a interação e leitura de cada concentração de hPAP, a superfície foi regenerada com a adição de uma solução de 6 mmol L^{-1} de NaOH em etanol 0,6 % por 5 minutos.

6.4.1.3 Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas para a detecção capacitiva de hPAP foram realizadas de igualmente a detecção capacitiva da CRP. Ou seja, as medidas de EIE e VC foram aplicadas para a caracterização de todas as etapas de construção de superfície receptiva. O eletrólito suporte usado foi uma solução de 20 mmol L^{-1} TBAClO₄(perclorato de tetrabutilamônio) dissolvido em acetonitrila (ACNT) e H₂O (20:80) e nenhum tipo de sonda redox foi adicionado na solução. Para todas as metodologias, VC foi realizada a uma taxa de varredura de 100 mV s^{-1} entre 0,0 - 0,7 V em relação ao eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl 3M). Adicionalmente, as medidas de EIE foram realizadas em uma faixa de frequência de 10 mHz a 1MHz no potencial de meia onda, $E_{1/2}$, ($\sim 0,45 \text{ V}$) obtidos a partir das medidas VC. Adicionalmente, também foram realizadas medidas no potencial de 0,1 V (região não redox). Vale ressaltar que todas as medidas foram realizadas em triplicata.

6.4.2. Resultados e discussão

A construção da superfície receptiva com *probe* redox confinada foi monitorado por VC e ECE (Figura 6.7). Gráficos capacitivos de Nyquist foram obtidos [no $E_{1/2}$ da *probe* redox confinada, Fc/Fc^+ , ($\sim 0,45$ V) determinado por VC conforme mostrado na Figura 6.7a] para o Au-polido, monocamadas de ferroceno/PEGlate e a superfície modificada com o anticorpo (Figura 6.7b). Um aumento na capacitância a partir dos valores da dupla camada de ~ 10 para $\sim 300 \mu F cm^{-2}$ é observado na modificação do eletrodo polido com o filme de 11-FcC/PEGlate, fenômeno devido a introdução da capacitância redox associada aos grupos ferroceno. O subsequente acoplamento do anticorpo a superfície resulta em um notável decréscimo na capacitância para $\sim 250 \mu F cm^{-2}$, atribuído à perturbação da densidade de estados ocupados, DOS, do sistema⁶¹.

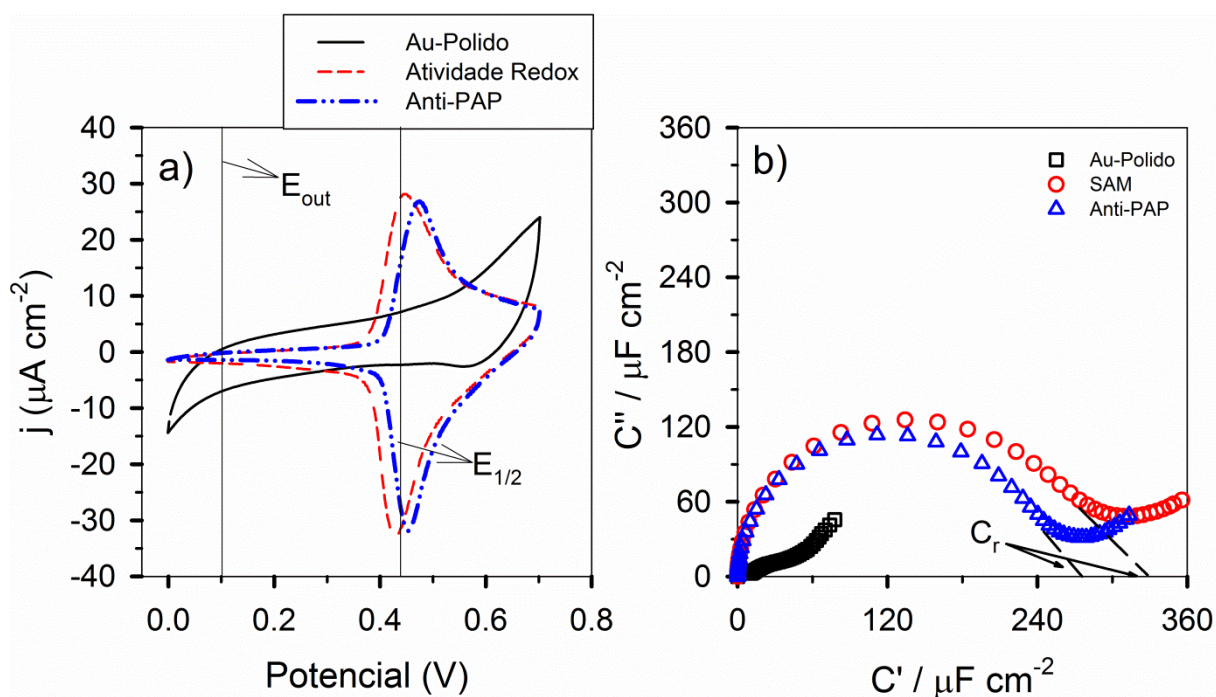


Figura 6.7. Voltamograma e gráfico de Nyquist mostrando a variação do datilograma para a corrente e capacitância redox, respectivamente, em virtude a preparação da superfície molecular nanoestruturada contendo *probe* redox confinada e receptivo para detecção de *hPAP*. a) Resposta voltamétrica para a superfície de ouro recém polida (linha sólida preta), SAM mista de PEGlate e ferroceno (linha tracejada vermelha), SAM mista modificada com anti-PAP (linha traço-pontilhada em azul). C_r é o valor de C' no interstício do gráfico de Nyquist. Todas as medidas foram realizadas em $E_{1/2}$ do ferroceno (0.45V) versus o eletrodo de referência de $Ag|AgCl$, onde o valor de C_r é máximo. (figura (b) extraída e adaptada do artigo de Lehr et al¹⁹).

O anti-PAP foi imobilizado por ligação covalente com o *PEGlate* conforme descrito em 6.4.1.1. A interface foi testada frente a uma variação de concentrações da *hPAP* em um intervalo de 0-10 nmol L⁻¹ em triplicata. Assim, uma vez estabelecidas as respostas eletroquímica destas superfícies moleculares nanoestruturadas, o desempenho destas foi avaliado na detecção da *hPAP*. Conforme mostrado na Figura 6.8 através dos datilogramas obtidos para o gráfico de Nyquist impedimétrico e capacitivo (Figura 6.8a e 6.8b, respectivamente) as medidas impedimétricas não permitem estimar o valor de R_{ct} por meio de ajuste no circuito equivalente da Figura 6.3. Já gráfico capacitivo de Nyquist fornece uma definição clara da resposta da capacitância redox, C_r , em função da concentração do analito em que o eletrodo foi incubado. Adicionalmente, os dados de C' e C'' mostrados na Figura 6.8b também podem ser representados na forma de gráficos de Bode, no qual a o comportamento das capacitâncias real e imaginária, devido ao carregamento do grupo ferroceno, podem ser avaliados em função da frequência (Figura 6.9). O gráfico de Bode para o componente real descreve o carregamento redox como um plato, enquanto no componente imaginário é observado um pico com o sinal máximo na frequência que correlaciona diretamente a razão de transferência de elétrons entre o ferroceno ligado a superfície e o substrato de ouro conforme reportado previamente¹⁴. Vale notar que as medidas realizadas fora do potencial redox do sistema (E_{out}) o sinal capacitivo é pequeno e não responsivo para o reconhecimento do analito, com a resposta inferior a 2% da observada no potencial redox do sistema ($E_{1/2}$)(ver Figura 6.9).

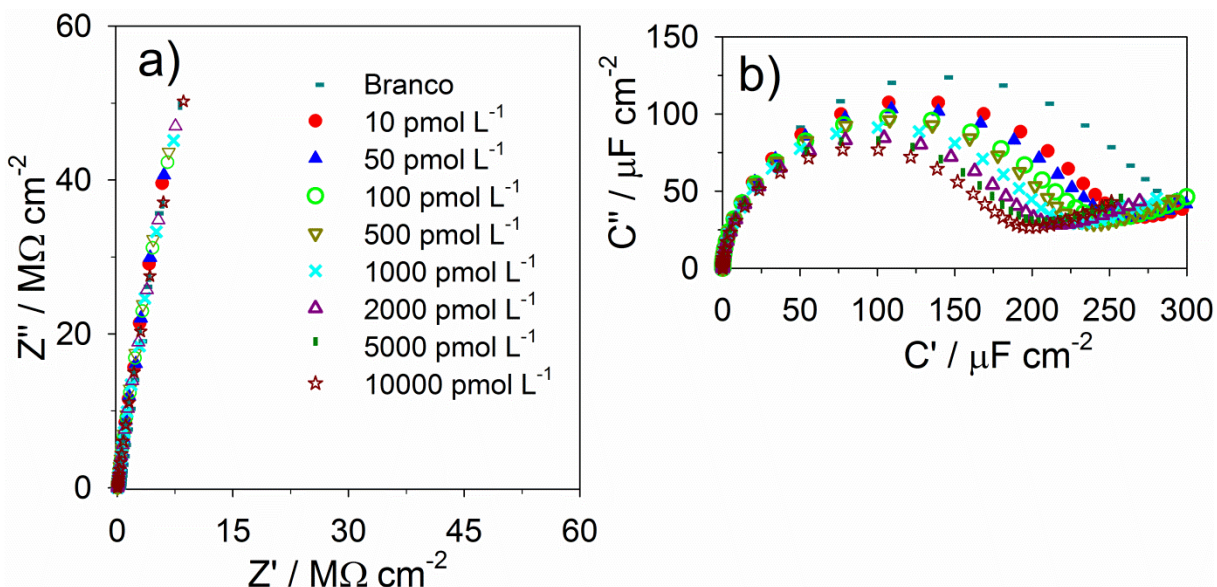


Figura 6.8. Análises de impedância faradaica ilustrando a ausência de resposta interfacial por meio de medidas impedimétricas e a sensibilidade por capacitância. (a) Gráficos de Nyquist para medidas impedimétricas de Z'' versus Z' para superfícies moleculares nanoestruturadas com atividade redox e receptiva para a *hPAP*. A resposta capacitiva análoga para determinação de *hPAP* é mostrada em (b), onde a variação de sinal em função da resposta ao analito é observado (a própria C_r é obtida no interstício do gráfico de Nyquist). A curva analítica foi obtida a partir de três diferentes eletrodos de trabalho. (figura extraída e adaptada do artigo de Lehr et al¹⁹).

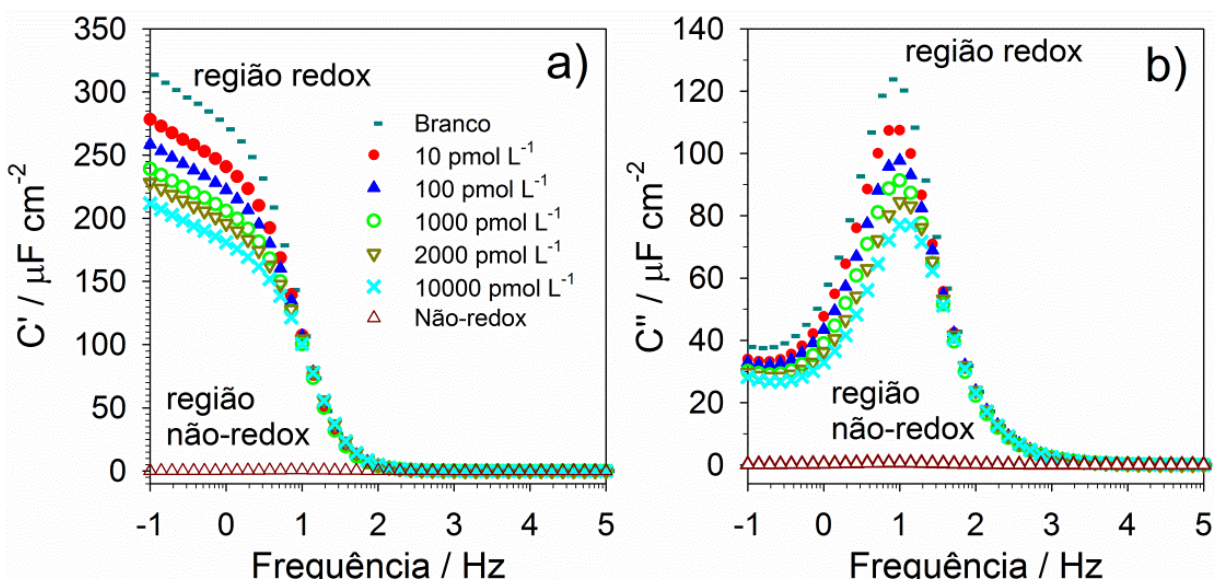


Figura 6.9. (a) Representa a parte real da capacitância complexa proveniente da superfície molecular nanoestruturada contendo probe redox confinada e receptiva nos potenciais correspondentes a região redox e não-redox, determinada a partir do potencial de meia onda dos eletrodos de trabalho para detecção de *hPAP*. (b) Similar a (a), no entanto mostra a resposta da parte imaginária da capacitância complexa. Observe que o eixo da frequência é plotado como expoente na base dez. Todos os conjuntos de dados são as médias obtidas a partir de três diferentes eletrodos de trabalho, inicialmente modificados com anti-PAP (traço verde), em seguida, incubadas com concentrações crescentes do analito. (figura extraída e adaptada do artigo de Lehr et al¹⁹).

É evidente a partir das Figuras 6.8 e 6.9 que C_r decresce em resposta a imobilização da analito no sitio de reconhecimento do filme receptivo, como também é evidente que está resposta é específica a *hPAP*, uma vez que não houve variação significativa de sinal para outras duas proteínas testadas, a fetuína e a BSA(Figura 6.10).

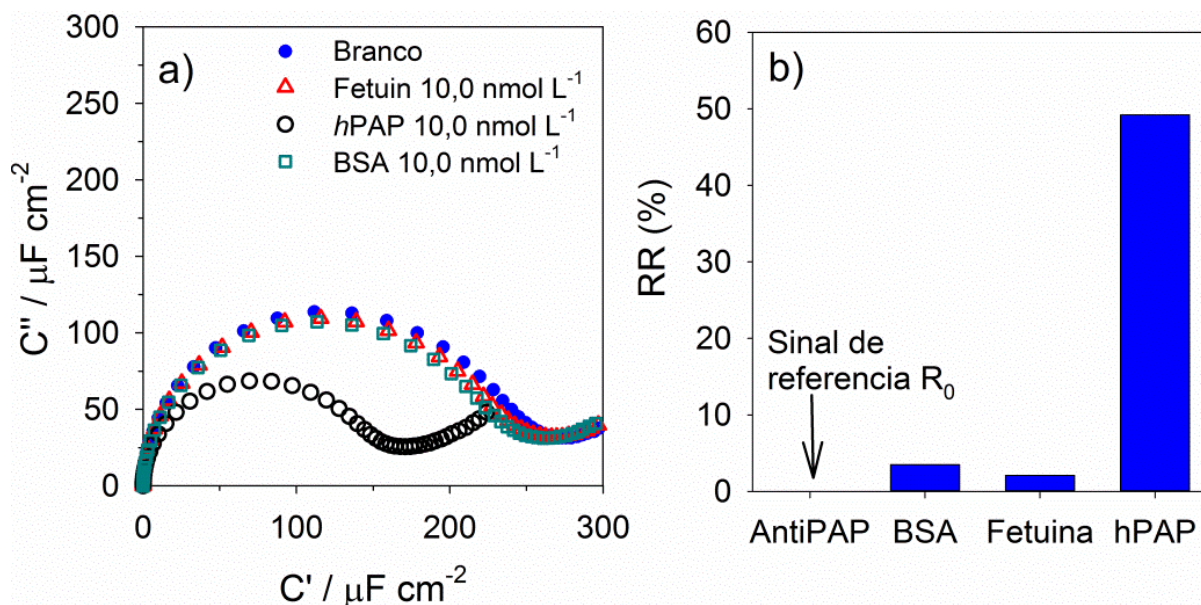


Figura 6.10 Resposta capacitiva da superfície receptiva para *hPAP*, na presença de proteínas inespecíficas, representada em valores de capacitância redox no gráfico de Nyquist (a) e expressa em termos de resposta relativa (RR) em porcentagem (b). A porcentagem de resposta foi calculada usando a relação $RR = (R_n - R_0) \times 100 / R_0$ onde R_0 é a resposta do branco para a superfície de reconhecimento (medida realizada pós-incubação em PBS sem a presença do analito). Ambas as proteínas inespecíficas, BSA e fetuína apresentaram menos de 4 % de resposta relativa contra aproximadamente 50% de resposta relativa para a *hPAP* na mesma concentração ($10^{-8} mol L^{-1}$). [Figura (b) extraída e adaptada do artigo de Lehr et al¹⁹].

Usando o inverso da capacitância redox ($1/C_r$). Assim, a metodologia apresentou bons resultados na detecção e quantificação de *hPAP*. A Tabela 6.2 resume as principais figuras de mérito e valores da constante de afinidade (K_a), obtidos a partir da curva analítica construída para detecção da *hPAP* (Figura 6.11). O L.D. foi encontrado foi de $11 pmol L^{-1}$, o L.Q. de $44 pmol L^{-1}$ e a faixa linear determinada entre 5×10^1 a $10^4 pmol L^{-1}$. Estes valores são equivalentes aos apresentados por métodos baseados em ELISA ($30-300 pmol L^{-1}$)⁵⁴ e são clinicamente úteis, dado que em indivíduos saudáveis o nível de *hPAP* no plasma está entre $10-30 pmol L^{-1}$ e em valores acima de $100 pmol L^{-1}$ são considerados como indicativo de câncer de próstata⁵⁴. Assim, os valores de L.D. e faixa linear obtidos na metodologia apresentada, potencialmente fornecem uma forma adequada para triagem de *hPAP*. De acordo com nosso levantamento bibliográfico, este estudo

é o primeiro método eletroquímico de detecção direta de *hPAP*, uma vez que outros estudos eletroquímicos para detecção desta proteína/enzima são baseados na atividade enzimática que a *hPAP* apresenta. O que consiste na detecção indireta de deste biomarcador^{109; 110}. Portanto, a sensibilidade aliada à simplicidade oferecida pela abordagem capacitiva redox comparada à ELISA e sensores enzimáticos^{109; 110}, faz deste trabalho uma alternativa interessante para detecção de *hPAP*.

Tabela 6.2: Alguns parâmetros analíticos para determinação capacitiva redox de *hPAP*¹⁹.

Faixa Linear (nM)	0,05 – 10,0
Coefficiente de Correlação (r^2)	0,989
Sensibilidade	523,3
$L \cdot nmol^{-1} / \Delta C_r$ ($\mu F \cdot cm^{-2}$)	
L.D (pmol L ⁻¹)	11
L.Q (pmol L ⁻¹)	44
K_a (L mol ⁻¹)	$(3,6 \pm 0,029) \times 10^9$

[Tabela extraída e adaptada do artigo de Lehr et al¹⁹]

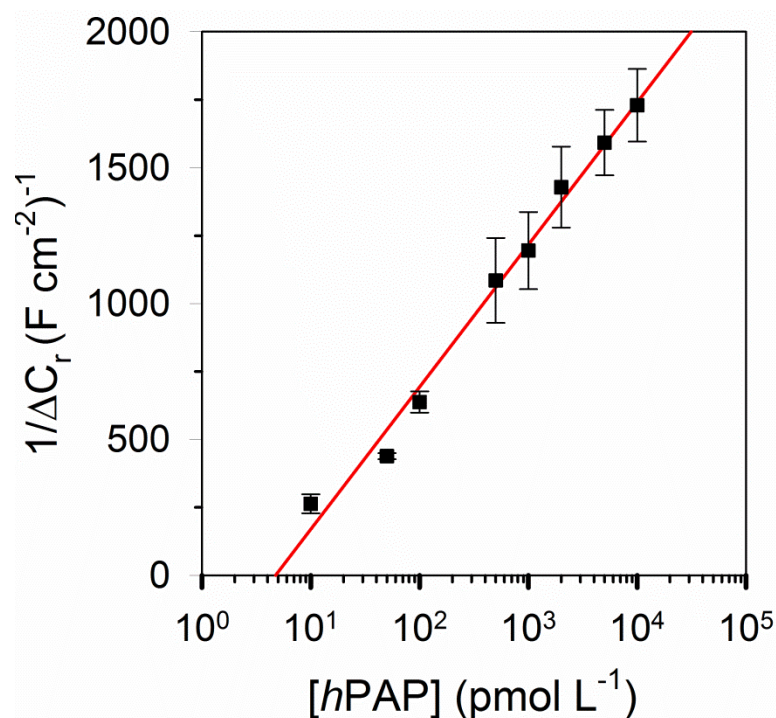


Figura 6.11. Gráfico da variação do inverso da capacitância redox em função da variação do log da concentração da proteína alvo. Todos os valores foram obtidos a partir de um ajuste dos valores médios de conjuntos de dados independentes realizados em triplicata e as barras de erro representam o desvio padrão para os valores do sinal analítico ($1/C_r$). O coeficiente de regressão linear obtido foi de 0,989 (figura extraída e adaptada do artigo de Lehr et al¹⁹).

6.5 Conclusão

Os resultados obtidos mostram o sucesso no desenvolvimento de uma nova técnica eletroquímica que consiste em medidas de capacitância redox e, a qual é eficiente no desenvolvimento de biossensores. Esta técnica foi aplicada no desenvolvimento de novas metodologias para detecção/quantificação de CRP e *hPAP* com simplicidade e rapidez usando diferentes configurações para construção do filme receptivo para cada analito. A técnica possibilitou desenvolver métodos precisos, seletivos e sensíveis para o *screening* de biomarcadores de importância clínica o que significa uma alternativa atraente no campo de diagnóstico clínico.

7 Funções de imitância aplicadas ao sensoriamento de biomarcadores.

Nesta seção é introduzido o uso de um portfólio de funções de imitância (*ImFs*) matematicamente derivadas que uma vez usadas como sinal transdutor em biossensores eletroquímicos possibilitam, a partir de um mesmo conjunto de dados, aumentar a sensibilidade e significativamente reduzir o tempo de análises em comparação às análises tradicionais de impedância e capacitância redox. As *ImFs* foram derivadas a partir de medidas de espectroscopia de impedância realizadas na configuração resistiva faradaica (com *probe* redox em solução), resistiva não-faradaica (sem qualquer *probe* redox no sistema) e na configuração capacitiva redox, com superfícies moleculares nanoestruturadas contendo a *probe* redox confinada. Parte dos resultados descritos a seguir encontra-se publicados na *Analytical Chemistry* (Amol V. Patil e co autores 87 (2015) 944–950).

7.1 Introdução

Métodos analíticos baseados em medidas elétricas, muito provavelmente irão proporcionar o desenvolvimento de biossensores cada vez mais sensíveis, projetados em plataformas de sensoriamento miniaturizadas, multiplex e portáteis. Isto é possível, pois medidas elétricas podem ser realizadas em dispositivos construídos em microescala, ou seja, em formatos da ordem de micrometros e com sistemas em fluxo com injeção de amostras na ordem de microlitros. Desta forma, resultando em métodos de baixo custo, alto rendimento e ainda com potencial multiplexação. Diversos trabalhos têm sido reportados na literatura usando sinais elétricos para detecção de biomarcadores, por exemplo, métodos voltamétricos tais como varredura linear¹¹¹, pulso diferencial¹¹², onda quadrada¹¹³, métodos amperométricos¹¹⁴ e métodos impedimétricos, tais como a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)¹¹⁵ ou espectroscopia de capacitância eletroquímica (ECE)^{17; 18; 19}. Entre estes, os métodos impedimétricos se destacam pela simplicidade das medidas e sensibilidade a mudanças na interface sem necessidade de marcação do analito^{75; 116; 117; 118; 119}.

Em medidas de EIE, a resistência do sistema se deve a uma corrente elétrica que pode ou não estar associada com o de transferência de elétrons entre uma espécie eletro ativa (*probe redox*). Assim, EIE pode ser classificada em faradaica (em que a *probe redox* está presente na solução de eletrólito suporte) e não-faradaica (sem a presença de qualquer *probe redox* no sistema) a qual, essencialmente, monitora a variação da capacitância interfacial ou variação da constante dielétrica na superfície receptiva do eletrodo modificado^{120; 121}. Com relação às medidas por ECE, a corrente elétrica está associada à transferência de elétrons entre o eletrodo e uma *probe redox* que se encontra imobilizada na superfície (diferentemente da EIE faradaica em que a *probe redox* está em solução). EIE faradaica ou não-faradaica têm sido utilizadas para o desenvolvimento de inúmeros métodos de biossensoriamento^{71; 74; 112; 113; 115; 122} devido à confiabilidade ofertada por estas técnicas na detecção de biomarcadores^{75; 121}, inclusive possibilitando integrar análises em amostras reais de pacientes e detecção simultânea de múltiplos marcadores^{19; 71; 74; 77}. Já o emprego da técnica de ECE na detecção de marcadores clínicos é recente, mas a eficiência de tal técnica foi

comprovada por nosso grupo em diversos trabalhos publicados na literatura^{16; 17; 18; 19; 20; 21}.

De forma geral, o uso da EIE faradaica em análises consiste no monitoramento da resistência de transferência de carga (R_{ct}) valor este que é calculado via circuito de Randles^{123; 124; 125}. Desta forma, qualquer modificação na superfície do eletrodo (como, por exemplo, a ligação de uma proteína ao sítio ativo do respectivo anticorpo imobilizado), causa uma variação mensurável no R_{ct} . Já o uso de medidas impedimétricas não-faradaicas, no monitoramento de alterações da superfície do eletrodo, tipicamente baseia-se em parâmetros tais como o módulo da impedância $|Z|$, a capacitância da dupla camada (C_{dl}) ou o ângulo de fase (ϕ)^{75; 126; 127; 128}. Por fim, em biossensores desenvolvidos por ECE o inverso da capacitância redox ($1/C_r$) é usado como sinal transdutor da interação entre o analito e a superfície receptiva (conforme apresentado nos Capítulos 5 e 6)^{16; 17; 18; 19; 20; 21}.

Qualquer que seja a configuração adotada, medidas impedimétricas espectroscópica sempre apresentam modelos físico-químicos fenomenológicos relativos ao circuito equivalente ou modelos contínuos derivados a partir das equações de Poisson-Nernst-Planck, sendo que, tal análise permite calcular uma série de parâmetros físicos e físico-químicos dos quais vários podem ser usados de forma instrutiva no modelamento de interfaces e, conseqüentemente, serem usados para o monitoramento eventos sobre a superfície.

No caso específico de medidas impedimétricas faradaicas onde o R_{ct} é de grande magnitude, a impedância de Warburg é negligenciável (ou não mensurável), e o circuito equivalente de Randle pode ser aplicado para obter separadamente a impedância existente devido à transferência de elétrons, R_{ct} e usar este como sinal transdutor. De fato, através do grande número de trabalhos por EIE, a forma tradicional de análise dos dados usa o R_{ct} como sinal^{71; 129; 130; 131; 132; 133}. Entretanto, o uso das medidas de EIE como funções genéricas de transferência elétrica (por exemplo, sinais genéricos de entrada/saída) quando avaliadas de forma sistemática e quantitativa podem levar a ferramentas analíticas úteis, sem a necessidade de pré-modelamento da interface de interesse ou se preocupar qual seria a exata solução ou equação física que governa o processo

por traz da função de transferência (embora isto obviamente exista). Mais especificamente, dentro de um conjunto de medidas de EIE sobre uma dada interface, está disponível uma biblioteca de funções de imitância (tais como Z^* , C^* , Y^* e M^* , impedância complexa, capacitância, admitância e modulo, respectivamente) e também componentes associados.

Lembrando que EIE é definida como uma função de transferência específica de entrada e saída de sinais de voltagem e corrente e considerando $V(t) = \bar{V} + \tilde{V}e^{j\omega t}$ como sinal de entrada, e a corrente como uma resposta sigmoide de saída $I(t) = \bar{I} + \tilde{I}e^{(j\omega t - \phi)}$, então por meio desta relação pode-se derivar todos os parâmetros genéricos os quais são denominados de funções de imitância $ImF(\omega)$, bem como suas relações. Então, para aplicações analíticas, o potencial de cada $ImF(\omega)$ pode ser avaliado em termos das principais figuras de mérito selecionando-se assim o parâmetro $ImF(\omega)$ de melhor sensibilidade, limite de detecção e tempo de resposta. As principais vantagens analíticas do uso de funções de imitância em comparação as abordagens eletroquímicas convencionais são: (i) a realização de medidas por espectroscopia de impedância em uma faixa de frequência curta (1.0 a 50.0 Hz, por exemplo), o que reduz o tempo de coleta de dados significativamente (os quais em geral levam 90 minutos em medidas EIE, a menos de 3 minutos na abordagem por $ImF(\omega)$); e (ii) aumento da sensibilidade e limite de detecção possibilitando análises mais precisas e sensíveis⁶².

A fim de comprovar a eficiência do conceito de funções de imitância, os resultados a seguir mostram a efetiva detecção da proteína CRP nas três configurações impedimétricas ECE, EIE faradaica e EIE não-faradaica. Para tal, foram selecionados os melhores parâmetros e faixa de frequências de cada função complexa (Z^* , C^* , Y^* and M^* , por exemplo) em termos de sensibilidade e limite de detecção da CRP e estes comparados aos parâmetros tradicionais usados para cada técnica. Adicionalmente, a mesma análise por funções de imitância usando a técnica de ECE também foi aplicada a detecção de Alfa-sinucleína.

7.2 Detecções impedimétrica faradaica e não-faradaica da CRP.

7.2.1 . Parte experimental

7.2.1.1 Métodos e procedimentos experimentais

Para obtenção das monocamadas auto-organizadas (SAM), os eletrodos BASi de 1,6 mm de diâmetro foram pré-tratados e em seguida imersos em uma solução de 2,0 mmol L⁻¹ de 16-mercaptohexadecanoico ácido (16-MHDA) em etanol absoluto extra puro por 16 horas. Em seguida os eletrodos foram lavados com etanol e água deionizada, secos com fluxo de nitrogênio gasoso antes da caracterização por voltametria cíclica (VC) e EIE.

7.2.1.2 Imobilização do receptor e construção da curva padrão.

A imobilização do anti-CRP sobre a SAM composta de 16-MHDA foi realizada por ligação covalente. Desta forma, primeiramente foi realizado a ativação adequada da SAM por meio do método biocunjugado com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/N-hidroxissuccinimina (NHS). Para tal, o eletrodo foi imerso, durante 30 minutos, em uma solução de 0,4 mol L⁻¹ de EDC e de NHS 0,1 mol L⁻¹ para promover a ativação dos grupos terminais carboxila presentes no tiol. Então foram realizadas as etapas de imobilização do anti-CRP e bloqueio dos grupos carboxílicos remanescentes com etanolamida 1,0 mol L⁻¹ (imersão por 40 minutos, pH 8.5) com posterior caracterização eletroquímica. Finalmente, CRP foi adicionada em aliquotas de 40 µl a interface em uma variação de concentração entre 0,5 nmol L⁻¹ a 10,0 nmol L⁻¹ preparadas em PBS (pH 7,4). O eletrodo foi então lavado com mais PBS e água deionizada e seguidamente foram realizadas as medidas de voltametria cíclica e impedância. Após a interação e leitura de cada concentração de CRP, a superfície funcionalizada do eletrodo foi regenerada por imersão uma solução de 6,0 mmol L⁻¹ de NaOH em etanol 0,6 % por 5 minutos.

Todas as etapas de construção dos biossensores foram caracterizadas eletroquimicamente por medidas de VC e EIE em 1,0 mmol L⁻¹ de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} (*probe* em solução) diluídos na solução de eletrólito de suporte de KCl 0,1 mol L⁻¹. A caracterização por VC foi realizada a uma taxa de varredura de 100 mV s⁻¹ na faixa

de potencial de -0,2 a 0,6 V em relação ao eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl 3mol L⁻¹), enquanto que as medidas de EIE foram realizadas em uma faixa de frequência de 0,01Hz a 1,0MHz no potencial de circuito aberto do sistema (~0,21 V) obtidos a partir das medidas VC. As medidas não-faradaicas foram realizadas sob as mesmas condições, no entanto, sem a presença de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} e no potencial de 0,0 V com relação ao eletrodo de referência Ag/AgCl.

7.2.1.3 Análises de dados

As medidas de EIE faradaica e não-faradaica foram convertidas nas funções complexas de admitância impedância (Z^*), capacitância (C^*), módulo (M^*) e admitância (Y^*). A partir destas funções foram obtidas suas respectivas relações fasorial.

$$Z^* = \frac{\bar{V}}{\bar{I}} \frac{e^{j\omega t}}{e^{j(\omega t - \phi)}} \quad (7.1)$$

$$C^* = 1/(j\omega Z^*) \quad (7.2)$$

$$M^* = j\omega Z^* \quad (7.3)$$

$$Y^* = j\omega C^* \quad (7.4)$$

sendo $j = \sqrt{-1}$ e $\omega = 2\pi\nu$ [frequência angular, onde $\pi \cong 3.14$ e ν é dado em s⁻¹ (Hz)].

Estas funções complexas podem ser divididas, separadamente, em suas constituintes; componentes real (ImF') e imaginária (ImF''). Para calcular cada ImF , bem como o modulo absoluto $|ImF|$ a razão (ImF''/ImF'). Cada um dos parâmetros e sub-paramêtros respondem especificamente a mudanças interfaciais e, conseqüentemente, podem ser analisados individualmente como forma de monitoramento da interação da CRP (uma vez que o eletrodo está funcionalizado para tal), totalizando dezesseis parâmetros para qualquer frequência amostrada. Tendo em vista que cada parâmetro tem sua grandeza, ou seja, unidades de medida diferentes, uma comparação entre os resultados requer apropriada normalização

dos resultados. Assim, a resposta analítica de cada ensaio foi avaliada em termos de resposta relativa (RR) em porcentagem, onde RR (%) pode ser definida como:

$$RR_n^\omega(\%) = [(R_n^\omega - R_0^\omega)/R_0^\omega] * 100 \quad (7.5)$$

Assim, R_0^ω é o valor inicial da ImF na ausência da analito (branco) e R_n^ω o valor da ImF após a incubação em uma concentração específica do analito (n) na mesma frequência angular ω . Com este tratamento, pode ser definido para cada ImF a frequência (ou faixa de frequência) de maior resposta relativa para uma dada faixa de concentração do analito (onde o RR é máximo).

O processamento dos dados foi realizado com um algoritmo desenvolvido exclusivamente para este propósito MATLAB R2013b que possibilita converter os dados das funções de transferência elétricas originais as funções de imitância ImF . Adicionalmente, o algoritmo calcula a relação entre a resposta relativa e concentração do analito, se tal relação é monotônica e linear ($r^2 > 0,95$) é então calculado a sensibilidade com base na inclinação da curva analítica. Então, a região ótima de frequência para cada ImF é determinada. Somente as funções que mostraram linearidade apropriada mediante a construção das curvas analíticas foram usadas, enquanto o restante foi descartado. O cálculo do limite de detecção (L.D.) foi realizado de acordo com a determinação da IUPAC⁸³. Por fim, nas medidas impedimétricas faradaicas o desempenho analítico das $ImFs$ e do R_{ct} foram comparados, enquanto que na configuração não-faradaica a avaliação foi apenas sobre as $ImFs$.

7.3 Resultados e discussões

Existem na literatura inúmeros métodos de análise da CRP, como por exemplo, métodos de detecção por turbidimetria, nefelometria ou ELISA⁶², métodos este que apresentam desvantagens tais como baixa sensibilidade, alto índice de falso positivo ou requerem procedimentos morosos^{134;135}. Diante disto, a investigação descrita a seguir teve por objetivo aplicar análises de funções de imitância sobre métodos de impedância (faradaica e não-faradaica) previamente

estabelecidos para detecção da CRP ^{74; 129; 136; 137}, com o principal intuito de alcançar vias mais rápidas, sensíveis e *label free* para aplicação em diagnóstico.

As medidas de EIE para detecção de CRP foram realizadas sobre superfícies receptivas construídas sobre uma monocamada de 16-MHDA e assim, toda a eficiência e aplicabilidade das *ImFs* em cada frequência, foi avaliada (bem como o R_{ct} calculado a partir do circuito equivalente de Randles).

A Figura 7.1 mostra a resposta relativa (RR) em porcentagem para todas as *ImF* (componentes real e imaginário, o modulo absoluto e a razão) em função da concentração da CRP, ao longo da faixa de frequência analisada. Esta análise torna fácil determinar a faixa de frequência onde o valor de RR é máximo para cada parâmetro analisado aqui (*ImF*).

O desenho espectral do modulo absoluto da função complexa $Z^*(|Z|)$ (Figura 7.2) mostra claramente que RR varia em magnitude, de acordo com a concentração de CRP, ao longo de toda a faixa de frequência estudada. Também é fácil notar que a região de maior resposta (maior variação em RR para a concentração da CRP) ocorre em baixas frequências (próximo de 0,1 Hz). A resposta média de RR(%) foi calculada computacionalmente usando o software MatLab por meio do algoritmo MATLAB R2013b (três repetições para cada concentração de CRP na faixa de 0,5 a 100,0 nmol L⁻¹). Este tratamento foi aplicado para todas as 16 *ImFs*, assim, nas frequências em que a resposta da curva analítica (RR(%) x log [CRP]) apresentou linearidade acima de 95% ($r^2 \geq 0,95$) a sensibilidade (S) foi calculada como sendo o coeficiente angular da reta da curva padrão. A Tabela 7.1 mostra as principais figuras de mérito para os *ImFs* que apresentaram as melhores sensibilidades.

Tabela 7.1. Resposta dos parâmetros *ImF* ótimos para detecção de CRP sobre eletrodo de ouro modificado com 16-MHDA e com anticorpo anti-CRP. Os dados representados aqui são baseados em um eletrodo com três medições por concentração. A sensibilidade foi calculada pelo ajuste linear da resposta relativa RR (%) em função da concentração e o L.D calculado com base nos parâmetros linear desta curva analítica e o desvio padrão do branco.

<i>ImF</i>	Frequência otimizada (Hz)	r^2	Sensibilidade (% conc ⁻¹)	L.D. (pmol L ⁻¹)
Z''/Z'	0,1	0,994	34,9	228
$ Z $	0,1	0,988	58,6	153
R_{ct}	-	0,987	4,8	1420

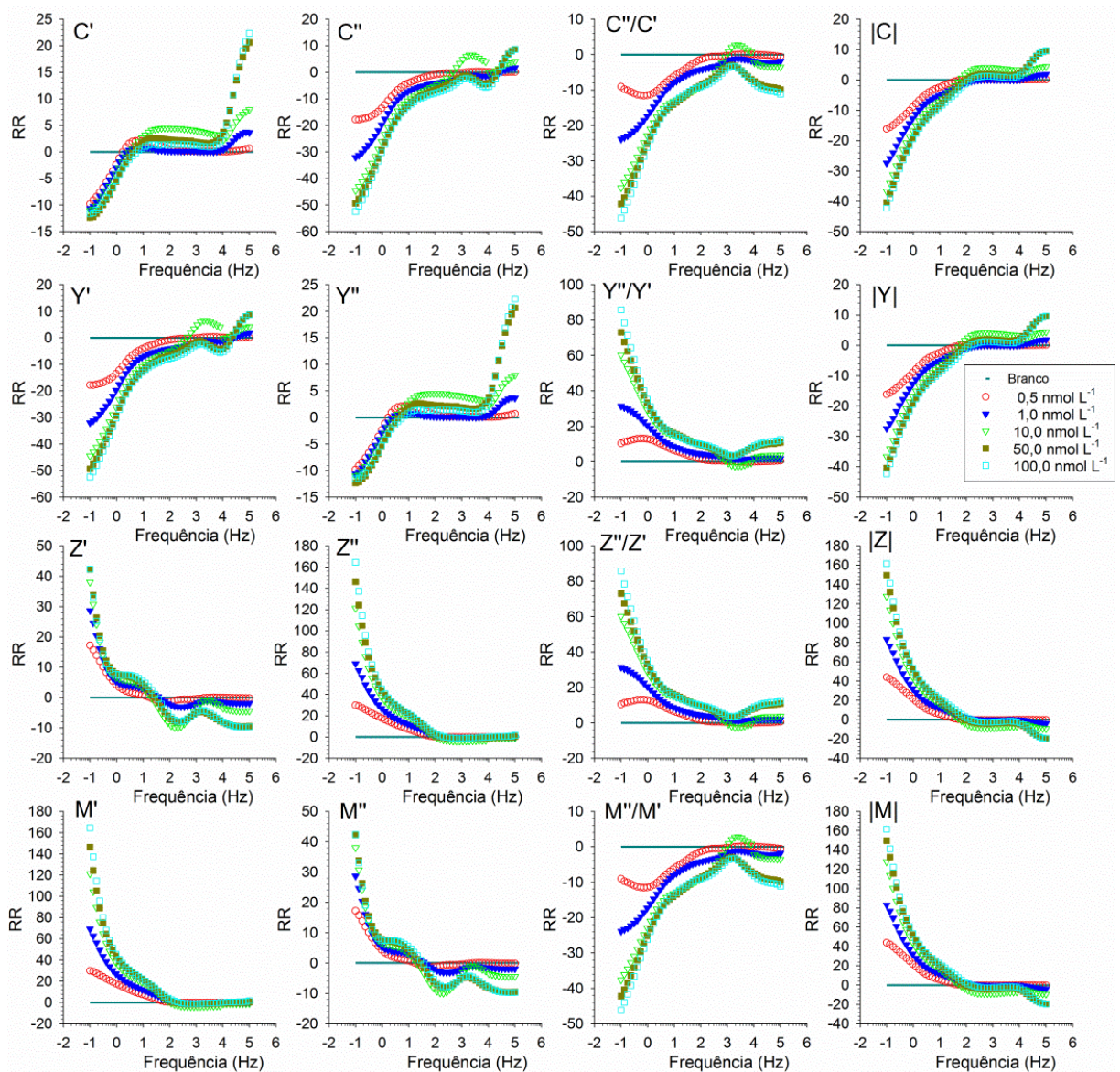


Figura 7.1. Resposta relativa em porcentagem, RR(%) em função da frequência em escala logaritmo (representada apenas pelos expoentes na base 10), para os 16 parâmetros analisados através da faixa de frequência estudada de 0,1–100 kHz. Os valores de concentração de CRP usados foram de: 0,5 nmol L⁻¹(círculo), 1,0 nmol L⁻¹ (triângulo preenchido), 10,0 nmol L⁻¹ (triângulo vazio), 50,0 nmol L⁻¹ (quadrado preenchido) and 100,0 nmol L⁻¹ (quadrado vazio), sobre eletrodo modificado com 16-MHDA. Conforme C*, M*, e Y* são fasorialmente derivados a partir de Z*, é evidente que diversas funções apresentem resposta similar (exemplo Z'' e M', M'' e Z').

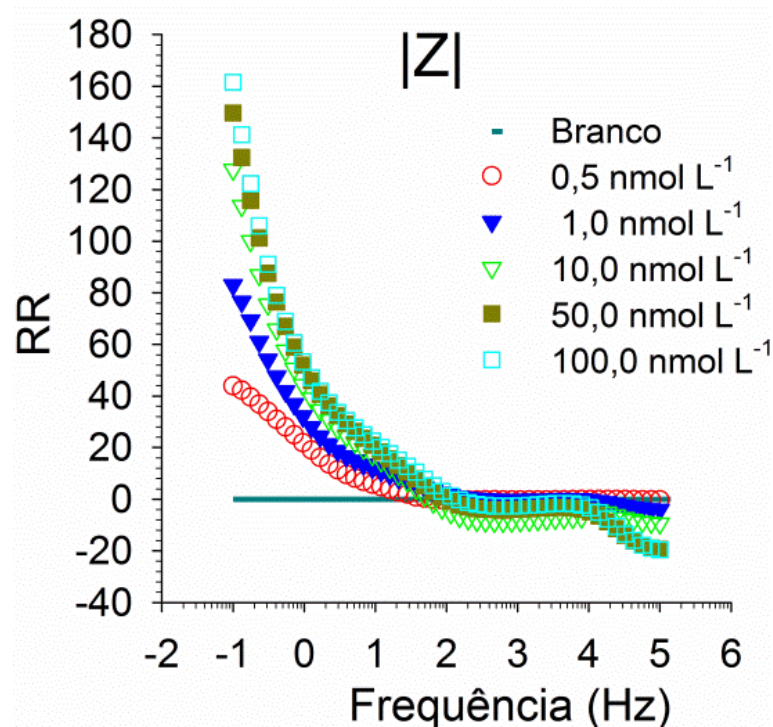


Figura 7.2. Um típico exemplo mostrando a variação da resposta relativa, RR(%), para o parâmetro Z'' de uma análise impedimétrica faradaica (EIE) em função da frequência em escala logaritmo (representada apenas pelos expoentes na base 10), para a superfície receptiva a CRP construída a partir da imobilização de anti-CRP sobre um eletrodo de ouro modificado com 16-MHDA. Foi usada uma concentração de CRP na faixa de 0,5 a 100,0 nmo L⁻¹. A resposta é máxima por volta de 12 Hz, indicando assim a frequência analítica otimizada.

Esta abordagem de tratamento dos dados permite comparar o desempenho de cada parâmetro de ImF e isolar uma frequência em particular (ou faixa de frequência) de melhor resposta analítica, levando em consideração não apenas a sensibilidade e o L.D., mas também o tempo de medida. Os cálculos mostraram que na detecção de CRP, usando a interface Anti-CRP/16-MHDA, o $|Z|$ e a razão Z''/Z' alcançaram as sensibilidades de 58,6 e 34,9 per cento por (pmol L⁻¹) x 10, respectivamente. Valores significativamente mais sensíveis do que os 4,8 per cento por (pmol L⁻¹) x 10 que foram obtidos por R_{ct} (Figura 7.3). Outro parâmetro que deixou claro a superioridade da abordagem ImF sobre a abordagem tradicional foi o limite de detecção (L.D.), em que foram encontrados os valores de 153,0 e 228,0 pmol L⁻¹ para $|Z|$ e a razão Z''/Z' , respectivamente. Enquanto que usando o R_{ct} como sinal transdutor este valor foi de 1420,0 pmol L⁻¹ (ou seja, de menor poder analítico). A estabilidade e a reprodutibilidade do sistema analítico foram estimadas pela variação no sinal transdutor (R_{ct} ou $|Z|$, por exemplo) entre repetidas medições e, conforme evidente nas barras de erro na Figura 7.3, esta variação mostrou um desvio padrão relativo inferior a 1%. Outro ponto que vale ainda ressaltar é que independente da

química da superfície usada, como por exemplo, o uso de outro tiol para a formação da SAM, há sempre um ou mais ImF que apresentam a sensibilidade maior que a obtida por R_{ct} ⁶².

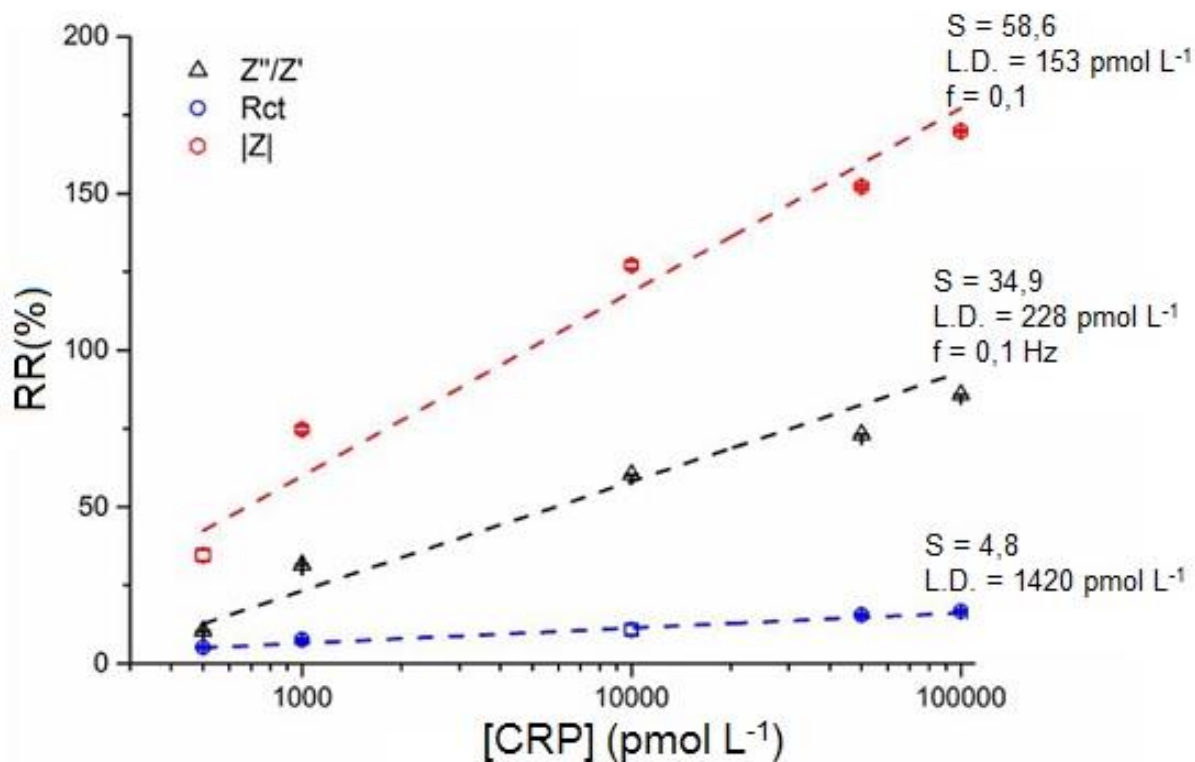


Figura 7.3. Curva analítica otimizada da detecção de CRP sobre eletrodo de ouro modificado com 16-MHDA, obtido usando ensaios faradaicos, mostrando que $|Z|$ e Z''/Z' (ambos com frequência otimizada = 0,1 Hz) mostram grande sensibilidade quando comparados a R_{ct} (12 vezes e 7 vezes, respectivamente) (figura extraída e adaptada de Amol et al Analytical Chemistry, v. 87, n. 2, p. 944-950, 2014).

Em suma, uma vez definidos os parâmetros $ImFs$ de melhor desempenho analítico, o tempo de análise pode ser imensamente reduzido alcançando sensibilidades analíticas e limites de detecção superiores do que aqueles obtidos por análises impedimétricas tradicionais (usando o R_{ct} como sinal transdutor).

7.3.1 Análises de funções de imitância sobre ensaios não-faradaicos para a detecção da CRP.

O ponto mais interessante no uso de métodos impedimétricos não-faradaicos para o monitoramento de biomarcadores é, sem dúvidas, a ausência de *probe* redox nas medidas. Entretanto, é verdade que esta configuração apresenta menor sensibilidade em comparação com a EIE faradaica e a ECE (resultado justamente devido à falta de agentes amplificadores de sinal tais como *probe* redox livres em solução ou confinadas presentes em medidas EIE faradaica e ECE,

respectivamente). Assim, aumentar a sensibilidade de medidas não-faradaicas usando os parâmetros de funções de imitância é de grande valor analítico.

A Figura 7.4 mostra as curvas analíticas construídas pelas *ImFs* mais sensíveis, onde a faixa linear obtida de 0,5 a 100,0 nmol L⁻¹ para *Z''* e *M'/M''*. Note que, embora a sensibilidade alcançada nestas análises seja significativamente menor que aquelas observadas por medidas faradaicas (com *probe* redox em solução), o baixo ruído encontrado nas medidas (desvio padrão do branco) leva a valores de L.D. de 42,1 e 52,4 pmol L⁻¹ para *Z''* e *M'/M''*, respectivamente, os quais são consideravelmente melhores quando comparados a outros resultados descritos na literatura⁷⁴.

Os parâmetros de imitância investigados nas medidas não faradaica, de forma geral, apresentaram os melhores valores de sensibilidade e L.D. nas regiões mais baixas a faixa de frequência amostrada. (0,1 a 0,6 Hz).

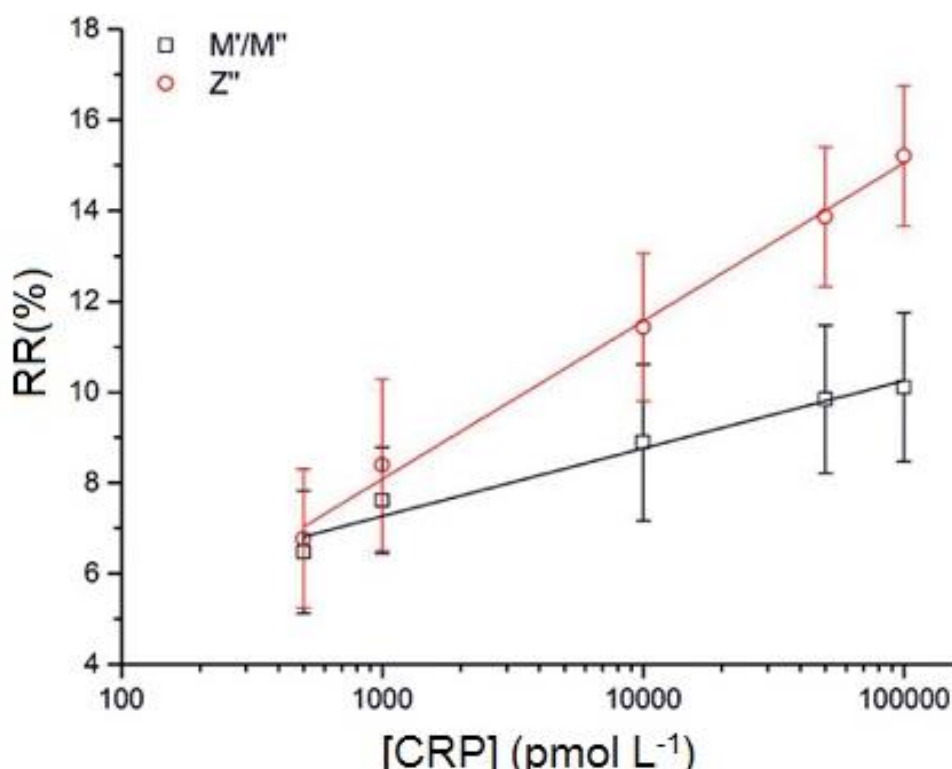


Figura 7.4. a) Curvas analíticas otimizadas de análises não-faradaicas da CRP sobre eletrodos modificados com 16-MHDA mostrando que *Z''* e a razão de *M** (*M'/M''*) sendo a sensibilidade relativa mais elevada encontrada para *Z''* [*S* = 3,4 por cento por (pmol L⁻¹) x 10, *r*² = 0,996] enquanto que *M'/M''* mostrou a valor mais baixo de sensibilidade [*S* = 1,49 por cento por (pmol L⁻¹) x 10, *r*² = 0,978]. O desvio padrão associado para cada ponto foram adquiridos a partir das análises na faixa de frequência 0,05 a 1,0 Hz. b) Um resumo das sensibilidades relativas dos parâmetros de *ImF* em uma detecção não-faradaica da CRP (0,5- 100,0 nmol L⁻¹). Estes dados foram obtidos por meio da média calculada através da faixa otimizada de frequência de 0,1 a 1 Hz. Medidas realizadas em triplicata (figura extraída e adaptada de Amol et al Analytical Chemistry, v. 87, n. 2, p. 944-950, 2014).

7.4 Detecção impedimétrica de *probe* redox confinadas para a proteína CRP.

Conforme destacado na introdução, superfícies moleculares nanoestruturadas contendo centro redox confinado possuem diversos fenômenos associados com o processo de transferência eletrônica entre a superfície do eletrodo e o centro redox. No entanto, até este momento a única forma de caracterização apresentada para este tipo de filme é aplicando a ECE para obtenção do sinal de capacitância redox, C_r (a qual é obtida no $E_{1/2}$) que por sua vez tem a magnitude proporcional à densidade de estados redox ocupados^{14; 61; 138}. Assim, por C_r é possível determinar o nível de energia acumulada na superfície¹³⁸ e, conseqüentemente usá-la para monitorar eventos na interface do eletrodo. Inclusive, o valor do uso C_r como sinal transdutor (mais precisamente $1/C_r$) já foi mostrado nos Capítulos 5 e 6, onde claramente comprovou-se que a capacitância redox tem a mesma eficiência analítica que EIE faradaica, com a adicional vantagem de operar com a *probe* redox, usada para amplificação do sinal analítico, confinada no filme receptivo do sensor^{17; 18; 19}, eliminando desta forma a necessidade de adição da *probe* redox em solução.

A técnica de ECE é análoga a espectroscopia de impedância, portanto é definida como uma função de transferência específica de entrada e saída de sinais de voltagem e corrente e considerando $V(t) = \bar{V} + \tilde{V}e^{j\omega t}$ como sinal de entrada, e a corrente como uma resposta sigmoide de saída $I(t) = \bar{I} + \tilde{I}e^{(j\omega t - \phi)}$. Então, por meio desta relação todos os parâmetros genéricos dependentes da frequência podem ser derivados (exatamente como as análises feitas na subsecção 7.2.1.3), os quais foram denominados previamente como funções de admitância $ImF(\omega)$ ⁶². Os resultados a seguir demonstram a aplicação deste tratamento (contudo explorando uma faixa maior de sub-parâmetros com relação à Subsecção 7.3) para a detecção dos eventos de bioreconhecimento sobre superfícies moleculares nanoestruturadas com *probe* redox confinada, os quais foram devidamente funcionalizados para detecção de Ab-Syn e CRP. O desempenho dos parâmetros $ImFs$ é comparado com a C_r não somente em termos analíticos, mas principalmente em relação ao tempo de aquisição de medidas para detecção de ambos os biomarcadores supracitados.

7.4.1 Análises por capacitância redox (C_r)

A obtenção do valor C_r puro (livre da contribuição não-faradaica ao carregamento interfacial)¹⁵ requer a realização de medidas impedimétricas em uma ampla faixa de frequência em dois potenciais distintos, $E_{1/2}$ e E_{out} , onde as medidas realizadas no ultimo permitem medir a contribuição não-faradaica à capacitância e a subtração desta contribuição nos valores de capacitância obtidos no $E_{1/2}$, permitem determinar a capacitância redox^{17; 18; 19; 20; 21}. Desta forma, os dados adquiridos em ambos $E_{1/2}$ e E_{out} foram usados para calcular um conjunto completo de ImF separadamente, ou seja, sem subtrair os valores medidos no E_{out} dos valores medidos no $E_{1/2}$. Assim a mesma metodologia aplicada na *Subsecção 7.2.1.3* pode ser usada aqui para otimização das condições de análises in função da faixa de frequência e função de imitância ($ImF(\omega)$).

7.4.2 Análise espectral de dados

As funções de imitância complexa (ImF^*) usadas foram impedância(Z^*), capacitância(C^*), módulo (M^*) e admitância (Y^*) com suas relações de fase adquiridas a partir dos ensaios impedimétricos realizados nos $E_{1/2}$ e E_{out} .

Como funções complexas, estas são divididas nos componentes real (ImF') e imaginário (ImF'') e, uma vez calculados estes componentes para todas as $ImFs$, o passo seguinte envolve calcular os respectivos sub-parâmetros tais como módulo absoluto ($|ImF|$), razão (ImF'/ImF'') e a razão inversa (ImF''/ImF'). Adicionalmente, nesta subsecção foi incorporado o inverso das componentes real e imaginária ($1/ImF'$ e $1/ImF''$, por exemplo, $1/C'$ and $1/C''$), assim expandido o número de ImF para vinte e oito parâmetros (Tabela 7.4.1) para cada frequência medida dentro do espectro estudado para os mesmos ensaios usados no cálculo de C_r . Cada um destes vinte e oito parâmetros é uma função sensível às interações de bioreconhecimento ocorridas na interface do eletrodo funcionalizado, e apresentam respectivas regiões de frequências com maior sensibilidade ao analito. Uma vez

realizadas as análises de obtenção da curva padrão, pode-se selecionar a ImF de interesse bem como a região de frequência de maior sensibilidade, a qual pode ser denominada de região otimizada de frequência (conforme melhor explicado a seguir). Este protocolo de análise permite a aquisição das medidas em aproximadamente uma ordem de magnitude mais rápida e, para alguns parâmetros de $ImFs$, substancialmente mais sensível do que o procedimento usando apenas o inverso da capacitância redox ($1/C_r$) (parâmetro usado como referência) como sinal transdutor.

Tabela 7.4.1. Todos os parâmetros de $ImFs$ avaliados na metodologia proposta.

ImF	Z^*	C^*	M^*	Y^*
	Z'	C'	M'	Y'
	Z''	C''	M''	Y''
	$ Z $	$ C $	$ M $	$ Y $
Parâmetro	Z'/Z''	C'/C''	M'/M''	Y'/Y''
	Z''/Z'	C''/C'	M''/M'	Y''/Y'
	$1/Z'$	$1/C'$	$1/M'$	$1/Y'$
	$1/Z''$	$1/C''$	$1/M''$	$1/Y''$

O desempenho analítico de cada ImF foi avaliada em resposta relativa em porcentagem, $RR(\%)$, para cada um dos analitos estudados e ao longo de toda a faixa de frequência aplicada. Lembrando que $RR(\%)$ é definido como:

$$RR_n^\omega(\%) = [(R_n^\omega - R_0^\omega)/R_0^\omega] * 100 \quad (7.5)$$

Onde R_0^ω é o valor inicial de ImF na ausência do analito e R_n^ω o valor de ImF após a incubação em uma concentração específica do analito (n), na mesma frequência angular ω . Desta forma, pode ser determinada a frequência ótima, bem como a região de frequência otimizada (de melhor sensibilidade analítica para uma dada ImF), onde o RR será máximo através das concentrações amostradas. O algoritmo MATLAB R2013b foi usado para converter os dados originais da função de

transferência elétrica nas demais funções de imitância e, adicionalmente, para plotar estes valores em função da faixa de concentração dos analitos. Em seguida, somente os parâmetros de ImF que apresentaram comportamento monotônico e linear ($r^2 > 0,95$) foram usados para calcular os coeficientes de sensibilidade e o L.D. enquanto que os demais foram descartados. O L.D. Por fim, as melhores funções ImF foram comparadas ao $(1/C_r)$ em termos de eficiência analítica.

Toda a eficiência e aplicabilidade deste protocolo foram avaliadas na detecção do anti-synucleína e da proteína C-reativa. A resposta de cada superfície funcionalizada (para Ab-syn e CRP) usando ImF como sinal transdutor foi estudada em ambos os potenciais ($E_{1/2}$ e E_{out}) usados na aquisição da capacitância redox. Nas medidas realizadas no E_{out} a maioria dos parâmetros $ImFs$ apresentou linearidade inferior a 0,9 (r^2) em todas as frequências estudadas, tornando-os inúteis do ponto de vista analítico. Já os parâmetros $ImFs$ com r^2 aceitáveis (superiores a 0,95) mostraram sensibilidades inferiores a 5 per cento por $[(\text{pmol L}^{-1}) \times 10]$, tal valor é considerado pequeno quando comparado aos obtidos no $E_{1/2}$, os quais ultrapassaram 100 per cento por $[(\text{pmol L}^{-1}) \times 10]$ (ver Tabelas 7.4.2 e 7.4.3 para resultados obtidos no E_{out} e no $E_{1/2}$, respectivamente).

A razão desta superioridade analítica para medidas realizadas no $E_{1/2}$ sobre as medidas realizadas no E_{out} (ver Figuras 7.4.1 e 7.4.2) está principalmente associada à alta transferência de carga ocorrida, no potencial de meia onda, entre as unidades redox e a superfície metálica. Tal processo causa um largo acúmulo de carga de natureza eletroquímica que aumenta enormemente capacitância do sistema (oxidação/redução da *probe* redox ferroceno/ferrocênio. Fc/Fc^+), no entanto, sendo o termo quântico dominante^{14; 56; 61; 138} e, de forma geral, todo e quaisquer fenômenos físico relacionados ao fluxo de elétrons entre unidade redox e a superfície metálica são altamente sensíveis a eventos de imobilização/reação química ocorridos na interface do eletrodo^{61; 138}.

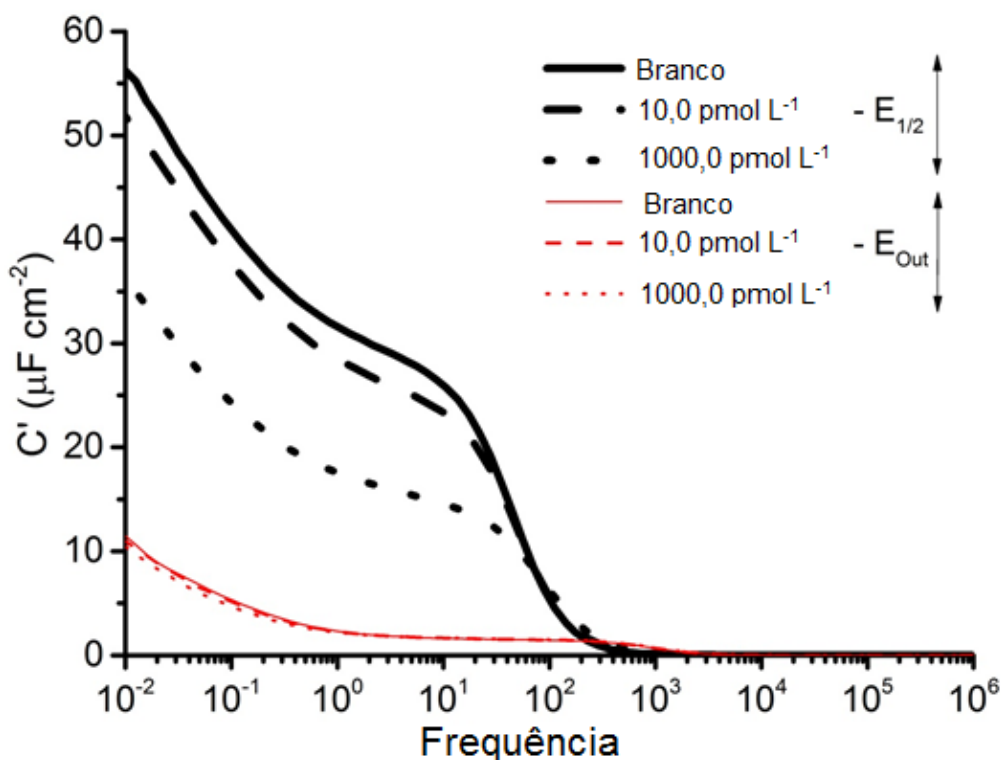


Figura 7.4.1. Gráfico capacitivo de Bode mostrando a variação no sinal de capacitância real em ambos potenciais $E_{1/2}$ (gráficos largos em preto) e E_{out} (gráficos finos em vermelho) para uma superfície molecular nanoestruturada contendo probe redox confinada e receptiva para a CRP. As concentrações representadas são 10 e 1000 pmol L^{-1} . Para as medidas realizadas no $E_{1/2}$, a variação em C' apresentou sensibilidade máxima foi encontrada ao redor de 4,0 Hz. Entretanto, para medidas similares realizadas no E_{out} , a variação de sinal é claramente insignificante como ferramenta analítica.

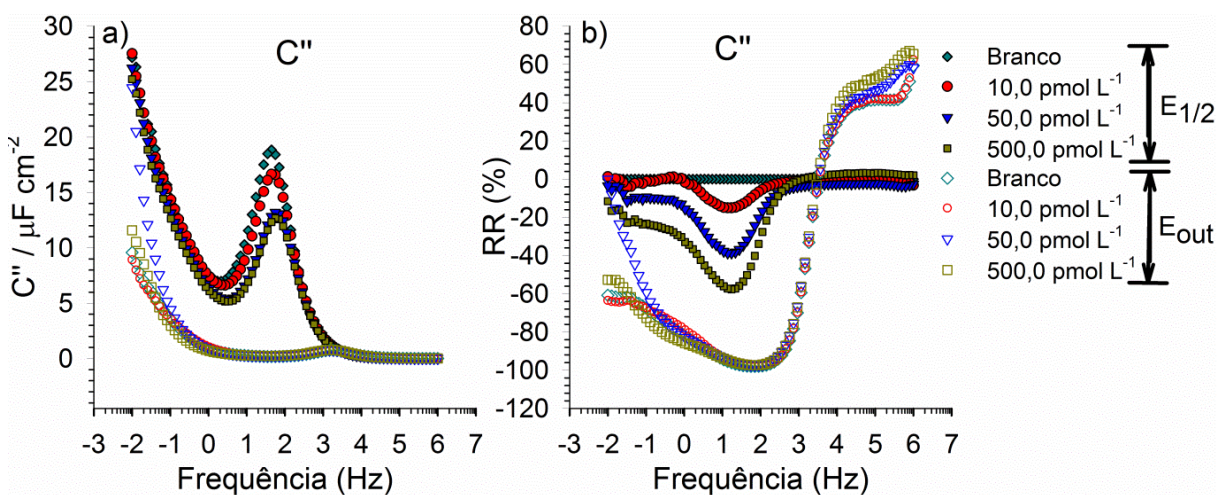


Figura 7.4.2. Gráfico capacitivo de Bode mostrando a resposta para a capacitância imaginária expressa em Faraday e RR (%) em função da frequência em escala logarítmica (representada apenas pelos expoentes na base 10). Figura (a) e (b), respectivamente, na detecção de CRP usando superfícies moleculares nanoestruturadas com probe redox confinada. O sinal "redox" foi medido no potencial de meia onda do ferroceno ($\sim 0,45$ vs Ag|AgCl) e a contribuição não-faradaica foi medida em 0,1 V vs Ag|AgCl .

Após o cálculo da resposta relativa em porcentagem, RR(%), para todas as funções complexas ImF (e sub-paramêtros) (Figura 7.4.3) determinadas a partir das medidas realizadas no $E_{1/2}$, é relativamente fácil determinar a frequência otimizada de amostragem onde cada parâmetro apresenta à máxima variação de RR, bem como o espectro otimizado de faixa de frequência (região do espectro de frequência onde à sensibilidade é maior e aproximadamente constante para cada parâmetro, conforme destacado na Figura 7.4.4a). Vale notar que algumas funções de imitância são relacionadas matematicamente e assim fornecem respostas equivalentes quando analisadas por RR (Figura 7.4.5).

Tabela 7.4.2. Parâmetros analíticos das ImF para detecção de CRP medidos no E_{out} . Os dados representados aqui são referentes a medidas em triplicata. A sensibilidade e o L.D. foram calculados pelo ajuste linear da média de cada resposta relativa, RR(%).

ImF	Frequência otimizada (Hz)	r^2	Sensibilidade (% conc ⁻¹)	L.D. (pmol L ⁻¹)
Z'	0,0405	0,896313	9,238754	29,99668
Z''	0,0321	0,981826	8,624359	0,004449
Z''/Z'	0,1641	0,968624	3,581835	0,000153
$ Z $	0,0405	0,915013	12,02634	39,66863
Y'	0,0321	0,977134	-3,55722	6,33E-05
Y''	38218,5	0,691202	10,54976	34,79421
Y''/Y'	0,1641	0,968624	3,581835	0,000153
$ Y $	38218,5	0,684014	10,77265	37,98893
C'	0,0321	0,854773	9,0355	227,403
C''	0,0321	0,977134	-3,55722	6,33E-05
C''/C'	0,2616	0,916173	30,2712	277,288
$ C $	0,0321	0,860899	9,315983	227,8487
M'	0,0321	0,981826	8,624359	0,004449
M''	17,3976	0,810442	4,21123	21,0138
M''/M'	0,1641	0,968624	3,581835	0,000153
$ M $	0,0321	0,893395	12,51868	36,2418

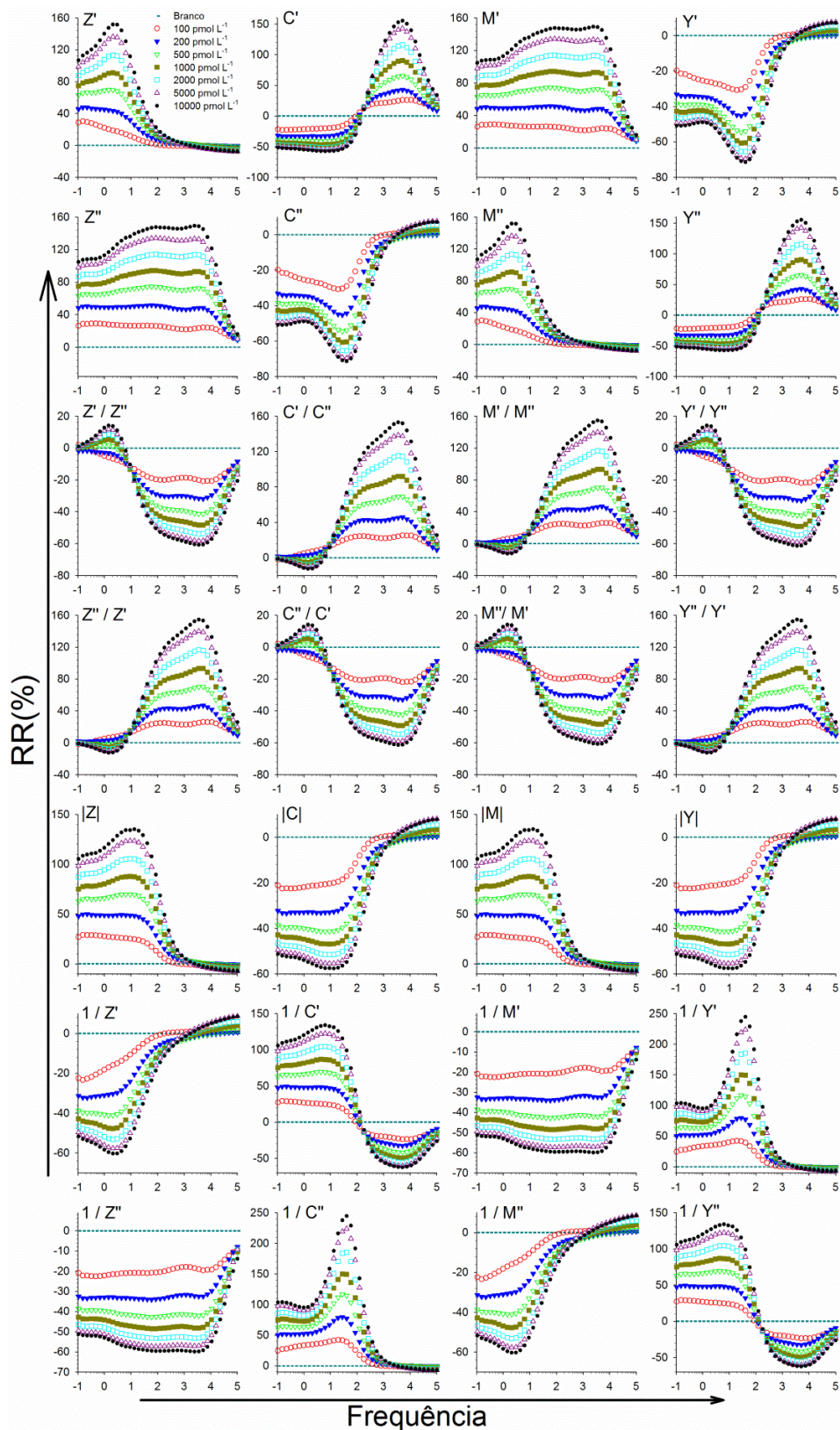


Figura 7.4.3. Resposta relativa em porcentagem, RR(%) em função da frequência em escala logaritmo (representada apenas pelos expoentes na base 10), para os 28 parâmetros analisados através da faixa de frequência estudada de 0,05 a 100 kHz na faixa de concentração de CRP usada (10^2 a 10^4 pmol L⁻¹). O filme receptivo foi construído sobre uma monocamada mista de 11-FcC e 16-MHDA. Conforme C*, M*, e Y* são fasorialmente derivados a partir de Z*, é evidente que diversas funções apresentem resposta similar (Z'' e M', M'' e Z', por exemplo).

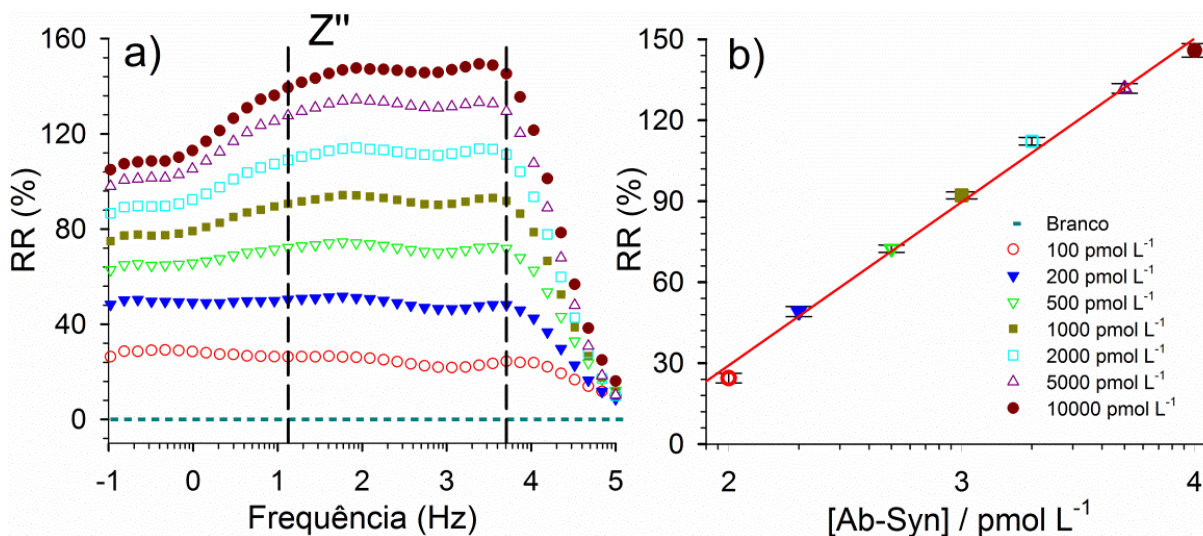


Figura 7.4.4. a) Gráfico de Bode para variação da resposta relativa, RR(%), para Z'' em função da frequência em escala logarítmica (representada apenas pelos expoentes na base 10) para ensaios de detecção de Ab-syn sobre superfícies moleculares nanoestruturadas contendo probe redox confinada (construídas a partir de monocamadas mistas composta de 16-MHDA/11FcC imobilizadas sobre eletrodos de ouro). A Figura (a) mostra que Z'' tem sensibilidade relativa otimizada similar entre a faixa de frequência de 13,0 a 5000,0 Hz (linhas tracejadas em preto) (Sensibilidade de $100,1 \pm 4,9$ contra a sensibilidade de 104,7, encontrada em 2423,0 Hz, $r^2 = 0,980 \pm 0,009$). b) Curva analítica obtida por Z'' para detecção redox do Ab-syn (10^2 a 10^4 pmol L⁻¹). A curva analítica foi construída agrupando os valores de cada concentração nas diferentes frequências dentro de tal faixa (13,0 – 5000,0 Hz).

Observando-se a resposta de $1/C''$, como modelo representativo das funções de imitância, utilizado para detecção de Ab-syn (Figura 7.4.6), é evidente que a magnitude de RR varia por toda a faixa de frequência estudada com alta variação nas regiões de baixa frequência (10 a 100 Hz). Assim, a média dos valores de RR foi calculada para três repetições de medidas sobre o mesmo eletrodo funcionalizado através da faixa de concentração estudada (10^2 a 10^4 pmol L⁻¹ para Ab-syn e 10 a 10^5 pmol L⁻¹ para CRP). Desta forma, nos casos em que o r^2 foi superior a 0,95, o parâmetro ImF foi usado para determinar a sensibilidade (definida como coeficiente angular da reta) na região de frequência de melhor resposta para cada um dos vinte e oito parâmetros. A Tabela 7.4.3 apresenta os parâmetros mais sensíveis para detecção de Ab-syn e CRP.

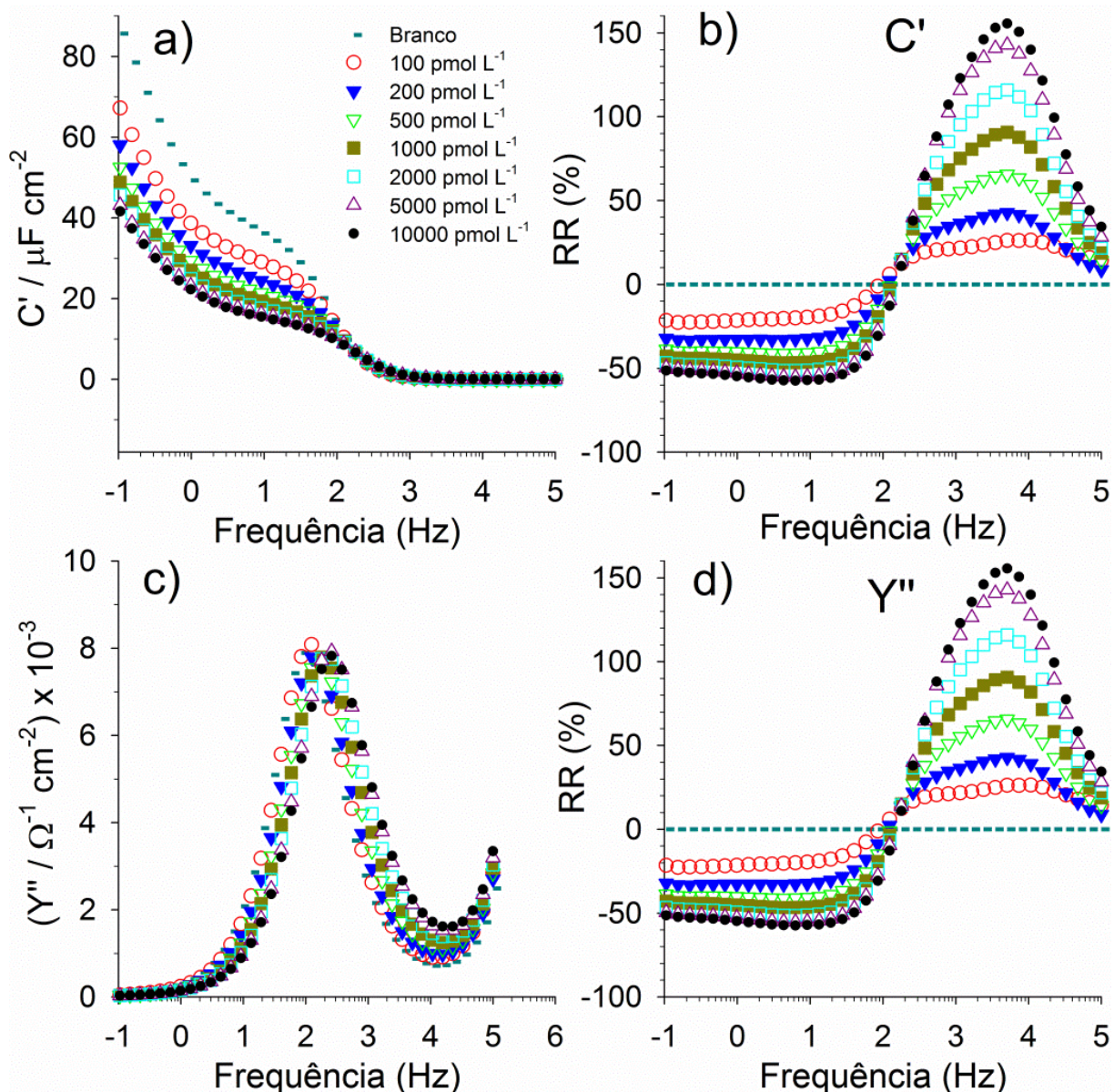


Figura 7.4.5 Gráfico de Bode mostra a resposta dos parâmetros de ImF C' e Y'' em termos de valores absolutos e $RR(\%)$ para a detecção do anticorpo da α -synucleína com concentrações abrangendo a faixa de 10^2 a 10^4 pmol L^{-1} sobre uma camada mista de 16-MHDA/11-FcC. a) e b) são os gráficos de Bode para a capacitância real na resposta absoluta e $RR(\%)$, respectivamente. Enquanto c) e d) mostram a mesma análise, mas para a imitância imaginária (Y'') derivada a partir de C' . Como está claro a se notar, a função derivada (Y'' usada como um modelo) mostra exatamente o mesmo comportamento e valores da ImF original quando avaliada em termos de $RR(\%)$.

Tabela 7.4.3. Parâmetros analíticos ImF otimizados para detecção de ab-syn e CRP e medidos no $E_{1/2}$ sobre suas respectivas superfícies moleculares nanoestruturadas com *probe* redox confinada e receptivas. Os dados representados aqui são referentes a medidas em triplicata. A sensibilidade e o L.D. foram calculados pelo ajuste linear da média de cada resposta relativa, RR(%).

Deteção de Ab-syn				
ImF	Frequência otimizada	r^2	Sensibilidade (% conc ⁻¹)	L.D. (pmol L ⁻¹)
Z'	0,1526	0,996 ± 0,002	105,3 ± 1,6	105,7 ± 2,2
Z''	2423	0,980 ± 0,009	104,8 ± 4,3	143,6 ± 6,5
C'	5917,6	0,989 ± 0,011	105,7 ± 2,0	146,8 ± 6,1
$1/C''$	40,47	0,998 ± 0,002	159,1 ± 2,7	121,1 ± 4,5
C'/C''	3514,9	0,988 ± 0,009	106,3 ± 2,4	118,9 ± 3,1
$1/C_r$	-	0,998 ± 0,003	84,0 ± 2,5	143,5 ± 9,7
Deteção de CRP				
Z'	0,41	0,977 ± 0,01	41,7 ± 2,1	0,48 ± 0,2
Z''	2423	0,978 ± 0,02	31,2 ± 3,1	4,9 ± 2,2
C'	2939	0,982 ± 0,01	38,7 ± 1,8	9,5 ± 2,8
$1/C''$	21,96	0,997 ± 0,001	70,8 ± 1,6	7,4 ± 3,1
C'/C''	1844	0,986 ± 0,012	37,6 ± 0,9	3,4 ± 1,3
$1/C_r$	-	0,994 ± 0,002	30,4 ± 0,7	5,4 ± 1,6

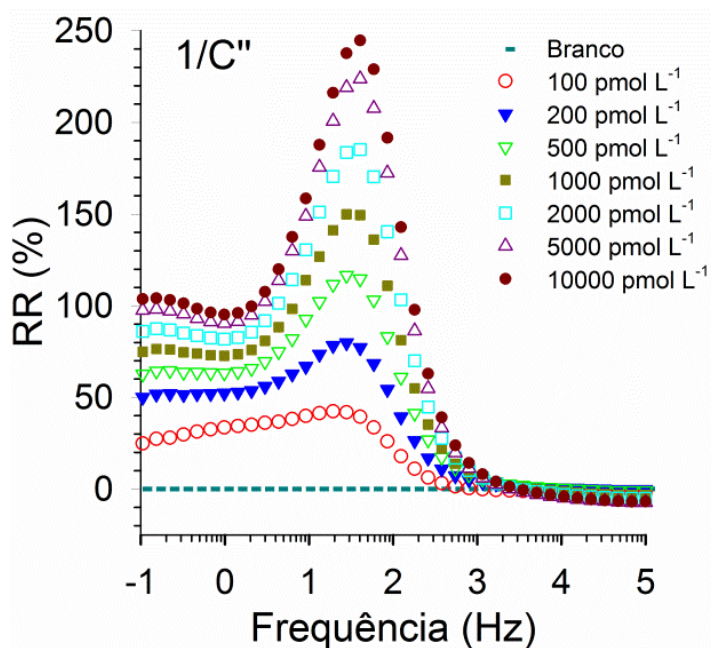


Figure 7.4.6. Um típico exemplo mostrando a variação na resposta relativa, RR(%), do parâmetro $1/C''$ de uma análise de medidas impedimétricas realizadas sobre uma superfície receptiva a Ab-syn com *probe* redox confinada. Foi usada faixa de concentração de Ab-syn entre 10^2 a 10^4 pmo L⁻¹. A resposta é máxima por volta de 40 Hz, indicando assim a frequência analítica optmizada.

Na metodologia de detecção de ambos os analitos, o parâmetro $1/C''$ mostrou a melhor sensibilidade entre todos os *ImFs* analisados. Vale notar que o principal objetivo deste trabalho é avaliar o desempenho analítico de cada *ImFs* e o significado físico de cada parâmetro será discutido em trabalhos futuros, mas de forma simplificada podemos definir $1/\omega C'' = 1/G$ onde G é a condutância ressonante do processo de transferência eletrônica presente na interface deste sistema, assim, $1/C'' = \omega/G$).

Os melhores parâmetros para detecção do Ab-syn, na faixa de concentração de 10^2 a 10^4 pmol L⁻¹, foram $1/C''$, C'/C'' , C' , Z' e Z'' (tendência esta constante em três diferentes eletrodos preparados igualmente) com a sensibilidade de $159,1 \pm 2,7$, $106,2 \pm 2,4$, $105,7 \pm 2,0$, $105,3 \pm 1,6$ e $104,8 \pm 4,3$ per cento por [(pmol L⁻¹) x 10], respectivamente. Os L.D. correspondentes a estes parâmetros $121,1 \pm 2,7$; $118,9 \pm 3,1$; $146,8 \pm 6,1$; $105,7 \pm 2,2$ e $143,6 \pm 6,5$ pmol L⁻¹, respectivamente (Tabela 7.4.3). Em critérios analíticos, estes resultados podem ser considerados melhores do que aqueles obtidos por $1/C_r$ {S = 84,0 per cento por [(pmol L⁻¹) x 10] e L.D. $143,5 \pm 9,7$ pmol L⁻¹} (Figura 7.4.7a) e demonstram que as *ImFs* $1/C''$, C'/C'' , C' , Z' e Z'' são potencialmente úteis para aplicação na detecção de synucleína quando comparados a métodos publicados previamente⁷⁷.

A mesma metodologia quando aplicada a detecção da CRP mostrou uma faixa linear de 10^1 a 10^5 pmol L⁻¹ ($0,001$ to $10,0$ mg L⁻¹) a qual abrange toda a faixa de concentração clinicamente relevante para este biomarcador (entre $1,0$ – $3,0$ mg L⁻¹). Similarmente aos resultados obtidos na detecção de Ab-syn, $1/C''$ foi o parâmetro mais sensível, seguido dos parâmetros Z' , C' , C'/C'' e Z'' (tendência constante em três diferentes eletrodos preparados equivalentemente) onde as sensibilidades e os limites de detecção encontrados foram de $70,8 \pm 1,6$; $41,7 \pm 2,1$; $38,7 \pm 1,8$; $37,6 \pm 0,9$ e $31,2 \pm 3,1$ per cento por (pmol L⁻¹) x 10 e $7,4 \pm 3,1$; $0,48 \pm 0,2$; $9,5 \pm 2,8$; $3,4 \pm 1,3$ e $4,9 \pm 2,2$ pmol L⁻¹, respectivamente (Tabela 7.4.3). Estes *ImFs* mostraram melhor desempenho que $1/C_r$ na capacidade de detecção de CRP sobre os mesmos superfícies moleculares nanoestruturadas com probe redox confinada {S = $30,4 \pm 0,7$ per cento por [(pmol L⁻¹) x 10] e L.D. de $5,4 \pm 1,6$ pmol L⁻¹} (Figura 7.4.7b) e representam uma forma de análise altamente competitiva aos métodos *label based* aplicados à detecção desta proteína¹³⁹. Além disso, a faixa linear obtida com estas análises otimizadas atende perfeitamente bem a faixa considerada clinicamente útil

pela associação americana do coração (AHA) e o centro para controle de doenças dos Estados Unidos da América¹⁴⁰.

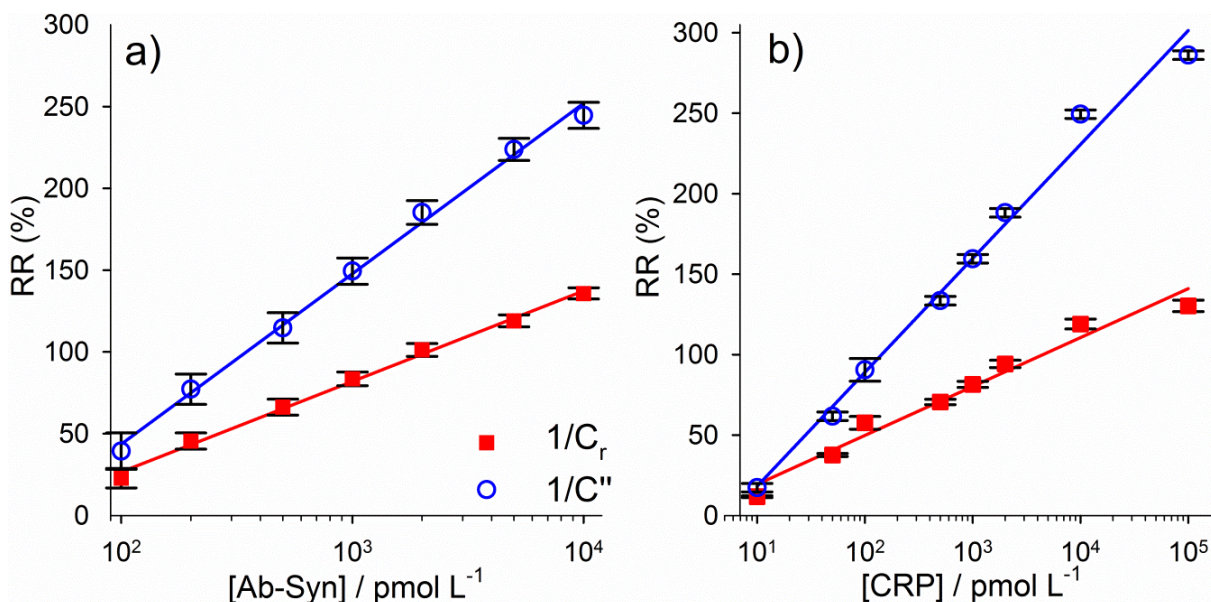


Figura 7.4.7. Comparação de resposta analítica para superfícies moleculares nanoestruturadas contendo *probe* redox confinada e receptiva construídas sobre uma SAM mista composta de 16-MHDA/11FcC, os quais foram apropriadamente funcionalizados para detecção de ab-syn (a) e CRP (b). Em ambas as análises o ImF de maior sensibilidade foi o $1/C''$ e as frequências analíticas otimizadas para (a) e (b) foram de 40,47 Hz e 21,06 Hz, respectivamente. As repostas analíticas nestes casos se encontram comparadas a resposta obtida para $1/C_r$ em cada caso. As medidas foram realizadas em triplicata e todas as curvas analíticas aqui demonstradas apresentaram $r^2 > 0,996$.

Ao realizar uma triagem investigatória em todos os dados adquiridos, fica claro que existe para cada ImF uma faixa de frequência (denominada de faixa espectral otimizada) ao redor da frequência otimizada, onde a sensibilidade das análises é constante. A Figura 7.4.4a, por exemplo, mostra os resultados para Z'' (usado como modelo) em que a sensibilidade para Ab-syn é constante na faixa de frequência de 13,0 a 5000,0 Hz (com 15 diferentes frequências estudadas dentro desta faixa). O valor médio das sensibilidades considerando-se o valor de S encontrado em todas as 15 diferentes frequências foi de $100,1 \pm 4,9$, valor este similar a melhor sensibilidade encontrada na frequência de 2423,0 Hz ($S = 104,7$) (Figura 7.4.4a). Em termos práticos, esta similaridade da sensibilidade ao longo destas 15 diferentes frequências medidas, significa que as medidas impedimétricas podem ser realizadas dentro desta faixa otimizada de frequência mantendo-se o mesmo desempenho analítico. A Figura 7.4.4b, ilustra bem esta paridade na sensibilidade ao longo da faixa otimizada de frequência. Nesta figura esta demonstrado a $RR(\%)$ média (e

desvio padrão) para cada concentração de analito estudado. Esta resposta média e o desvio padrão foram calculados considerando a RR(%) medida em cada uma das 15 diferentes dentro da faixa otimizada (13 a 5000 Hz) como sendo “replicatas” da medida em cada concentração. É fácil notar que a variação do sinal é pequena para cada concentração do analito independente da frequência usada dentro da faixa mencionada (desvio padrão relativo inferiores a 2,5% - indicados pelas barras de desvio padrão na Figura 7.4.4b) e, adicionalmente esta variação de média do sinal apresenta aumento linear em função ao log da concentração do analito.

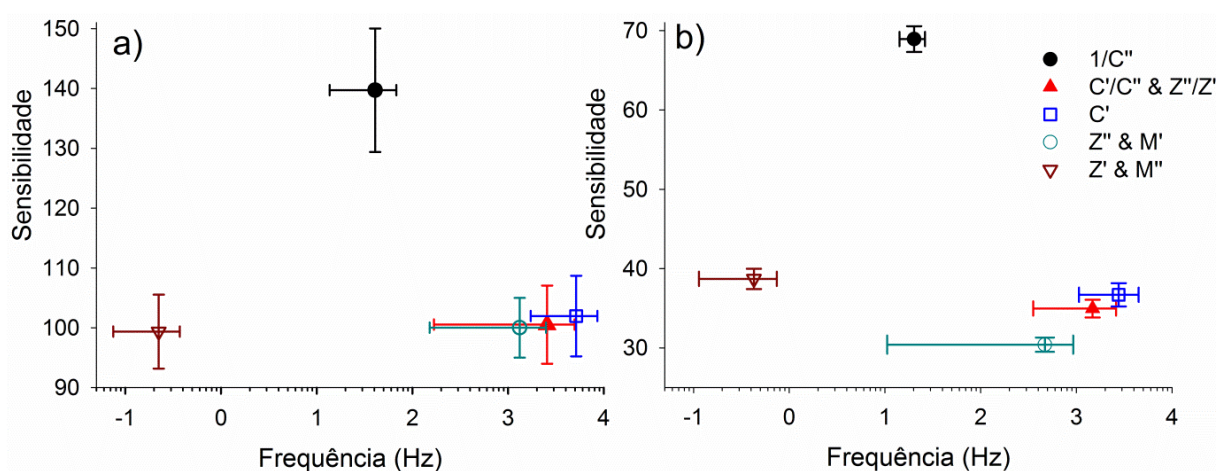


Figura 7.4.8. Comparativo entre a sensibilidade dos parâmetros de ImF para detecção de Ab-syn(a) e CRP(b), mostrando a existência de uma de frequência em que a sensibilidade é equivalente, conforme indicado pelas barras de erros no eixo da frequência, no qual as sensibilidades são comparáveis ao valor otimizado. Está evidente que os parâmetros como $1/C''$ e Z' são os mais sensíveis e encontram-se confinados na faixa 0,1 a 100,0 Hz.

Este cálculo da variação da sensibilidade média para outros parâmetros de $ImFs$, dentro da faixa de frequência otimizada, está demonstrado na Figura 7.4.8. Esta análise deixa claro que para os parâmetros mais sensíveis ($1/C''$ e Z'), as sensibilidades otimizada encontram-se limitada a faixa de frequência entre 0,1 a 100,0 Hz para ambos os analitos estudados. No entanto, em altas frequências há também $ImFs$ que exibiram excelentes sensibilidades como, por exemplo, os parâmetros C'/C'' , Z'' e C' para os quais as melhores respostas analíticas foram encontradas na faixa de frequência entre 10^3 a 10^4 Hz (aproximadamente), onde a aquisição de dados requer um tempo de medida ainda menor. Na prática, as análises que inicialmente eram feitas na faixa de frequência 0,01 Hz a 1 MHz podem ser reduzidas a faixas menores, como por exemplo de 10,0 a 100 Hz ou entre 10^3 a 10^4 e assim, podendo reduzir o tempo de aquisição de dados de 90 minutos a

menos de 3 minutos. A Figura 7.4.9 ilustra o conceito comparando o uso de $1/C''$ e $1/C_r$, como sinais transdutores, na construção da curva analítica onde o uso do inverso da capacitância imaginária permite realizar todas as medidas de forma mais rápida e sensível. Desta forma, com $1/C''$ seriam necessários aproximadamente 70 a 80 minutos para aquisição de todos os dados referentes as concentrações estudadas na detecção de Ab-syn e CRP, respectivamente. Enquanto que usando o inverso da capacitância redox a aquisição dos dados para os mesmos ensaios, gastaria aproximadamente 720 para a detecção de Ab-syn e por volta 810 minutos para a CRP.

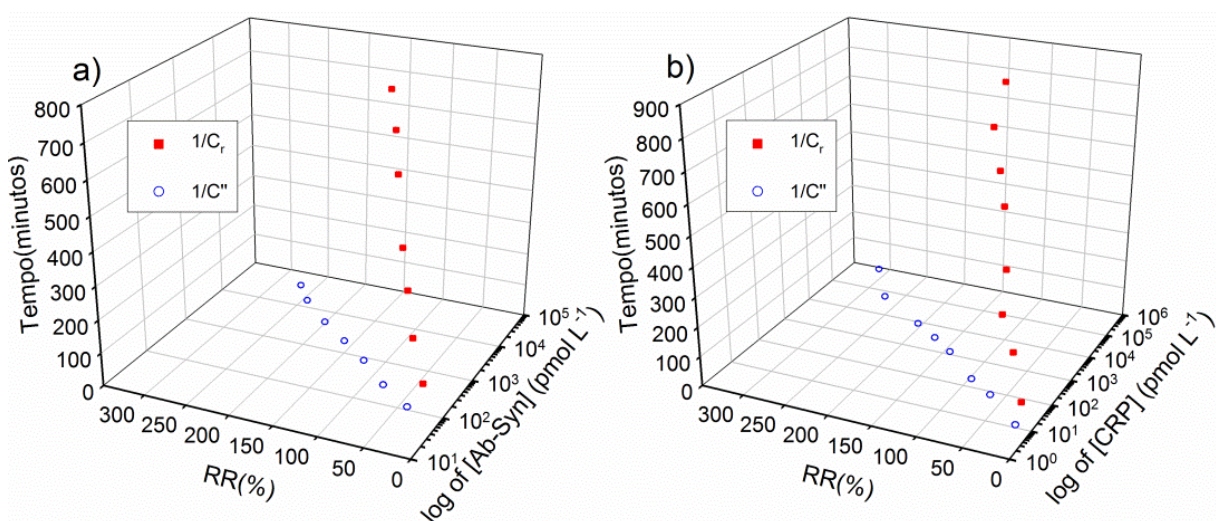


Figura 7.4.9. Representação em três dimensões curvas analíticas mostradas na Figura 7.4.8 para detecção de anti-synucleína e CRP (a e b, respectivamente). Entretanto, também considerando o tempo necessário para realizar as medidas referentes aos ensaios de todas as concentrações estudadas (7 e 8 concentrações para to anti-syn e CRP, respectivamente). O tempo necessário para as medidas foi aproximadamente de 70 minutos usando $1/C''$ e mais de 720 minutos por $1/C_r$, enquanto que no mesmo ensaio para a CRP o tempo consumido foi de 80 minutos usando $1/C''$ e mais de 810 minutos usando $1/C_r$.

Em resumo, uma vez que uma região de frequência otimizada é conhecida para um dado analito e interface, o tempo de análises e aquisição de dados é reduzido enormemente e, adicionalmente, obtendo-se ensaios mais sensíveis e valores de L.D. que são equivalentes ou melhores do que aqueles obtidos usando a C_r como sinal analítico.

7.5 Conclusão

Métodos EIE e ECE são capazes de monitorar características de condutividade, dielétrica ou capacidade de carregamento na interface de eletrodos/eletrólitos. Quando estas superfícies são apropriadamente funcionalizadas com receptores biológicos obtêm-se poderosas ferramentas de biosensoriamento. Porém, tanto a EIE quanto a ECE apresentam limitações quanto ao tempo de aquisição e tratamento de dados. Neste capítulo foi introduzido o conceito de funções de imitância visando justamente melhorar as características de ensaios ao mostrar que parâmetros ImF s respondem diferentemente a mesma interação de receptor/analito. Assim, ficou claro que os parâmetros ImF s em qualquer tipo de abordagem (EIE faradaica, EIE não-faradaica e ECE) apresentam sensibilidade analítica em regiões particulares de frequência com maior sensibilidade e em menor tempo do que as análises tradicionais. A aplicabilidade da abordagem ImF foi avaliada com a detecção de biomarcadores clinicamente importantes como a CRP, usada como analito nas três metodologias combinadas a ImF e a sinucleína, detectada apenas via a abordagem de ECE combinada a ImF . Contudo, ficou claro que as três abordagens aqui apresentadas combinadas com a ImF apresentam vantagens em termos de sensibilidade e praticabilidade.

8 Conclusões gerais

A espectroscopia de capacitância eletroquímica (ECE) sem dúvida é uma poderosa metodologia de monitoramento de mudanças interfaciais sobre superfícies moleculares nanoestruturadas com *probe* redox confinada resultando em ensaios sensoriais altamente sensíveis e *label free*. Em um primeiro momento esta metodologia eletroquímica foi desenvolvida como técnica de obtenção de uma grandeza de significado físico associado ao nível de estados ocupados dos centros redox presentes em superfícies moleculares nanoestruturadas imobilizados sobre a superfície de um eletrodo. Esta grandeza é denominada de capacitância redox a qual seu inverso, $1/C_r$, é de grande utilidade analítica. Com o objetivo de melhorar a sensibilidade, linearidade e L.D. de métodos baseados em superfícies receptivas com *probe* redox confinada, foi aplicado nas análises aqui descritas o conceito de funções de imitância (ImF). Assim, explorando as funções de fase das $ImFs$, através dos espectros adotados de frequência, os resultados mostraram ser possível ajustar a realização das medidas a faixas menores de frequência e ao mesmo tempo aumentar a sensibilidade das análises com respeito ao sinal analítico previamente usado ($1/C_r$). Assim, conseqüentemente, reduzindo o tempo dispendido na aquisição de dados de forma significativa e ainda mais sensível. Por fim, estes resultados mostram que esta metodologia, uma vez apropriadamente otimizada, oferece potencialmente meios de desenvolvimento de sistemas multiplexados, baseados em interfaces com *probe* redox confinada que são perfeitamente aplicáveis a análises de grande montante de dados, conforme é necessário em laboratórios de grande demanda de amostras ou ainda como ferramenta de auxílio em outras áreas de pesquisa como, por exemplo, a proteômica.

Referências

- 1 ANDERSON, N. L.; ANDERSON, N. G. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. **Electrophoresis**, v. 19, n. 11, p. 1853-1861, Aug. 1998.
- 2 LEE, J. W.; FIGEYS, D.; VASILESCU, J. Biomarker assay translation from discovery to clinical studies in cancer drug development: quantification of emerging protein biomarkers. **Advances in Cancer Research**, v. 96, p. 269-298, Dec. 2006.
- 3 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, May 2010.
- 4 JOHNSON, A. **Sensitive and specific label-free detection of clinical biomarkers**. 2011. 62 f. Thesis (Part II) - Honours School of Chemistry, University of Oxford, Oxford, 2011.
- 5 CHIKAE, M. et al. Amyloid- β detection with saccharide immobilized gold nanoparticle on carbon electrode. **Bioelectrochemistry**, v. 74, n. 1, p. 118-123, Nov. 2008.
- 6 KANG, D.-Y. et al. Ultra-sensitive immunosensor for β -amyloid (1–42) using scanning tunneling microscopy-based electrical detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 5, p. 1431-1436, Jan. 2009.
- 7 YANAMANDRA, K. et al. α -Synuclein reactive antibodies as diagnostic biomarkers in blood sera of Parkinson's disease patients. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, Apr. 2011. doi:10.1371/journal.pone.0018513
- 8 KIM, N.; KIM, D.-K.; CHO, Y.-J. Development of indirect-competitive quartz crystal microbalance immunosensor for C-reactive protein. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 143, n. 1, p. 444-448, Dec. 2009.
- 9 AHMANN, F. R.; SCHIFMAN, R.B. Prospective comparison between serum monoclonal prostate specific antigen and acid phosphatase measurements in metastatic prostatic cancer. **The Journal of Urology**, v. 137, n. 3, p. 431-434, Mar. 1987.
- 10 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, Feb. 2010.
- 11 EVANS, D. et al. Electrical protein detection in cell lysates using high-density peptide-aptamer microarrays. **Journal of Biology**, v. 7, n. 1, p. 1-11, Jan. 2008.
- 12 PESQUERO, N. C. et al. Real-time monitoring and kinetic parameter estimation of the affinity interaction of jArtinM and rArtinM with peroxidase glycoprotein by the electrogravimetric technique. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 1, p. 36-42, Sept. 2010.

- 13 RAJESH et al. Electrochemical impedance immunosensor for the detection of cardiac biomarker Myoglobin (Mb) in aqueous solution. **Thin Solid Films**, v. 519, n. 3, p. 1167-1170, Nov. 2010.
- 14 BUENO, P. R.; MIZZON, G.; DAVIS, J. J. Capacitance spectroscopy: a versatile approach to resolving the redox density of states and kinetics in redox-active self-assembled monolayers. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 30, p. 8822-8829, Aug. 2012.
- 15 GÓES, M. S. et al. A dielectric model of self-assembled monolayer interfaces by capacitive spectroscopy. **Langmuir**, v. 28, n. 25, p. 9689-9699, June 2012.
- 16 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.
- 17 FERNANDES, F. C. B. et al. Label free redox capacitive biosensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 50, n. 15, p. 437-440, July 2013.
- 18 FERNANDES, F. C. B. et al. Comparing label free electrochemical impedimetric and capacitive biosensing architectures. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 57, n. 15, p. 96-102, Jan. 2014.
- 19 LEHR, J. et al. Label-free capacitive diagnostics: exploiting local redox probe state occupancy. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 5, p. 2559-2564, Feb. 2014.
- 20 SANTOS, A. et al. Impedance-derived electrochemical capacitance spectroscopy for the evaluation of lectin-glycoprotein binding affinity. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 62, n. 15, p. 102-105, Dec. 2014.
- 21 SANTOS, A. et al. Redox-tagged peptide for capacitive diagnostic assays. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 68, n. 15, p. 281-287, June 2015.
- 22 VESTERGAARD, M. D. et al. A rapid label-free electrochemical detection and kinetic study of alzheimer's amyloid beta aggregation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 34, p. 11892-11893, Aug. 2005.
- 23 La BELLE, J. T. et al. A cytokine immunosensor for multiple sclerosis detection based upon label-free electrochemical impedance spectroscopy. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, n. 3, p. 428-431, Oct. 2007.
- 24 ULMAN, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 4, p. 1533-1554, Jan. 1996.
- 25 O'SHANNESY, D. J.; BRIGHAM-BURKE, M.; PECK, K. Immobilization chemistries suitable for use in the BIAcore surface plasmon resonance detector. **Analytical Biochemistry**, v. 205, n. 1, p. 132-136, Aug. 1992.
- 26 SKLÁDAL, P. Advances in electrochemical immunosensors. **Electroanalysis**, v. 9, n. 10, p. 737-745, Apr. 1997.

- 27 GHINDILIS, A. L. et al. Immunosensors: electrochemical sensing and other engineering approaches. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 13, n. 1, p. 113-131, Jan. 1998.
- 28 KHARITONOV, A. B. et al. Probing of bioaffinity interactions at interfaces using impedance spectroscopy and chronopotentiometry. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 487, n. 2, p. 133-141, June 2000.
- 29 JOSEPH, W. DNA biosensors based on Peptide Nucleic Acid (PNA) recognition layers. A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 13, n. 7/8, p. 757-762, Oct. 1998.
- 30 YANG, M.; McGOVERN, M. E.; THOMPSON, M. Genosensor technology and the detection of interfacial nucleic acid chemistry. **Analytica Chimica Acta**, v. 346, n. 3, p. 259-275, July 1997.
- 31 CAI, H.; LEE, T. M.-H.; HSING, I. M. Label-free protein recognition using an aptamer-based impedance measurement assay. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 114, n. 1, p. 433-437, Mar. 2006.
- 32 ACHTNICH, U. R.; TIEFENAUER, L. X.; ANDRES, R. Y. Covalent immobilization of avidin on glassy carbon electrodes as the basis for multivalent biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 7, n. 4, p. 279-290, Nov. 1992.
- 33 NOWALL, W. B.; DONTA, N.; KUHR, W. G. Electron transfer kinetics at a biotin/avidin patterned glassy carbon electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 13, n. 11, p. 1237-1244, Nov. 1998.
- 34 PEDROSO, M. M. et al. 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, Feb. 2008.
- 35 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: RSC Pub., 2009. Chap. 7, p.193-224.
- 36 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 3rd ed. New York: W. H. Freeman, 2002. 930 p.
- 37 STEAD, M. A. et al. Structure of the wild-type human BCL6 POZ domain. **Acta Crystallographica Section F**, v. 64, n. 12, p. 1101-1104, Dec. 2008.
- 38 PAREKH, S.; PRIVE, G.; MELNICK, A. Therapeutic targeting of the BCL6 oncogene for diffuse large B-cell lymphomas. **Leuk Lymphoma**, v.49, n. 5, p. 874-882, May 2008.
- 39 CHATTOPADHYAY, A. et al. A peptide aptamer to antagonize BCL-6 function. **Oncogene**, v. 25, n. 15, p. 2223-2233, Apr. 2006.
- 40 RAMOS, I. **Role of β -amyloid structure and residue accessibility in cell interactions associated with Alzheimer's disease**. 2009. 212 f. Dissertation (Doctor of Philosophy) - Faculty of the Graduate School, University of Maryland, Baltimore County, 2009.

- 41 KELLY, C. A.; HARVEY, R. J.; CAYTON, H. Drug treatments for Alzheimer's disease. **British Medical Journal**, v. 314, n. 7082 Mar. 1997. doi: 10.1136/bmj.314. 7082. 693.
- 42 COOKSON, M. R. The biochemistry of parkinson's disease. **Annual Review of Biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 29-52, 2005.
- 43 HASHIMOTO, M.; MASLIAH, E. Alpha-synuclein in Lewy body disease and Alzheimer's disease. **Brain Pathology**, v. 9, n. 4, p. 707-720, Oct. 1999.
- 44 ELISA, A.; WAXMAN, B. I. G. Molecular mechanisms of α -synuclein neurodegeneration. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1792, p. 616-624, July 2009.
- 45 PAPACHRONI, K. K. et al. Autoantibodies to alpha-synuclein in inherited Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 101, n. 3, p. 749-756, May 2007.
- 46 van GEEL, W. J. A. et al. A more efficient enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of α -synuclein in cerebrospinal fluid. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 168, n. 1, p. 182-185, Feb. 2008.
- 47 MOLLENHAUER, B. et al. α -Synuclein and tau concentrations in cerebrospinal fluid of patients presenting with parkinsonism: a cohort study. **The Lancet Neurology**, v. 10, n. 3, p. 230-240, Mar. 2011.
- 48 BALLARD, C. G.; JONES, E. L. CSF α -synuclein as a diagnostic biomarker for Parkinson disease and related dementias. **Neurology**, v. 75, n. 20, p. 1760-1761, Nov. 2010.
- 49 SZALAI, A. J. et al. C-reactive protein: structural biology and host defense function. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 37, n. 3, p. 265-270, Mar. 1999.
- 50 PEPYS, M. B.; HIRSCHFIELD, G. M. C-reactive protein: a critical update. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 12, p. 1805-1812, June 2003.
- 51 AZUMI, N.; TRAWEEK, S.T.; BATTIFORA, H. Prostatic acid phosphatase in carcinoid tumors: immunohistochemical and immunoblot studies. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 15, n. 8, p. 785-790, Aug. 1991.
- 52 PIRKKO, V. 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, Oct. 1978.
- 53 Al, T. et al. Reviving the acid phosphatase test for prostate cancer. **Oncology**, v. 21, n. 8, p. 1003-1010, July 2007.
- 54 van DIEIJEN-VISSER, M. P. et al. 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, May 1988.
- 55 ECKERMANN, A. L. et al. Electrochemistry of redox-active self-assembled monolayers. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, n. 15/16, p. 1769-1802, Aug. 2010.

- 56 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, Jan. 2013.
- 57 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. 1997-2004, Feb. 2014.
- 58 FLEMING, B. D. et al. Detailed analysis of the electron-transfer properties of azurin adsorbed on graphite electrodes using dc and large-amplitude fourier transformed ac voltammetry. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 17, p. 6515-6526, Sept. 2007.
- 59 MENDEZ De LEO, L. P. et al. Molecular and electronic structure of electroactive self-assembled monolayers. **The Journal of Chemical Physics**, v. 138, n. 11, p. 1147071/1-1147071/9, Mar. 2013.
- 60 BÜTTIKER, M.; THOMAS, A.; PRÊTRE, A. Mesoscopic capacitors. **Physics Letters A**, v. 180, n. 4/5, p. 364-369, Sept. 1993.
- 61 BUENO, P. R.; DAVIS, J. J. Measuring quantum capacitance in energetically addressable molecular layers. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 1337-1341, Jan. 2014.
- 62 PATIL, A. V. et al. Impedance electroanalysis in diagnostics. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 2, p. 944-950, Dec. 2014.
- 63 BENITES, T. A. et al. Efeitos da rugosidade superficial nas propriedades de passivação de monocamadas orgânicas automontadas. **Química Nova**, v. 37, n. 9, p. 1533-1537, ago. 2014.
- 64 MADUEÑO, R. et al. A voltammetric study of 6-mercaptopurine monolayers on polycrystalline gold electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 506, n. 2, p. 92-98, June 2001.
- 65 HOOGVLIET, J. C. et al. Electrochemical pretreatment of polycrystalline gold electrodes to produce a reproducible surface roughness for self-assembly: a study in phosphate buffer ph 7.4. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 9, p. 2016-2021, Mar. 2000.
- 66 TRASATTI, S.; PETRII, O. A. Real surface-area measurements in electrochemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 63, n. 5, p. 711-734, May 1991.
- 67 BERGGREN, C.; BJARNASON, B.; JOHANSSON, G. Capacitive biosensors. **Electroanalysis**, v. 13, n. 3, p. 173-180, Mar 2001.
- 68 DAVIS, J. J. (Ed.). **Engineering the bioelectronic interface: applications to analyte biosensing and protein detection**. Cambridge: RSC, 2009. 243 p.
- 69 ESTRELA, P. et al. Label-free sub-picomolar protein detection with field-effect transistors. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 9, p. 3531-3536, May 2010.

- 70 WHITE, R. J. et al. Wash-free, electrochemical platform for the quantitative, multiplexed detection of specific antibodies. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 1098-1103, Jan. 2012.
- 71 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, Jan. 2013.
- 72 LISDAT, F.; SCHÄFER, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 5, p. 1555-1567, Jan. 2008.
- 73 BRYAN, T. et al. An optimised electrochemical biosensor for the label-free detection of C-reactive protein in blood. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 39, n. 1, p. 94-98, Jan. 2013.
- 74 JOHNSON, A. et al. Sensitive affimer and antibody based impedimetric label-free assays for c-reactive protein. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 15, p. 6553-6560, Aug. 2012.
- 75 DANIELS, J. S.; POURMAND, N. Label-free impedance biosensors: opportunities and challenges. **Electroanalysis**, v. 19, n. 12, p. 1239-1257, May 2007.
- 76 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, Dec. 2005.
- 77 BRYAN, T. et al. The robust electrochemical detection of a Parkinson's disease marker in whole blood sera. **Chemical Science**, v. 3, n. 12, p. 3468-3473, Sept. 2012.
- 78 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, Sept. 2005.
- 79 BOGOMOLOVA, A. et al. Challenges of electrochemical impedance spectroscopy in protein biosensing. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 10, p. 3944-3949, May 2009.
- 80 ELLIOTT, C.M.; REDEPENNING, J. G.; BALK, E. M. Electronically conducting poly-tris(5,5'-bis(3-acrylyl-1-propoxy) carbonyl]-2,2'-bipyridine)ruthenium-modified electrodes: studies of bilayer films and solution redox reactions. **Journal of Electrochemical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 213, n. 2, p. 203-215, Nov. 1986.
- 81 SUMNER, J. J.; CREAGER, S. E. Redox kinetics in monolayers on electrodes: electron transfer is sluggish for ferrocene groups buried within the monolayer interior. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 37, p. 8739-8745, Aug. 2001.
- 82 BUENO, P. R.; FABREGAT-SANTIAGO, F.; DAVIS, J. J. Elucidating capacitance and resistance terms in confined electroactive molecular layers. **Analytical Chemistry**, v. 85, p. 411-417, Nov. 2012.
- 83 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, June 1983.

84 EDDOWES, M. J.; HILL, H. A. O. Novel method for the investigation of the electrochemistry of metalloproteins: cytochrome c. **Journal of the Chemical Society: Chemical Communications**, n. 21, p. 771-772, 1977.

85 CHAKI, N. K.; VIJAYAMOHANAN, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 1/2, p. 1-12, Jan. 2002.

86 POIRIER, G. E.; PYLANT, E. D. The self-assembly mechanism of alkanethiols on Au(111). **Science**, v. 272, n. 5265, p. 1145-1148, May 1996.

87 LU, B.; SMYTH, M. R.; O'KENNEDY, R. Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors. **Analyst**, v. 121, n. 3, p. 29R-32R, 1996.

88 LOVE, J. C. et al. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 4, p. 1103-1169, July 2005.

89 DIAS, D. et al. The interaction of a polycrystalline gold electrode with ethanethiol in alkaline solution. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 690, p. 121-126, Feb. 2013.

90 PORTER, M. D. et al. Spontaneously organized molecular assemblies. 4. Structural characterization of n-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared spectroscopy, and electrochemistry. **Journal of the American Chemical Society**, v. 109, n. 12, p. 3559-3568, June 1987.

91 BRYANT, M. A.; PEMBERTON, J. E. Surface raman scattering of self-assembled monolayers formed from 1-alkanethiols: behavior of films at gold and comparison to films at silver. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, n. 22, p. 8284-8293, Oct. 1991.

92 HÄHNER, G. et al. Structure of self-organizing organic films: a near edge x-ray absorption fine structure investigation of thiol layers adsorbed on gold. **Journal of Vacuum Science & Technology A**, v. 10, n. 4, p. 2758-2763, Aug. 1992.

93 BUENO, P. R. et al. A facile measurement of heterogeneous electron transfer kinetics. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 22, p. 10920-10926, Oct. 2013.

94 LIN, J. et al. Impedance spectroscopy of bilayer membranes on single crystal silicon. **Biointerphases**, v. 3, n. 2, p. FA33-FA40, June 2008.

95 LIN, J. et al. Electrically addressable, biologically relevant surface-supported bilayers. **Langmuir**, v. 26, n. 14, p. 12054-12059, May 2010.

96 ROMANER, L. et al. The dielectric constant of self-assembled monolayers. **Advanced Functional Materials**, v. 18, n. 24, p. 3999-4006, Dec. 2008.

97 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, June 1995.

- 98 LAVIRON, E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. **Journal of Electroanalytical Chemistry and interfacial electrochemistry**, v. 101, n. 1, p. 19-28, July 1979.
- 99 SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 489-511, May 2012.
- 100 HENNESSEY, H. et al. Electrochemical investigations of the interaction of C-reactive protein (CRP) with a CRP antibody chemically immobilized on a gold surface. **Analytica Chimica Acta**, v. 643, n. 1/2, p. 45-53, June 2009.
- 101 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, Oct. 1978.
- 102 SAITO, T. et al. 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, Oct. 2007.
- 103 SAITO, T.; KITAMURA, Y.; KOMATSUBARA, S. Prognosis of prostate cancer with elevated prostatic acid phosphatase. **Hinyokika kiyo. Acta Urologica Japonica**, v. 52, n. 3, p. 177-180, Mar. 2006.
- 104 ALCANTAR, N. A.; AYDIL, E. S.; ISRAELACHVILI, J. N. Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 51, n. 3, p. 343-351, Sept. 2000.
- 105 CHO, H. Y. et al. Synthesis of biocompatible peg-based star polymers with cationic and degradable core for sirna delivery. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 10, p. 3478-3486, Oct. 2011.
- 106 KLAPSHINA, L. G. et al. Novel PEG-organized biocompatible fluorescent nanoparticles doped with an ytterbium cyanoporphyrine complex for biophotonic applications. **Chemical Communications**, v. 46, n. 44, p. 8398-8400, Sept. 2010.
- 107 SCHILP, S. et al. Physicochemical properties of (ethylene glycol)-containing self-assembled monolayers relevant for protein and algal cell resistance. **Langmuir**, v. 25, n. 17, p. 10077-10082, Sept. 2009.
- 108 HARDER, P. et al. Molecular conformation in oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers on gold and silver surfaces determines their ability to resist protein adsorption. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 2, p. 426-436, Jan. 1998.
- 109 CASTAÑÓN-FERNÁNDEZ, J.; FERNÁNDEZ-ABEDUL, M. T.; COSTA-GARCÍA, A. Kinetic determination of acid phosphatase activity by double injection flow analysis with electrochemical detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 413, n. 1/2, p. 103-108, May 2000.
- 110 CASTAÑÓN-FERNÁNDEZ, J.; FERNÁNDEZ-ABEDUL, M. T.; COSTA-GARCÍA, A. Determination of acid phosphatase activity in a double injection flow system with electrochemical detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 406, n. 2, p. 225-232, Feb. 2000.

- 111 YAN, S. et al. A novel biosensor based on gold nanoparticles modified silicon nanowire arrays. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 641, n. 1/2, p. 136-140, Mar. 2010.
- 112 POURNAGHI-AZAR, M. H.; AHOOR, F.; HEJAZI, M. S. Differential pulse voltammetric detection of hepatitis C virus 1a oligonucleotide chain by a label-free electrochemical DNA hybridization biosensor using consensus sequence of hepatitis C virus 1a probe on the pencil graphite electrode. **Electroanalysis**, v. 21, n. 16, p. 1822-1828, Aug. 2009.
- 113 LI, L. et al. Aptamer biosensor for label-free square-wave voltammetry detection of aptogenin. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 30, n. 1, p. 261-266, Dec. 2011.
- 114 TELSNIIG, D. et al. Characterization of an amperometric biosensor for the determination of biogenic amines in flow injection analysis. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, n. 11, p. 10476-10486, Nov. 2012.
- 115 CECCHETTO, J. et al. An impedimetric biosensor to test neat serum for dengue diagnosis. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 213, p. 150-154, July 2015.
- 116 LIN, J. et al. Sensitive immunosensor for the label-free determination of tumor marker based on carbon nanotubes/mesoporous silica and graphene modified electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, p. 342-347, Mar. 2013.
- 117 SAHOO, P. et al. Direct label free ultrasensitive impedimetric DNA biosensor using dendrimer functionalized GaN nanowires. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 44, p. 164-170, June 2013.
- 118 VENKATANARAYANAN, A.; KEYES, T. E.; FORSTER, R. J. Label-free impedance detection of cancer cells. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 4, p. 2216-2222, Jan. 2013.
- 119 OHNO, R. et al. Electrochemical impedance spectroscopy biosensor with interdigitated electrode for detection of human immunoglobulin A. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 40, n. 1, p. 422-426, Feb. 2013.
- 120 YANG, L.; LI, Y.; ERF, G. F. Interdigitated array microelectrode-based electrochemical impedance immunosensor for detection of *Escherichia coli* O157:H7. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 4, p. 1107-1113, Jan. 2004.
- 121 LUO, X. L.; DAVIS, J. J. Electrical biosensors and the label free detection of protein disease biomarkers. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 13, p. 5944-5962, Apr. 2013.
- 122 RICKERT, J. et al. A 'mixed' self-assembled monolayer for an impedimetric immunosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 11, n. 8, p. 757-768, Sept. 1996.
- 123 IONESCU, R. E. et al. Label-free impedimetric immunosensor for sensitive detection of atrazine. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 21, p. 6228-6232, Aug. 2010.

- 124 RAMÓN-AZCÓN, J. et al. An impedimetric immunosensor based on interdigitated microelectrodes (ID μ E) for the determination of atrazine residues in food samples. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, n. 9, p. 1367-1373, Apr. 2008.
- 125 LUO, X. et al. Redox and label-free array detection of protein markers in human serum. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 11, p. 5553-5558, May 2014.
- 126 BART, M. et al. On the response of a label-free interferon- γ immunosensor utilizing electrochemical impedance spectroscopy. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 1, p. 49-59, July 2005.
- 127 CHUANG, Y.-H. et al. Electrical impedimetric biosensors for liver function detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 28, n. 1, p. 368-372, Oct. 2011.
- 128 LIN, K.-C. et al. Biogenic nanoporous silica-based sensor for enhanced electrochemical detection of cardiovascular biomarkers proteins. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 10, p. 2336-2342, June 2010.
- 129 BRYAN, T. et al. An optimised electrochemical biosensor for the label-free detection of C-reactive protein in blood. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 39, n. 1, p. 94-98, Jan. 2013.
- 130 LUO, X. et al. Ultrasensitive label free electrical detection of Insulin in neat blood serum. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 8, p. 4129-4134, Mar. 2013.
- 131 BENILOVA, I. V. et al. Nonfaradaic impedance probing of potato glycoalkaloids interaction with butyrylcholinesterase immobilized onto gold electrode. **Electroanalysis**, v. 18, n. 19/20, p. 1950-1956, Oct. 2006.
- 132 GAUTIER, C. et al. Hybridization-induced interfacial changes detected by non-faradaic impedimetric measurements compared to Faradaic approach. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 610, n. 2, p. 227-233, Dec. 2007.
- 133 FANG, X. et al. A label-free immunosensor for diagnosis of dengue infection with simple electrical measurements. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 5, p. 1137-1142, Jan. 2010.
- 134 GÜVEN, E. et al. Non-specific binding in solid phase immunoassays for autoantibodies correlates with inflammation markers. **Journal of Immunological Methods**, v. 403, n. 1/2, p. 26-36, Jan. 2014.
- 135 KIM, C.-H. et al. CRP detection from serum for chip-based point-of-care testing system. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, p. 322-327, Mar. 2013.
- 136 MISHRA, S. et al. Biofunctionalized gold nanoparticle-conducting polymer nanocomposite based bioelectrode for crp detection. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 3, p. 984-997, Oct. 2014.
- 137 CHEN, X. et al. Electrochemical impedance immunosensor based on three-dimensionally ordered macroporous gold film. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 6, p. 2133-2140, Feb. 2008.

138 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, Feb. 2015.

139 TARKKINEN, P.; PALENIUS, T.; LÖVGREN, T. Ultrarapid, ultrasensitive one-step kinetic immunoassay for c-reactive protein (crp) in whole blood samples: measurement of the entire crp concentration range with a single sample dilution. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 2, p. 269-277, Feb. 2002.

140 LEE, W.-B. et al. An integrated microfluidic system for fast, automatic detection of C-reactive protein. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 157, n. 2, p. 710-721, Oct. 2011.