

JULIA PINTO PICCOLI

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

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

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli

Araraquara

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

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

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

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: JÚLIA PINTO PICCOLI

ORIENTADOR: EDUARDO MAFFUD CILLI

COORDENADOR: PAULO ROBERTO BUENO

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



Prof. Dr. EDUARDO MAFFUD CILLI

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



Prof. Dr. NAILTON MONTEIRO DO NASCIMENTO JUNIOR

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



Prof. Dr. JOÃO FLAVIO DA SILVEIRA PETRUCI

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



Prof. Dr. ESTEBAN NICOLAS LORENZÓN

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



Prof. Dr. OSVALDO NOVAIS DE OLIVEIRA JUNIOR

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

Araraquara, 22 de fevereiro de 2019

Dados Curriculares

Nome

Júlia Pinto Piccoli

Nome em citações bibliográficas

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

Endereço Profissional

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

Formação acadêmica/titulação

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

Formação complementar

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

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

Atuação profissional

1.Instituto de Química - UNESP/CAr - IQ

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

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

Atividades

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

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

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

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

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

3. UNESP - FCFAR

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

Revisor de periódico

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

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

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

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Capítulos de livros publicados

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

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

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

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

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

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

Orientações e Supervisões

Dissertações de mestrado

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

Iniciação científica

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

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

Patentes

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

1. MOREIRA, C. G. B. ; AZEVEDO, L. B. S. ; VICENTE, E. F. ; CILLI, E. M. ; SILVA JUNIOR, L. N. ; FUZINAGA, T. Y. T. ; YOKOO, R. S. S. ; **PICCOLI, J. P.** Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020180687638, título: "'método para obtenção de peptídeos análogos sintéticos ao peptídeo original utilizado no ensaio de reatividade direta com peptídeos (dpra), peptídeos análogos sintéticos, uso dos peptídeos análogos sintéticos e método in vitro para predição do potencial sensibilizante cutâneo de substâncias hidrofóbicas'", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 21/11/2018

Organização de evento

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

Palestras ministradas

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

Outras informações

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

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

Dedicatória

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

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

E amigos, por estarem sempre ao meu lado.

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

— Elizabeth Gilbert, *Eat, Pray, Love*

Resumo

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

Abstract

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

Lista de Figuras

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

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

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

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

Lista de Tabelas

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

Lista de Símbolos

α - alfa

β - beta

ε - épsilon

Δ - delta

Z' – impedância real

Z'' - impedância imaginária

C_r – capacitância redox

C^* - capacitância eletroquímica

e - carga elementar

k_B - constante de Boltzman

T - temperatura absoluta

Γ - recobrimento molecular redox da superfície.

f – frequência

ω - frequência angular

i - número complexo

Lista de Abreviaturas e Siglas

Aminoácidos

Ala (A) Alanina

Arg (R) Arginina

Asn (N) Asparagina

Asp (D) Ácido aspártico

Cys (C) Cisteína

Gln (Q) Glutamina

Glu (E) Ácido Glutâmico

Gly (G) Glicina

His (H) Histidina

Ile (I) Isoleucina

Leu (L) Leucina

Lys (K) Lisina

Met (M) Metionina

Phe (F) Fenilalanina

Pro (P) Prolina

Ser (S) Serina

Thr (T) Treonina

Trp (W) Triptofano

Tyr (Y) Tirosina

Val (V) Valina

Outras

AA - Aminoácido

Ac - acetil

ACN - Acetonitrila

AgCl - cloreto de prata

ANTI - CRP – anticorpo proteína C reativa

AFM – microscopia de força atômica

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

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

DCM - Diclorometano

DIC - *N,N'*-diisopropilcarbodiimida

DIEA – *N,N,N*-diisopropiletilamina

DMF - *N,N*-dimetilformamida

DPV – Voltametria de Pulso Diferencial

Fmoc - 9-Fluorenilmetiloxicarbonila

ECE – Espectroscopia de capacitância eletroquímica

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

ELISA - “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”

EIE - Espectroscopia de impedância eletroquímica

Fc - Ferroceno

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

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

HOBt - *N*-Hidroxibenzotriazol

HPLC- “High Performance Liquid Chromatography”

CLAE - Cromatografia líquida de alta performance

LSV – Voltametria de Varredura Linear

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

NHS - *N*-hidroxisuccinimida

NMP- *N*- metilpirrolidona

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

QCM - Microbalança de cristal de quartzo

SAM - Monocamada auto-organizada

SEM – Microscopia Eletrônica de Varredura

SPFS - Síntese de peptídeos em fase sólida

TEM – Microscopia Eletrônica de Transmissão

TBAClO₄ - Perclorato de tetrabutilamônio

t-Boc - terc-butiloxicarbonila

TFA - Ácido trifluoracético

VC - Voltametria cíclica

VCA – Voltametria com Corrente Alternada

VOQ – Voltametria de Onda Quadrada

XPS – Espectroscopia fotoelétrons excitado por raio X

SUMÁRIO

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

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

CAPÍTULO 1: OBJETIVOS

1.1 Objetivos

Este projeto possui como objetivo principal, a síntese de conjugados peptídicos contendo uma sonda redox ligada covalentemente (molécula de ferroceno), para a obtenção de monocamadas auto-organizadas (SAMs) em eletrodos de ouro. As SAMs serão utilizadas visando o desenvolvimento de imunossensores.

A aplicação dos imunossensores será realizada por meio da detecção da proteína C-reativa (CRP). A CRP foi utilizada como prova de conceito para as diferentes monocamadas aqui testadas, uma vez que, é um biomarcador de inflamações e doenças cardiovasculares.

As metas específicas são:

- 1) Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos:
 - Ac-Cys-Ile-Ile-Lys(ferroceno)-Ile-Ile-COOH
 - Ferroceno-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH₂
 - Ferroceno-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂
 - Ferroceno-Glu-Ala-Cys-NH₂
- 2) Padronização da técnica de síntese de peptídeo em fase sólida, contendo uma molécula redox ativa de ferroceno;
- 3) Formação das monocamadas auto-organizadas a partir dos peptídeos sintetizados;
- 4) Ligação do anticorpo e de aptâmero de DNA da proteína C-reativa às SAMs;
- 5) Avaliação do uso das técnicas de voltametria cíclica, espectroscopia de impedância eletroquímica e da capacitância eletroquímica em imunossensores para detectar a CRP;
- 6) Determinação da sensibilidade, especificidade, confiabilidade e viabilidade das análises em função das diferentes cadeias peptídicas utilizadas;
- 7) Comparação dos resultados obtidos entre si e, frente às atuais técnicas de imobilização de SAMs em eletrodo de ouro (acilióis).

CAPÍTULO 2: INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enunciado do Problema

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

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

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

2.2 Biomarcadores

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

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

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

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

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

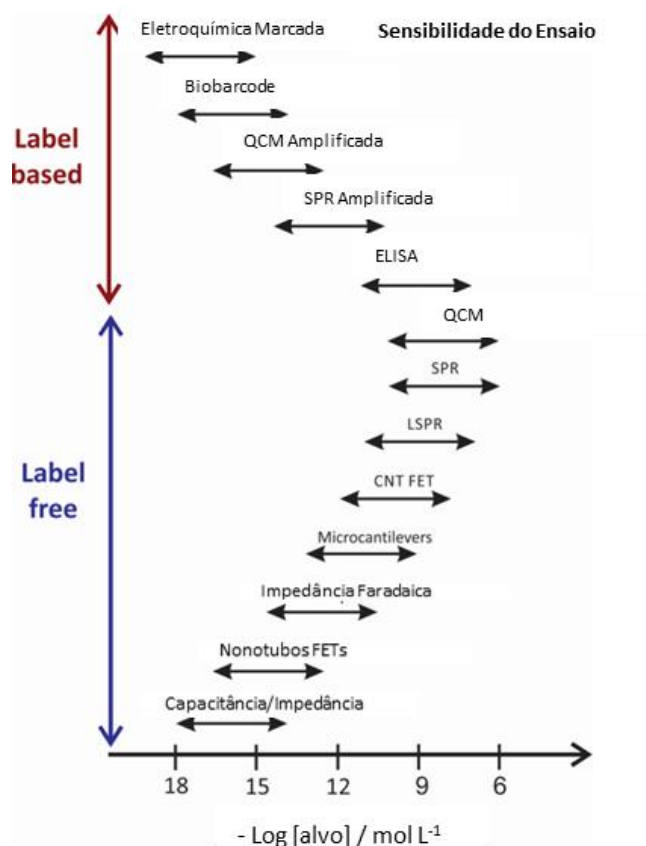
Outro exemplo de biomarcador é a proteína C-Reativa (*C-Reactive Protein*) utilizado na determinação de processos inflamatórios e doenças cardíacas (BRYAN et al., 2013). Além disso, nas últimas décadas, estudos mostraram que a CRP também está associada ao aumento do risco de problemas cardiovasculares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

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

2.3 Técnicas “Label-free x Label-Based”

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

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



Fonte: Adaptada de Tkac e Davis.

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

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

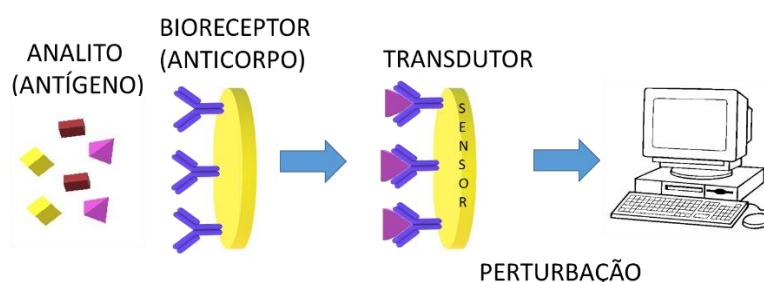
As técnicas denominadas “*label-free*”, que utilizam as propriedades intrínsecas das moléculas para sua detecção e quantificação, têm ganhado espaço, uma vez que, é possível o monitoramento em tempo real, o que possibilita desenvolver dispositivos capazes de detectar uma proteína no momento do ensaio.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

2.4 Biossensores Eletroquímicos

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

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

Figura 2. Representação esquemática de um imunossensor.



Fonte: Própria Autora. Software Power Point, 2013.

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

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

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

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

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

2.5 Espectroscopia de impedância eletroquímica

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

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

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

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

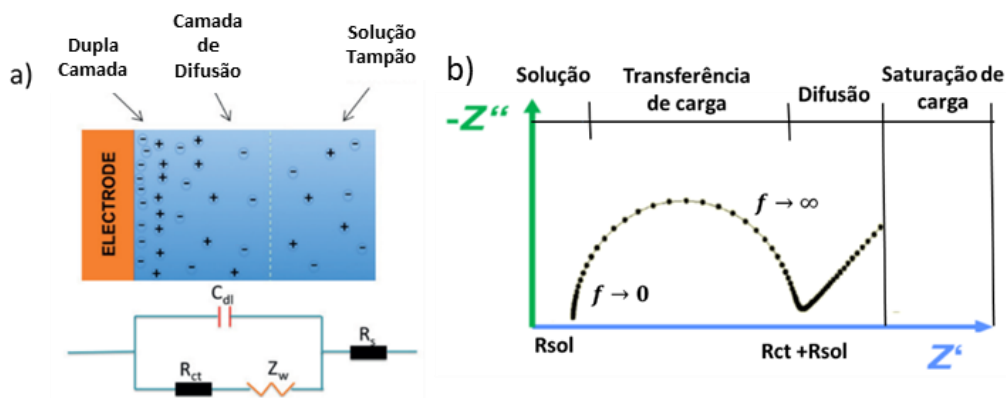
realizada por meio do ajuste dos dados experimentais (gráfico de Nyquist em que a parte imaginária é mostrada em função da parte real $-Z''$ versus Z' , figura 3b) (BUENO; BENITES; DAVIS, 2016; GÓES et al., 2012; XU; DAVIS, 2014).

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

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

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

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



Fonte: Xu and Jason, 2014.

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

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

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

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

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

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

Fonte: Própria Autora

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

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

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

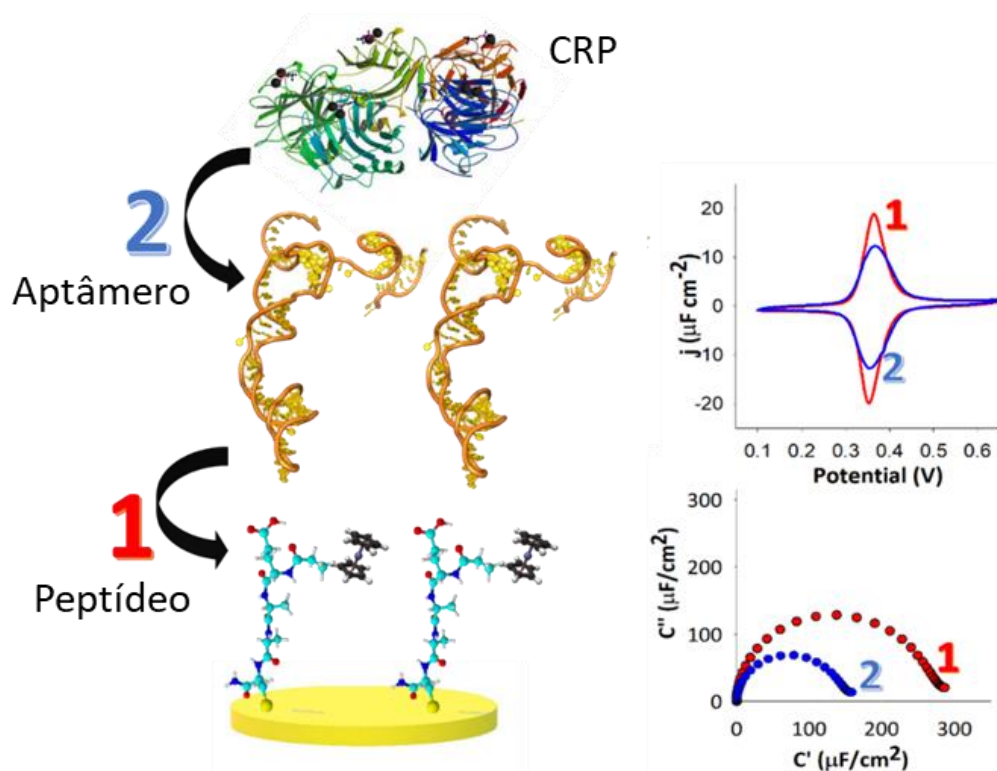
Fonte: Própria Autora

2.6 Espectroscopia de capacitância eletroquímica

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

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

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



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

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

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

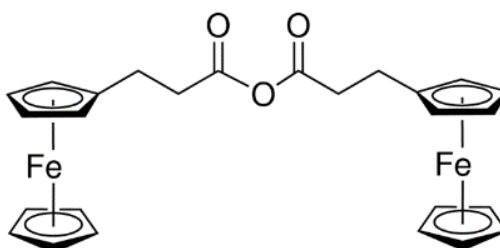
A espectroscopia faradaica de capacitância derivada da impedância foi reportada como alternativa à técnicas não faradaica e como exemplo, Lehr e colaboradores estabeleceram um ensaio sensível para PAP (biomarcador de câncer de próstata) e CRP, encontrando melhorados

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

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

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

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



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

2.7 Monocamadas Auto-Organizadas (SAMs) e Peptídeos

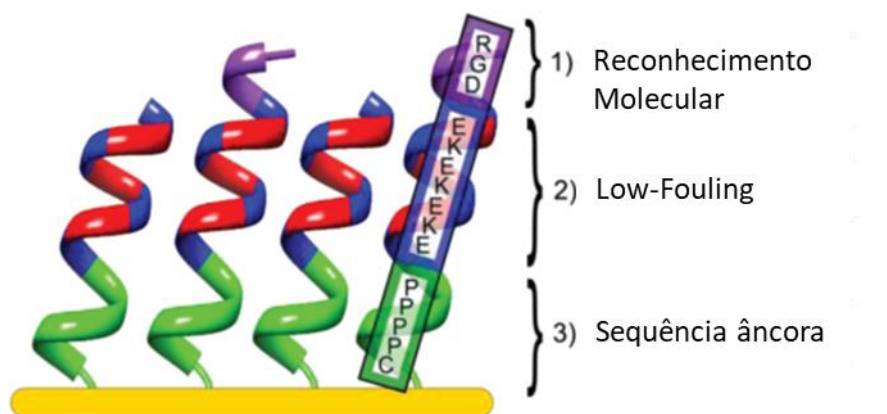
As monocamadas auto-organizadas (SAMs) são de fácil preparação, não requerem equipamentos especializados, podem ser obtidas em diversos tamanhos, permitem o acoplamento do ambiente externo a um eletrônico, e possuem flexibilidade na utilização de grupos funcionais de maneira a formarem superfícies hidrofílicas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

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

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

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

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



Fonte: Figura retirada de Nowinski et al, 2012.

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

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

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

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

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

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

Tabela 3. Revisão de Peptídeos Utilizados em Sensores.

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

Fonte: Própria Autora

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

seguido da quantificação do antígeno alvo (CRP). A inovação do estudo está no uso dos peptídeos contendo molécula redox ativa confinada nas monocamadas peptídicas auto-organizadas, responsáveis por aprimorar a performance do imunossensor, além de facilitar na sua fabricação.

CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparo de Soluções

Para o preparado das soluções aquosas foi utilizado água ultrapura com resistividade de 18,2 M Ω cm a 25°C. Para o preparo de 1 L da solução tampão fosfato salino (PBS - pH 7,4), foram utilizados 0,20 g de NaNO₃, 8,01 g de NaCl, 0,20 g de KCl, 3,58 g de Na₂HPO₄.12H₂O e 0,27 g de KH₂PO₄. A solução de eletrólito suporte 20 mmol L⁻¹ de TBA e pH 7 foi preparada dissolvendo 3,42 g de perclorato de tetrabutilamônio (TBA) em 100,00 mL de acetonitrila e diluída até 500,00 mL com água ultrapura. Soluções 0,5 M de NaOH e KOH foram preparadas dissolvendo 10,00 g e 15,59 g de NaOH e KOH, respectivamente, em 500,00 mL de água ultrapura. Ácido sulfúrico 0,5 M foi preparado a partir de 14,03 mL de ácido concentrado e diluindo em água ultrapura até 500,00 mL.

3.2 Síntese dos Peptídeos

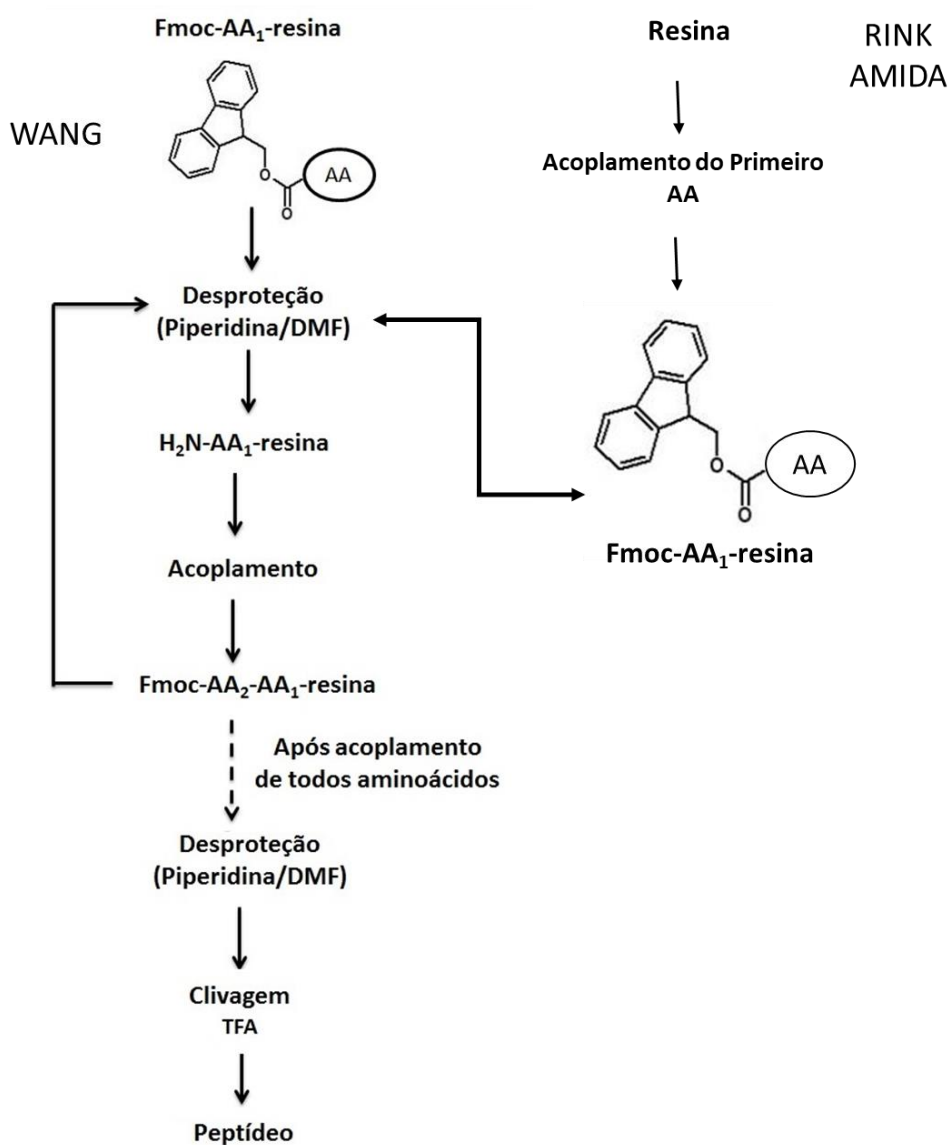
Os peptídeos foram sintetizados utilizando a técnica denominada de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS). Esse método de síntese encontra-se publicado em diversas revisões e baseia-se no crescimento, resíduo por resíduo, da cadeia peptídica presa covalentemente pelo seu aminoácido C-terminal aos sítios reativos existentes em um suporte sólido (resina) por meio de seu grupo carboxila (MERRIFIELD, 1963).

Na síntese peptídica em fase sólida, o aminoácido C-terminal é ligado covalentemente à resina Rink Amida, com grau de substituição 0,50 mmol g⁻¹, por meio de uma ligação amida para a obtenção de peptídeos com extremidade α -carboxamida ou à resina Wang para a obtenção de peptídeos carboxila livre.

Os acoplamentos dos Fmoc-aminoácidos foram realizados pela ativação dos grupos carboxilas com diisopropilcarbodiimida (Dic)/*N*-Hidroxibenzotriazol (HOBt) ou hexafluorofosfato de *O*-(Benzotriazo-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (HBTU)/(DIEA) – *N,N,N*-diisopropiletilamina. Todos os Fmoc-aminoácidos e reagentes foram utilizados com 2 vezes de

excesso em relação à quantidade de grupos reativos na resina inicial. A retirada do grupo Fmoc base-lábil foi efetivada pela lavagem em 20% 4-metil-piperidina/DMF durante 1 e 20 min. Após cada etapa de acoplamento e desproteção foram efetuadas lavagens com dimetilformamida (DMF) e diclorometano (DCM), para eliminação do excesso de reagentes e subprodutos. Após cada etapa de acoplamento e desproteção as lavagens e teste de ninidrina foram efetuados (KAISER et al., 1970). Este reagente, a altas temperaturas, reage com grupos amino livres, liberando um composto de cor azul. Este teste é, portanto, adequado para indicar a presença de grupos aminos livres e indicativo da eficiência dos passos de acoplamento e desproteção.

Figura 7. Esquema do protocolo de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS).



Fonte: Modificado de Cilli et al, 2017.

3.3 Reações de Clivagem

A clivagem dos peptídeos da resina ao final da síntese foi realizada pela adição de diferentes soluções as quais continham o ácido trifluoracético - TFA (Merck®), responsável pela clivagem e os supressores de reações colaterais: triisopropilsilano (TIS) (Acros Organics®), 1,2 etanoditiol (EDT), e água ultrapura, em frasco de cintilação sob agitação branda por 2 h. Depois foi executada a precipitação do peptídeo com éter dietílico gelado e o sobrenadante foi descartado, obtendo-se um precipitado contendo o peptídeo e a resina. O peptídeo foi então dissolvido com uma solução contendo 0,045% de TFA em água ultrapura e 0,036% de TFA em acetonitrila (50:50), e a solução centrifugada, para separar a resina do peptídeo. O sobrenadante resultante contendo o peptídeo foi liofilizado.

3.4 Purificação e Caracterização dos Peptídeos

A purificação dos produtos obtidos foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) em modo semi-preparativo, com solvente A (0,045% de TFA em H₂O) e solvente B (0,036% de TFA em ACN), fluxo de 5 mL min⁻¹, comprimento de onda de detecção de 220 nm, e uma coluna C18 da marca Phenomenex (tamanho 250 mm x 10 mm, 300 Å, partícula de 5 µm). Após a separação e liofilização dos materiais obtidos, a análise de pureza de cada fração foi realizada por meio de CLAE em um aparelho analítico Shimadzu, com coluna 4,6 mm x 150 mm, de fase reversa C18 Ultraspehere Phenomenex, 300 Å, tamanho da partícula de 5 µm, detecção em 220 nm, utilizando um programa gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 min com fluxo de 1 mL min⁻¹.

As análises das massas molares dos peptídeos foram realizadas por espectrometria de massas com aparelho Bruker injeção ion trap, para confirmar a obtenção do material desejado, modo eletrospray positivo (MS⁺) faixa de 200-1000 g mol⁻¹.

3.5 Medidas Eletroquímicas

Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e voltametria cíclica (VC) foram utilizadas na caracterização de todas as etapas de construção de superfície receptiva. Para a realização dos ensaios, o eletrólito suporte foi uma solução de 20 mM de TBA (tetrabutilamônio) dissolvido em acetonitrila e H₂O (20:80, v/v). A VC foi realizada na faixa de potencial entre 0,1 - 0,6 V e velocidade de varredura de 0,1 V s⁻¹. Todos potenciais aqui

reportados foram medidos em relação ao eletrodo de referência de Ag|AgCl. Medidas de EIE foram realizadas em uma faixa de frequência de 100 mHz a 100 kHz no potencial de meia-onda (região faradaica), obtidos pela média aritmética do potencial de oxidação e redução; com amplitude de perturbação de 10 mV (pico a pico). Medidas de EIE também foram realizadas no potencial de 0,1 V (região de potencial sem atividade redox – não faradaica). Todas as medidas foram realizadas em triplicata. Os resultados de capacitância foram obtidos convertendo os dados da impedância complexa em função da frequência, utilizando a relação $C^*(\omega) = 1/j\omega Z^*(\omega)$, sendo ω a frequência angular e $j = \sqrt{-1}$ (BUENO; MIZZON; DAVIS, 2012).

3.6 Limpeza e caracterização da superfície de ouro

O eletrodo foi submetido a um processo de dessorção eletroquímica utilizando solução 0,5 mol L⁻¹ de NaOH e aplicando-se potencial de -1,7 a -0,7 V a 100 mV s⁻¹. O eletrodo foi lavado com água e mergulhado em etanol anidro por 20 min, em seguida foi aplicado potencial de -0,2 V a 1,5 V, com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹ utilizando solução de 0,5 mol L⁻¹ de H₂SO₄. A área do eletrodo foi calculada de acordo com o trabalho de Oesch e Janata, do qual considera a carga de 482 $\mu\text{C cm}^{-2}$ como sendo a necessária para reduzir uma monocamada de óxido de ouro quimicamente adsorvido (obtida em varredura anódica) na proporção de 1:1 entre ouro:oxigênio (OESCH; JANATA, 1983). Para o cálculo da área ativa do eletrodo, utilizou-se a área do pico de redução obtido na varredura catódica (-1,1 V x Ag|AgCl) sendo que a carga Q é dada pela equação:

$$Q = \frac{1}{v} \int i \cdot V' \cdot dV' \quad (1)$$

sendo i a corrente, V' o potencial do eletrodo *versus* o de referência, e v a velocidade de varredura (0,1 V s⁻¹). A área do eletrodo (A_e , em cm²) foi calculada utilizando a equação:

$$A_e = \frac{Q}{482 \times 10^{-6}} \quad (2)$$

O fator de rugosidade (F_r) foi obtido dividindo a área obtida na equação 2 pela área geométrica do eletrodo (0,03142 cm²).

3.7 Formação e caracterização das monocamadas automontadas (SAM)

Após a limpeza do eletrodo de ouro, ele foi mergulhado em solução de peptídeo 2 mM em água e acetonitrila (50/50) por 16 h (25 °C). Posteriormente, o eletrodo foi lavado com água.

Para verificar a imobilização dos peptídeos, foram realizadas medidas de voltametria cíclica e impedância eletroquímica. As medidas de voltametria cíclica foram realizadas como descrito acima e o potencial de meia-onda foi obtido pela média aritmética dos potenciais de redução e oxidação. A área do pico de oxidação foi utilizada para calcular o grau de cobertura molecular (Γ , mol/cm²) da SAM peptídica. Para este cálculo, o valor da carga foi obtido a partir da equação 3.

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA_e} \quad (3)$$

sendo F a constante de Faraday (96.485 C/mol) e A_e a área ativa do eletrodo obtida anteriormente

A cobertura molecular também foi determinada utilizando as correntes de pico de cada velocidade de varredura (v), de acordo com as equações:

$$i_p = \frac{n^2 F^2 A_e v \Gamma}{4RT} \quad (4)$$

$$\Gamma = \frac{4RTa}{F^2 A_e} \quad (5)$$

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

Para efeito comparativo, Γ também foi estimado por capacitância redox, de acordo com a equação 6 (BUENO; MIZZON; DAVIS, 2012):

$$\Gamma = \frac{4C_r K_B T}{eF} \quad (6)$$

sendo C_r a capacitância eletroquímica, K_B a constante de Boltzman, T a temperatura absoluta, e a carga elementar (1,6 x 10⁻¹⁹ C) e F a constante de Faraday.

3.8 Imobilização do material biológico e caracterização da superfície

Após a caracterização da SAM, o filme foi ativado com solução aquosa mista contendo EDC/NHS por 30 min. Depois da ativação, o eletrodo foi lavado com água e mergulhado em solução de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de anticorpo monoclonal/aptâmero por 1 h. Para o bloqueio dos sítios remanescentes, foi utilizada solução de BSA a 0,1% (m/v) durante 30 min. Medidas de impedância foram realizadas na região faradaica e não faradaica.

3.9 Construção das curvas de calibração

Após o bloqueio, os eletrodos foram expostos às soluções de diferentes concentrações crescentes de proteína C-reativa por 30 min e as medidas de impedância foram realizadas.

O limite de detecção (LDD) foi calculado de acordo com a norma da IUPAC, que consiste em determinar a concentração de analito com resposta igual ao desvio-padrão do branco (solução sem analito) multiplicado por 3,3 (LONG; WINEFORDNER, 1983).

As curvas de calibração foram construídas tendo como sinal transdutor o inverso da capacitância redox. Neste caso, a resposta do sinal frente à concentração do analito era calculada como $R = 1/C_{r[\text{analito}]} - 1/C_{r(\text{branco})}$ ou, alternativamente, como o percentual de resposta de $1/C_r$ em relação à resposta do branco: $R_{[\text{analito}]}(\%) = 100 * R / (1/C_{r(\text{branco})})$.

3.10 Processos de adsorção

Os processos de adsorção que ocorrem em imunossensores formados por filmes nanoestruturados são responsáveis pela interação entre a molécula alvo e a camada ativa que contém o bioreceptor, e, podem ser estudados a partir de curvas analíticas de calibração e modeladas por modelos teóricos, tais como: Langmuir, Freundlich e Langmuir-Freundlich (JEPPU; CLEMENT, 2012; KIM et al., 2001).

O modelo mais simples é a isoterma de Langmuir, que quantifica a formação de uma monocamada adsorvida na superfície do filme a partir de um equilíbrio entre as moléculas livres de antígeno e anticorpo e o complexo antígeno-anticorpo ($R - L$). Essas isotermas são obtidas a partir da curva de calibração que descreve a quantidade de material adsorvida em relação à concentração em solução, e, pode ser escrito pela equação abaixo:

$$q = \frac{Q_{sat} K_L C}{1 + K_L C} \quad (7)$$

Na qual, q é a quantidade adsorvida por grama de adsorvente em equilíbrio, C é a concentração em equilíbrio, Q_{sat} é a capacidade máxima de cobertura e K_L é a constante da isoterma de langmuir, que pode ser obtida pelo quociente entre os coeficientes angular ($1/R_m$) e linear ($1/K_a R_m$) da função $[Concentração]/R$ versus $[Concentração]$, onde R é o sinal obtido (capacitância redox).

Já o modelo de Freundlich (equação 8), considera que a adsorção ocorre em múltiplas camadas, descrevendo a adsorção em superfícies heterogêneas:

$$Q_e = K_f C^{1/n} \quad (8)$$

Onde Q_e é a quantidade de material adsorvido por grama de adsorvente no equilíbrio, K_f é a constante da isoterma C , é a concentração no equilíbrio, e n é a intensidade de adsorção.

O modelo Langmuir-Freundlich surgiu pela necessidade de um sistema que descrevesse os dois acima, onde relaciona-se o índice de heterogeneidade n , a constante de adsorção K , a capacidade de adsorção do sistema Q_{sat} , além da concentração do analito de interesse C e o sinal da capacitância redox. O índice n indica homogeneidade para $n=1$ ou heterogeneidade para $n < 1$.

$$q = \frac{Q_{sat} \times (K \times C)^n}{1 + (K \times C)^n} \quad (9)$$

3.11 Estudos de Mecanismos de Adsorção com Espectroscopia de Infravermelho por Reflexão-Adsorção de Luz Polarizada

A espectroscopia PM IRRAS foi desenvolvida por Robert Greenler, Golden e colaboradores, a partir da espectroscopia de infravermelho comum (GOLDEN; DUNN; OVEREND, 1981; GREENLER, 1966). É uma técnica que combina a polarização da luz apenas nos componentes perpendicular (s) e paralela (p) ao plano de incidência da luz com a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (reflectância). Através da modulação da luz, ambas as componentes são medidas simultaneamente, permitindo inferir

sobre a orientação molecular dos dipolos presentes em filmes sólidos ou em filmes depositados sobre a interface água/ar (MENDELSON; MAO; FLACH, 2010).

Desta forma, os dipolos orientados paralelamente ao substrato são sensíveis à componente perpendicular (s) e ao plano de incidência da luz, enquanto o feixe paralelo (p) é afetado principalmente pelos dipolos localizados perpendicularmente ao substrato. Tais componentes são medidas por refletividade a partir da equação 10, na qual R_p e R_s são as refletividades paralela e perpendicular ao plano de incidência da luz.

$$\frac{\Delta R}{R} = \frac{R_p - R_s}{R_p + R_s} \quad (10)$$

Os mecanismos que governam as interações entre as SAMs dos peptídeos, anticorpos e antígenos foram estudados em um espectrofotômetro PMI 550 (KSV Instruments, Finlândia), composto por uma fonte de infravermelho (interferômetro), um modulador fotoelástico de cristal de ZnSe e um detector de HgCdTe (modelo PCI-3TE-10.6), conforme indicado na figura X. As medidas foram realizadas com ângulo de incidência da luz 81° e resolução espectral 8 cm^{-1} (figura 8).

Figura 8. Espectrofotômetro PM IRRAS composto por um modulador fotoelástico de cristal ZnSe e uma fonte de luz infravermelha que é refletida pelo substrato metálico para o fotodetector HgCdTe.



Fonte: Própria Autora.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Peptídeo: Ac-Cys-Ile-Ile-Lys(fc)-Ile-Ile-COOH

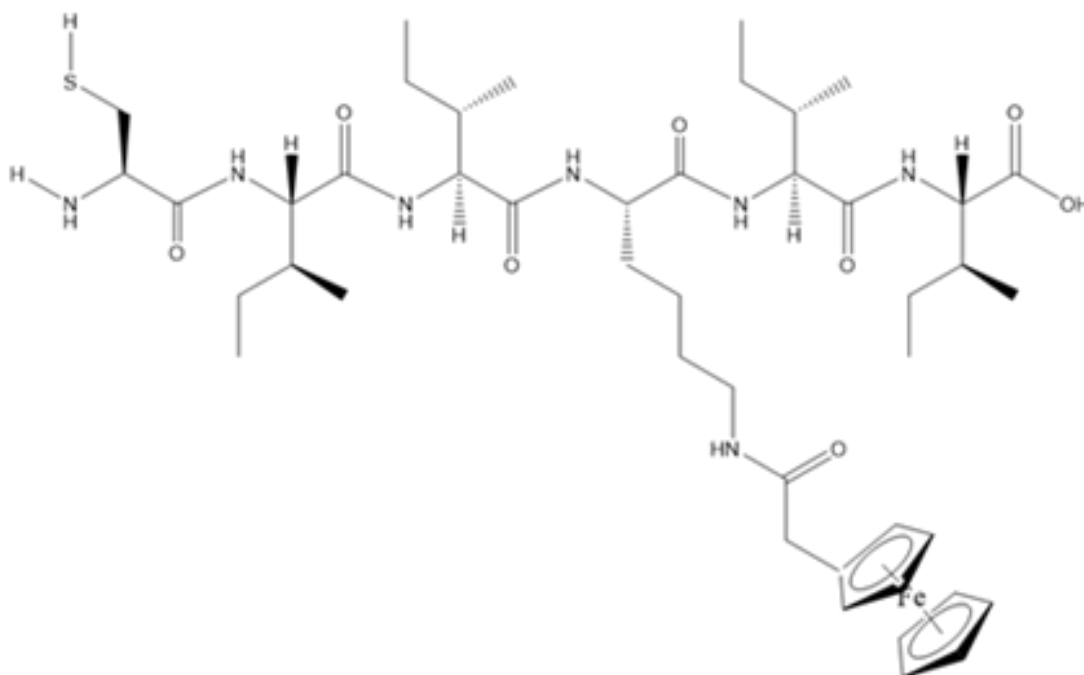
Os dados descritos nesta etapa foram publicados na revista *Biopolymers* (Peptide Science) - PICCOLI, JULIA P., SANTOS, ADRIANO, SANTOS-FILHO, NORIVAL ALVES, LORENZÓN, ESTEBAN N., CILLI, EDUARDO MAFFUD, BUENO, PAULO R. The self-assembly of redox active peptides: Synthesis and electrochemical capacitive behavior. *Biopolymers* v.106(3), p. 357-367, 2016 (PICCOLI et al., 2016).

Durante o período de mestrado (PICCOLI, 2015), o peptídeo de sequência Ac-Ala-Ala-Lys(fc)-Ala-Ala-COOH foi previamente estudado, e seu uso como filme para SAM foi interessante. Entretanto, apesar do peptídeo Ac-Ala-Ala-Lys(fc)-Ala-Ala-COOH ter apresentado resultados adequados para o ensaio com a proteína CRP, o limite de detecção foi maior que o obtido em monocamada mista de aciltióis (SANTOS et al., 2015). Desta forma, novos peptídeos foram testados, visando a melhoria da SAM e a aplicação destes em imunossensores. A primeira ideia foi substituir a alanina por isoleucina, uma vez que, em teoria, a maior e mais hidrofóbica cadeia lateral desse aminoácido poderia favorecer uma maior compactação da SAM e melhorar a sensibilidade do imunossensor (FONTANIVE, 2010).

4.1.1 Síntese do Peptídeo

Na síntese do peptídeo Ac-Cys-Ile-Ile-Lys(fc)-Ile-Ile-COOH (figura 9), contendo o grupo molecular ferroceno acoplado ao resíduo de lisina, foi utilizada a resina Fmoc-Ile-Wang, com grau de substituição de 0,67 mmol g⁻¹, para a obtenção do peptídeo com carboxila livre no grupo C-terminal. A carboxila livre no C-terminal do peptídeo é importante para o posterior acoplamento do anticorpo, permitindo assim, utilizar o peptídeo em aplicações de reconhecimento molecular, como por exemplo, na funcionalização de superfícies metálicas de imunossensores. O aminoácido isoleucina foi escolhido devido ao tamanho e à hidrofobicidade de sua cadeia lateral. A lisina foi utilizada com o protetor metiltritil (Mtt) na cadeia lateral, para permitir a desproteção seletiva do grupo ϵ -amino e o acoplamento do ferroceno.

Figura 9. Estrutura Química do Peptídeo Ac-Cys-Ile-Ile-Lys(fc)-Ile-Ile-COOH.



Fonte: Própria Autora. Software ChemDraw Pro 12.0.

Ao final da síntese do peptídeo, a extremidade N-terminal foi acetilada para evitar novas possibilidades de reações, principalmente a reação do grupo α -amino com a carboxila terminal na etapa de formação do imunossensor. Com o peptídeo ainda na resina, o grupo protetor da cadeia lateral da lisina (Mtt), foi removido seletivamente, utilizando 1% de TFA em DCM (duas vezes por 30 min). Em seguida, a resina foi submetida a teste de ninidrina, mostrando um resultado positivo, em relação a grupos aminos livres, indicando sucesso na desproteção seletiva. Para sintetizar o conjugado, o anidrido 3-ferrocenilpropionico e a peptidil resina, na mesma proporção em termos molares, foram colocados em presença de DCM e DMF durante 24 h. O grupo carboxila na forma de anidrido é ativo para o acoplamento, não precisando de ativadores, reagindo com o grupo ϵ -amino da lisina através da formação de uma ligação amida e resultando no peptídeo desejado: Ac-Cys-Ile-Ile-Lys(fc)-Ile-Ile-COOH. No entanto, após este período o teste de ninidrina foi positivo, indicando que nem todos os grupos ϵ -amino reagiram. Desta forma, foram avaliados outros solventes durante a etapa de acoplamento: DCM contendo 50% de NMP (N-metil-2-pirrolidona) durante 24 h (não eficaz)

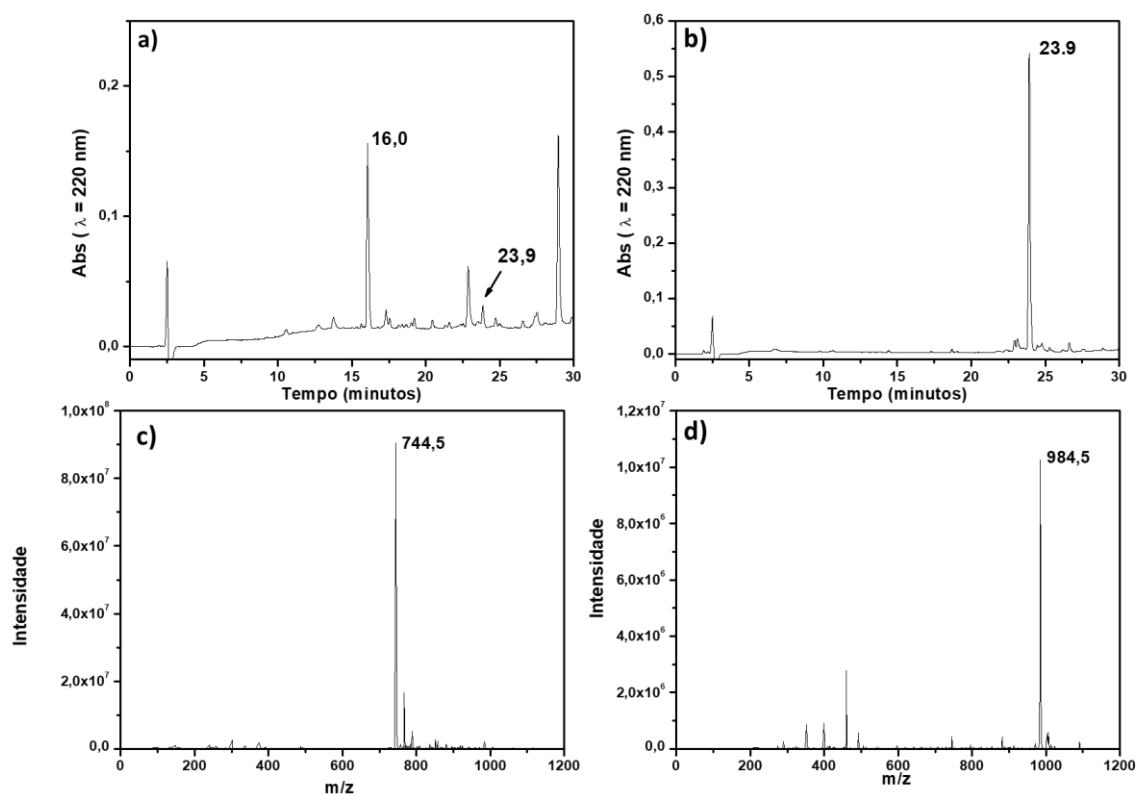
e, em seguida, DCM contendo 10% de HFIP (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol) durante 24 h. Utilizando esse último solvente, o teste de ninidrina apresentou coloração azul clara, indicando que quase todos os grupos ϵ -amino reagiram.

Após a síntese, o peptídeo foi clivado da resina. Nesta etapa, diferentes soluções de clivagens foram testadas, visto que não se conhecia a estabilidade do ferroceno na presença dos supressores de reações colaterais utilizados. As soluções avaliadas foram: 1) 94% de TFA, 2,5% de H₂O, 2,5% de EDT e 1% de TIS (1); 2) 82,5% de TFA, 5% de TIS, 5% de H₂O, 5% de fenol e 2,5% de EDT (2); 3) 95% de TFA e 5% de H₂O (3); e 4) 95% de TFA, 2,5% de TIS e 2,5% H₂O (4). O melhor resultado, avaliado por CLAE, foi obtido quando a solução (1) foi utilizada, como mostrado em tese de mestrado (PICCOLI, 2015).

Além disso, como pode ser visto na figura 10, o pico relacionado com o peptídeo sem o acoplamento do ferroceno ainda está presente após a síntese ($t = 16$ min), o que indica duas possibilidades diferentes: a remoção seletiva do grupo Mtt não foi eficaz, impossibilitando a ligação de moléculas de ferroceno no grupo ϵ -amino da Lys, ou, a reação da molécula de ferroceno com o grupo amino não foi concluída. Em ambas as situações há uma combinação dos peptídeos Ac-Cys-Ile-Ile-Lys-Ile-Ile-COOH e Ac-Cys-Ile-Ile-Lys(fc)-Ile-Ile-COOH (figura 10a). O peptídeo livre de ferroceno exibe um tempo de retenção de 16,0 min, enquanto, o peptídeo contendo ferroceno tem um tempo de retenção de 23,9 min, como o esperado devido a hidrofobicidade do ferroceno. Os espectros de massa dos peptídeos são mostrados nas figuras 10c e 10d. Os dados obtidos coincidem com os teóricos, comprovando a obtenção do material desejado.

A diferença obtida nos tempos de retenção (R_t) permitiu a purificação do peptídeo marcado com ferroceno, de modo que foi possível obter o peptídeo puro como evidenciado na figura 10b (> 95%).

Figura 10. Perfil cromatográfico do peptídeo bruto (a); peptídeo puro (b); espectro de massas referente ao peptídeo (c) e ao peptídeo conjugado com ferroceno (d).

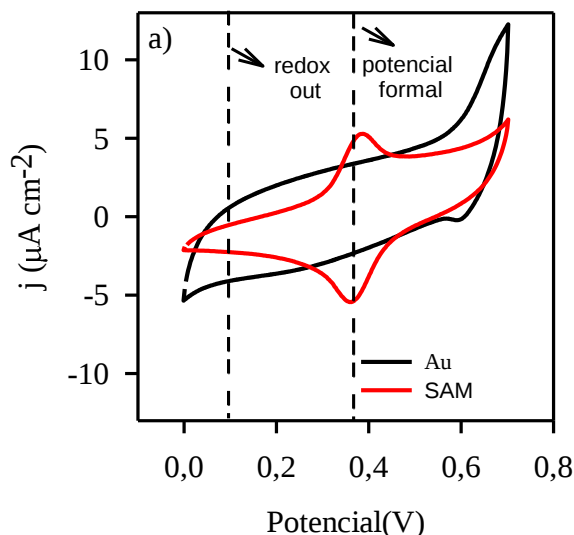


Fonte: Piccoli et al, 2016

4.1.2 Caracterização Eletroquímica

Após a obtenção do peptídeo puro e da formação da monocamada auto-organizada em eletrodo de ouro, prosseguiu-se com a caracterização eletroquímica. A capacidade do peptídeo de se ligar ao ouro ocorre devido à presença do grupo tiol presente no resíduo de cisteína. O comportamento eletroquímico foi avaliado utilizando voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). Os resultados obtidos estão mostrados na figura 11, onde as mudanças nos picos de oxidação e redução, associadas ao acoplamento redox do ferroceno (Fc/Fc^+), são visíveis. O potencial de meia-onda encontrado foi de aproximadamente 0,37 V, relativo ao eletrodo de referência. A diferença entre o pico de oxidação e o de redução é de aproximadamente 18 mV, e a relação entre j_{pa} e j_{pc} (densidade de corrente dos picos) é de 1 unidade. A análise desses resultados evidencia que o peptídeo redox foi imobilizado com sucesso na superfície do eletrodo de ouro, demonstrando uma característica de processo redox reversível.

Figura 11. Voltametria cíclica da monocamada auto-organizada constituída pelo peptídeo Ac-Cys-Ile-Ile-Lys(fc)-Ile-Ile-COOH.



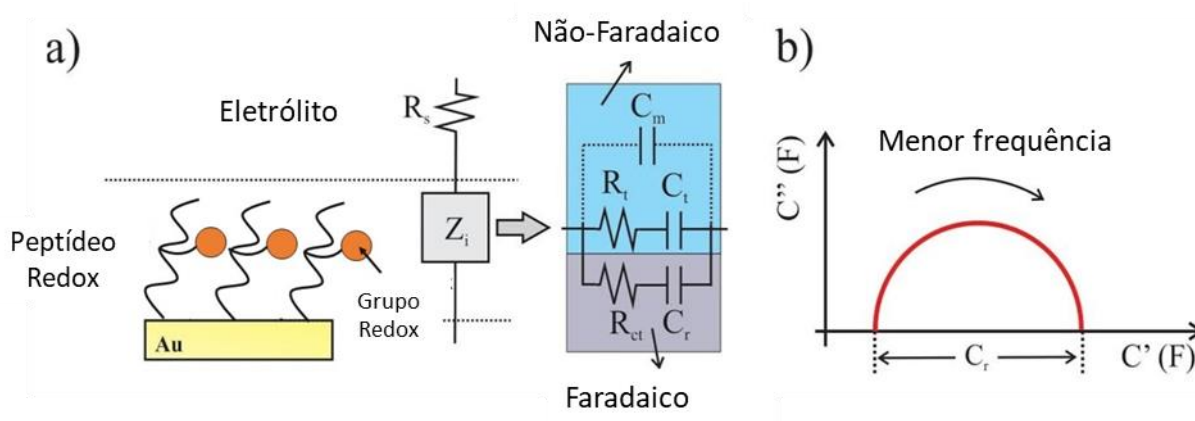
Fonte: Piccoli et al, 2016

Tem sido discutido na literatura que, as características de monocamadas formadas por peptídeos redox podem ser avaliadas através da forma dos picos de VC. Para SAMs redox livre de defeitos, a largura à meia altura (full width at half maximum-FWHM) dos picos redox, em um processo de transferência eletrônica que envolva um elétron deve corresponder a um valor de 90,6 mV (GATTO; VENANZI, 2013b; LONGO et al., 2015). Essa análise é baseada no comportamento esperado para espécies redox livres em solução, onde as análises clássicas são aplicadas (transferência eletrônica seguindo a distribuição de Nernst de potenciais redox). Porém, para monocamadas eletroativas imobilizadas no eletrodo de ouro, ocorrem desvios na distribuição de Nernst, uma vez que, as partículas redox estão agora quimicamente acopladas ao estado do metal onde o elétron é uma partícula seguindo a distribuição de Fermi-Dirac. Seguindo essas ideias, pode ser observado na voltametria cíclica da SAM (figura 11), que ambos os picos anódicos e catódicos exibem um valor maior de FWHM do que aquele esperado para uma SAM, que segue o comportamento ideal de Nernst. O valor encontrado foi de aproximadamente 100 mV.

As medidas de impedância foram conduzidas no potencial formal de 0,37 V. O comportamento impedimétrico da monocamada peptídica pode ser modelado utilizando o circuito equivalente mostrado na figura 12 (BUENO; FABREGAT-SANTIAGO; DAVIS,

2012; BUENO; MIZZON; DAVIS, 2012; GOES et al., 2012). Através dessa metodologia, é possível extrair a capacitância e outros elementos resistivos. Resumidamente, o circuito descreve a capacidade de carregamento da interface contendo a sonda redox, uma característica físico-química obtida a partir do termo de capacitância redox C_r (LEHR et al., 2014; SANTOS et al., 2014).

Figura 12. Representação esquemática do filme molecular formado pelo peptídeo Ac-Cys-Ile-Ile-Lys(fc)-Ile-Ile-COOH mostrando o carregamento faradaico e não-faradaico no circuito equivalente (a) e um Diagrama de Nyquist Capacitivo (b).



Fonte: Traduzida de Piccoli et al, 2016

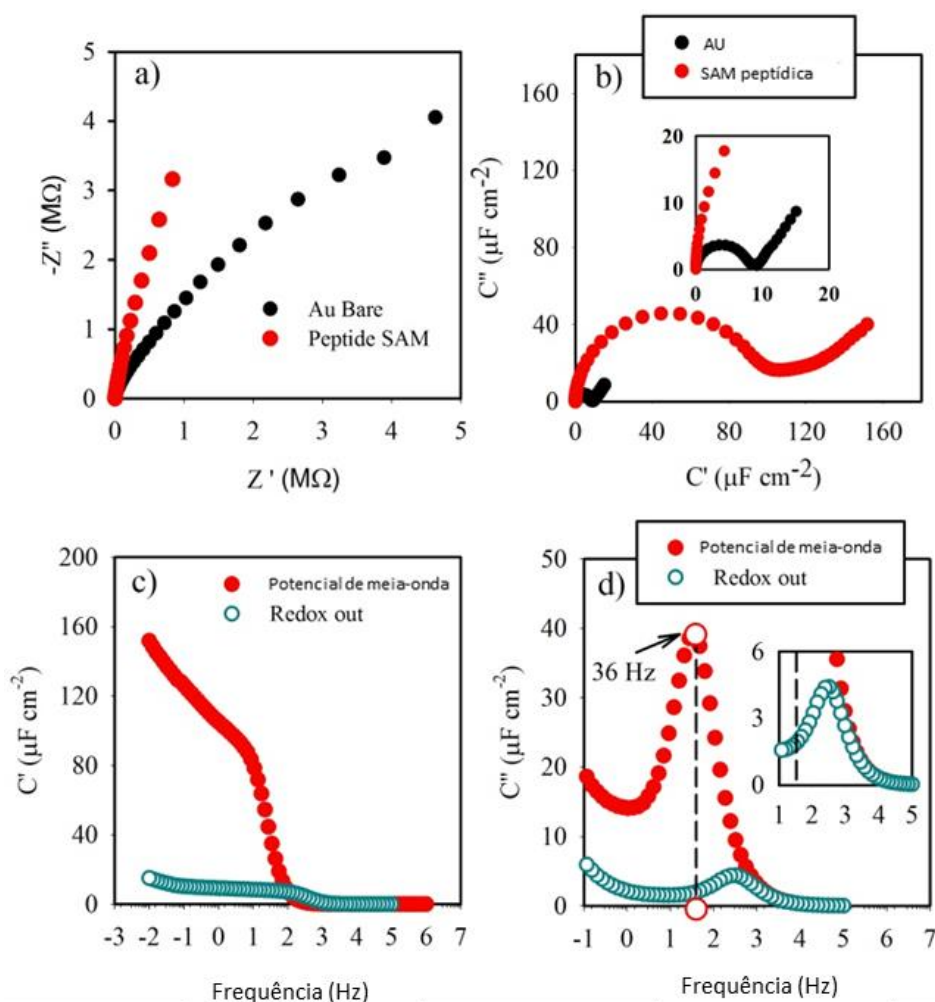
Os dados obtidos mostraram um aumento na capacitância (obtida aproximadamente a partir do diâmetro do semicírculo, como mostrado no diagrama de Nyquist - figura 12b) em comparação com o ouro. A capacitância redox muda de $10 \mu\text{F cm}^{-2}$ (principalmente devido a capacitância da dupla camada) para $105 \mu\text{F cm}^{-2}$, fornecida pela atividade redox do ferroceno confinado na monocamada peptídica, sendo maior do que a contribuição da dupla camada (evento não-faradaico).

Os resultados da figura 13 corroboram com aqueles encontrados pela voltametria cíclica (figura 11), afirmando a ideia da formação de uma SAM bem definida sobre a superfície do ouro (LEHR et al., 2014). Além disso, as figuras 13c e 13d mostram os diagramas de Bode capacitivos para potenciais de redox in (em vermelho) e redox out (em azul). Nota-se que, na figura 13d, o pico de relaxação redox (36 Hz) associado a taxa de transferência eletrônica está ausente na medida realizada em redox out. Esse fato ocorre devido à resposta obtida em um potencial fora do potencial de atividade redox do eletrodo (redox out), onde a resposta faradaica não está presente, evidenciando a contribuição da atividade redox do ferroceno presente na monocamada peptídica, comparativamente quando é medida em potenciais fora e dentro da

atividade eletroquímica. Além disso, as capacitâncias real e imaginária se encontram presentes no potencial formal e praticamente não respondem em potenciais fora da região do formal, sendo que a atividade redox do peptídeo marcado com ferroceno domina sobre o efeito eletrostático e de polarização iônica.

Como já demonstrado, a frequência em processos faradaicos de espécies redox presentes na monocamada está relacionada a constante de transferência eletrônica (k_r), a qual pode ser extraída da análise do diagrama de Bode, figura 13d (36 Hz) (BUENO; DAVIS, 2014a).

Figura 13. Diagrama de Nyquist impedimétrico (a) e capacitivo (b) para a peptídeo Ac-Cys-Ile-Ile-Lys(fc)-Ile-Ile-COOH após formação de monocamada auto-organizada sob eletrodo de ouro; Diagrama de Bode para capacitância real (C') (c) e capacitância imaginária (C'') (d).



Fonte: Piccoli et al, 2016

Com o intuito de quantificar a atividade redox da monocamada peptídica auto-organizada o recobrimento molecular foi calculado por meio de dois diferentes métodos (como

colocado em materiais e métodos). Através da voltametria cíclica foi estimado $\Gamma = (4 \pm 1) \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$ e através de EIE $(8 \pm 2) \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$ (BUENO; FABREGAT-SANTIAGO; DAVIS, 2012; BUENO; MIZZON; DAVIS, 2012; ECKERMANN et al., 2010). Para o empacotamento ideal da SAM peptídica modificada com ferroceno, considerando o peptídeo com diâmetro de 15 Å, apresentou um valor teórico de $9,4 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$, de mesma ordem de grandeza e concordante com os valores encontrados. Esses valores também se encontram de acordo com aqueles já mencionados por Gatto e Venanzi ($16,6 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$) (LONGO et al., 2015) e Lopez-Perez ($10,0 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$) (LÓPEZ-PÉREZ et al., 2012). O peptídeo Ac-Ile-Ile-Lys(fc)-Ile-Ile-COOH apresentou menor compactação, o qual pode ser explicado devido a posição do ferroceno na cadeia lateral da lisina, uma vez que, os peptídeos dos autores em questão não possuem sonda redox na cadeia lateral. Somado a isso, as cadeias laterais do aminoácido Ile são volumosas, o que pode impedir maior compactação.

Apesar dos resultados acima, quando a construção do immunosensor foi realizada, os resultados não foram adequados, sendo que, a imobilização do anticorpo não foi eficiente, e, somado a isso, o rendimento obtido da síntese foi baixo, provavelmente devido a cadeia lateral volumosa da Ile, o que dificulta a desproteção do grupo Mtt e o acoplamento do ferroceno.

Os dados aqui obtidos mostraram que, o peptídeo de sequência Ac-Ala-Ala-Lys(fc)-Ala-Ala-COOH, previamente estudado, foi mais adequado em formar a SAM que a sequência contendo Ile, provavelmente devido a maior compactação obtida (SANTOS, ADRIANO; PICCOLI, JULIA P.; SANTOS-FILHO, NORIVAL A.; CILLI, EDUARDO M.; BUENO, PAULO R. Redox-tagged peptide for capacitive diagnostic assays. *Biosensors & Bioelectronics*, v.68, p.281 - 287, 2015). Como o modelo proposto não foi satisfatório, voltou-se para o uso da alanina como aminoácido central em novas cadeias peptídicas. No entanto, visto que, grupos volumosos na cadeia peptídica pareciam dificultar a compactação da monocamada, o grupo ferroceno foi colocado na extremidade, além de diminuir o tamanho da cadeia peptídica (GATTO; VENANZI, 2013b; ORLOWSKI; CHOWDHURY; KRAATZ, 2007).

4.2 Peptídeo: Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂

Os resultados anteriormente obtidos levaram a utilizar a Ala como aminoácido central para o desenho de novos peptídeos. O seu pequeno tamanho e sua hidrofobicidade permitem maior compactação da SAM, que outros resíduos mais volumosos (NOWINSKI et al., 2012). A glicina não foi utilizada devido a sua baixa hidrofobicidade. Somado a isso, o ferroceno foi retirado do meio do peptídeo e colocado na extremidade N-terminal para aumentar a compactação entre as cadeias. O ferroceno na extremidade do peptídeo e consequentemente da monocamada, também permitiria maior acesso desse centro redox as alterações eletrônicas quando ocorresse a interação com o analito (ORLOWSKI; CHOWDHURY; KRAATZ, 2007).

Para a ligação do ferroceno e do anticorpo ao peptídeo foi adicionado um resíduo de ácido glutâmico na extremidade N-terminal, pois o ferroceno seria ligado ao grupo amino terminal e o anticorpo ao grupo γ -carboxila de sua cadeia lateral.

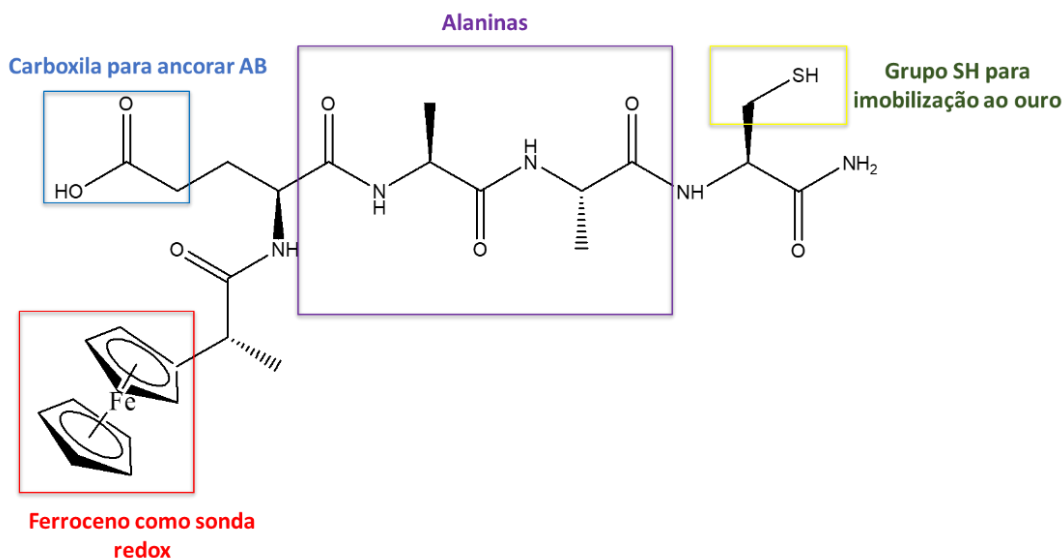
Um peptídeo com a estrutura Fc-Lys-Ala-Ala-Cys-NH₂, foi inicialmente pensado no trabalho de mestrado (PICCOLI, 2015), no entanto, foi utilizado a lisina como aminoácido para acoplamento do ferroceno, através do seu grupo ϵ -amino. Para o acoplamento do anticorpo ao peptídeo, o grupo carboxila que seria ativado foi o existente no anticorpo, que, após a ativação poderia promover inúmeras reações colaterais e não somente aquela com o peptídeo (FISCHER, 2010). Entre elas pode-se citar, o acoplamento anticorpo/anticorpo, visto que a ativação do grupo carboxila do anticorpo permitiria o ataque nucleofílico tanto à Lys existente na monocamada, como dos grupos aminos de outro anticorpo (resíduos de Lys, α -amino grupos, etc). Sendo assim, o uso do ácido glutâmico (Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂) permite que somente a monocamada seja ativada, pois o ativador é colocado em contato com a cadeia lateral do ácido glutâmico existente na monocamada, lavagens são efetuadas e posteriormente o anticorpo é adicionado, evitando a ativação de outros grupos, e reações colaterais.

Outra modificação, em relação ao peptídeo contendo Ile, foi a utilização da resina Rink amida, obtendo-se o peptídeo na forma carboxiamida (JUBILUT et al., 2007). Como o grupo carboxila existente na cadeia lateral do ácido glutâmico seria o responsável pela reação com o anticorpo, a ausência do grupo carboxila na extremidade C-terminal é importante para evitar outras reações colaterais.

Um novo peptídeo foi desenhado baseado nos peptídeos anteriores, sendo o peptídeo final composto por dois resíduos de alanina. Essa modificação foi realizada no intuito de formar uma SAM com empacotamento mais denso e definido. Os outros aminoácidos foram: 1) a cisteína, que foi utilizada para ser ligada covalentemente a um eletrodo de ouro, através do seu

grupo sulfidril; e 2) o ácido glutâmico, que permite o acoplamento do ferroceno na cadeia principal do peptídeo, molécula esta responsável pelo sinal eletroquímico, ao mesmo tempo que o grupo carboxila da cadeia lateral é utilizado para o acoplamento do anticorpo para formar o imunossensor. A estrutura do novo peptídeo encontra-se na figura abaixo.

Figura 14. Estrutura química do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂.



Fonte: Própria Autora. Software ChemDraw Pro 12.0.

4.2.1 Síntese do Peptídeo

Para a síntese do peptídeo contendo o grupo molecular ferroceno (fc), de sequência: Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂, foi realizada a técnica Fmoc utilizando a resina Rink-Amida. Na formação do conjugado ferroceno-peptídeo, foi utilizado um equivalente do anidrido 3-ferrocenilpropionico para cada equivalente de peptidil-resina (Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂) existente, em DCM e DMF (1/1; v/v) durante 24 h.

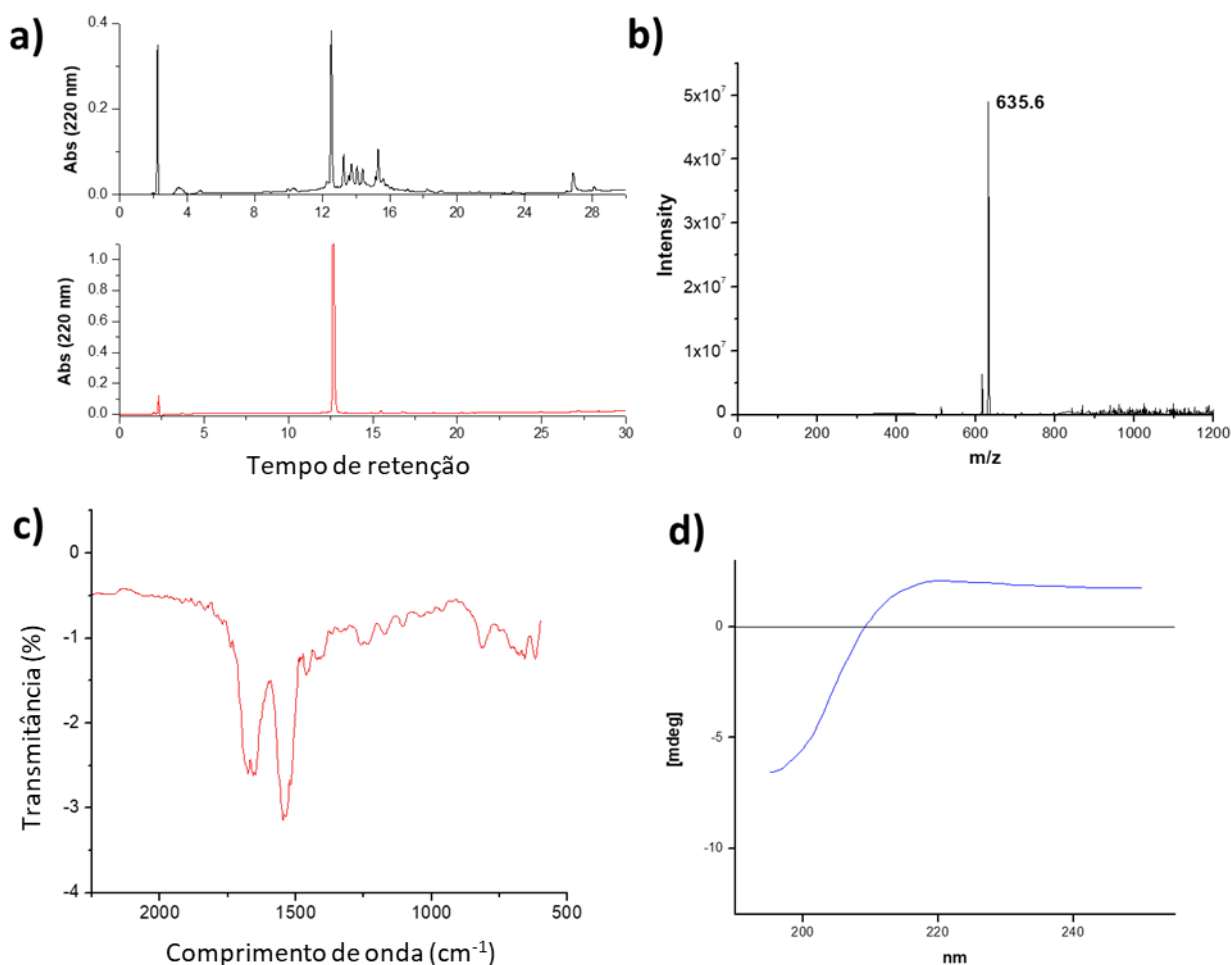
O anidrido 3-ferrocenilpropionico, como já explicado anteriormente, possui um grupo carboxila ativo na forma de anidrido, de modo que reage com o grupo alfa-amino do ácido glutâmico presente na cadeia principal do peptídeo, formando uma ligação amida, resultando no peptídeo de interesse. A síntese foi mais fácil em termos de eficácia de acoplamento que as anteriores, provavelmente devido a diminuição do impedimento estérico.

Foi utilizada uma solução de clivagem contendo 94% de TFA, 2,5% de H₂O, 2,5% de EDT e 1% de TIS, de acordo com o procedimento explicado anteriormente. O peptídeo apresentou tempo de retenção em 12,5 min e a caracterização encontra-se na figura 15a. Depois

de obtido o material de interesse, a purificação foi realizada com sucesso (Figura 15b). A obtenção do material desejado foi confirmada por espectrometria de massas. Ressalta-se que, durante a purificação foi observado que o ferroceno é instável em TFA (meio ácido), sendo necessário que o processamento do peptídeo seja rápido para evitar a decomposição do material desejado. A massa molar teórica de 634 g mol^{-1} foi igual a obtida [$635 \text{ g mol}^{-1} = \text{MM} + 1$ (carga do íon hidrogênio)].

Análises por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) do filme peptídico mostrou uma ressonância em 1550 cm^{-1} , própria de amida II, e em 1654 cm^{-1} (figura 15c), característico de banda de amida I em estrutura secundária não definida (random coil) de peptídeo, em concordância com o dicroísmo circular realizado, onde tem-se uma banda negativa em 195 nm e uma positiva de baixa intensidade em torno de 210 nm (Figura 15d).

Figura 15. Cromatograma do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ bruto em preto e puro em vermelho (>98% de pureza) (a); espectro de massas do peptídeo redox (b); espectro do FTIR da monocamada peptídica redox em eletrodo de ouro (c); espectro de dicroísmo circular do peptídeo em solução (d).

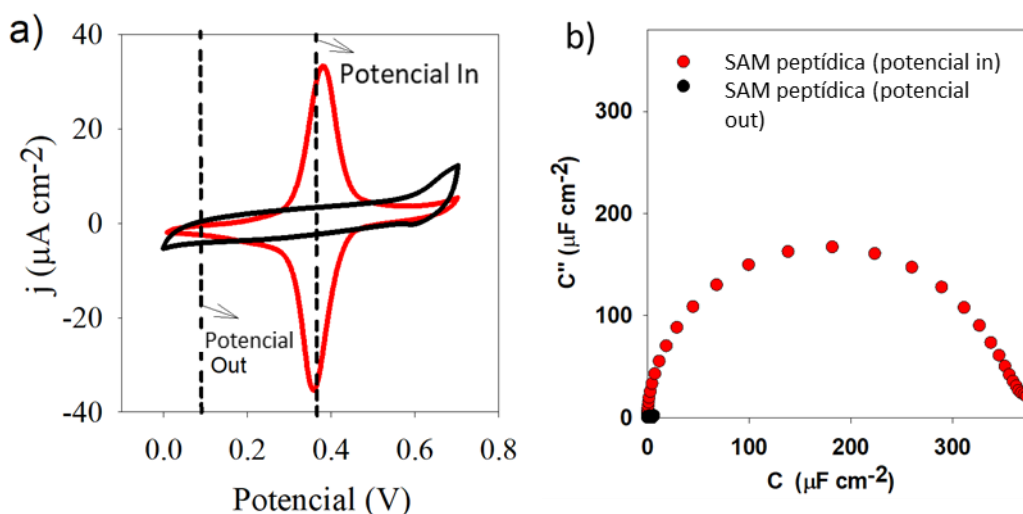


4.2.2 Caracterização Eletroquímica

Após a obtenção, o peptídeo foi imobilizado no eletrodo de ouro, e as medidas eletroquímicas foram realizadas. Com o propósito de caracterizar a monocamada redox, medidas de voltametria cíclica foram primeiramente conduzidas em eletrólito suporte TBA-ClO₄. Como pode ser visto na figura 16a, o peptídeo foi imobilizado com sucesso e é possível identificar os picos anódicos e catódicos, presentes devido a oxidação reversível do ferroceno localizado na cadeia principal do peptídeo, esses processos estão relacionados com a reação $Fc \rightleftharpoons Fc^+ + e^-$. O potencial de meia-onda (região faradaica) obtido foi de 360 mV. Do voltamograma, pode-se notar que, a diferença entre os potenciais de oxidação e redução é ~ 20 mV, e a relação i_A/i_C (quociente entre a corrente de pico anódica e catódica) é ~ 1 , comprovando que o filme apresenta processo redox reversível (ECKERMANN et al., 2010). As medidas de impedância foram realizadas e convertidas em capacitância. Os ensaios de impedância realizados na região faradaica para o eletrodo de ouro após a formação da monocamada, quando convertidas para capacitância mostraram claramente um aumento dos valores obtidos por aproximação do diâmetro do semicírculo: $\sim 300 \mu F cm^{-2}$. Esse valor está relacionado com a capacidade do filme em armazenar energia, ou mais especificamente, com a capacitância relacionada com o processo faradaico do filme contendo par redox (BUENO; DAVIS, 2014b), tornando-se evidente a formação de um filme denso e compacto (figura 16b), devido ao alto valor de capacitância redox encontrada.

Na figura 16a são mostradas as regiões de potencial *out* (potencial no qual não ocorre reação faradaica) e potencial *in* (potencial formal).

Figura 16. Voltametria cíclica obtida antes e após a formação da monocamada peptídica Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ (a); exemplo de medida de capacitância obtida no potencial in (~0,360 V) (b).



Fonte: Própria Autora. Software SigmaPlot 11.0.

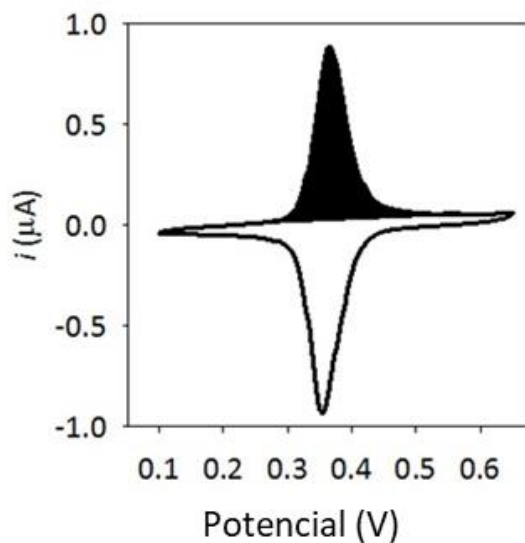
4.2.3 Recobrimento Molecular da Monocamada Peptídica

O recobrimento molecular foi calculado a partir dos resultados de voltametria cíclica após a formação da monocamada peptídica, assim como por varredura eletroquímica do tiol (ECKERMANN et al., 2010; ELGRISHI et al., 2018). Para o método utilizando VC, a carga associada à oxidação do sistema, devido a presença do ferroceno, foi determinada da seguinte maneira:

$$Q = \frac{1}{\nu} \int iV' dV' \quad (11)$$

o que corresponde a área preenchida da figura a seguir dividida pela velocidade de varredura ν (100 mV s⁻¹):

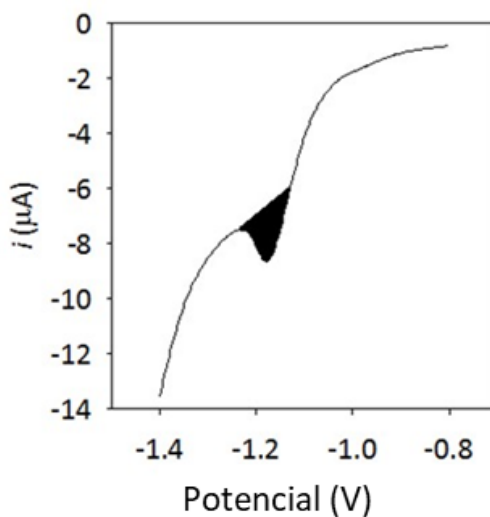
Figura 17. Voltametria Cíclica da SAM formada pelo peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ (em 20 mM TBAClO₄ ACN/H₂O 1:4, velocidade de varredura 100 mV s⁻¹).



Fonte: Piccoli et al, 2018

A carga associada a redução do tiol quando ocorre a dessorção do ouro é obtida a partir da área pintada do pico presente na figura abaixo (KAKIUCHI et al., 2002).

Figura 18. Dessorção por Voltametria Cíclica SAM formada pelo peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ (em 0.5 M KOH, velocidade de varredura 100 mV s⁻¹).



Fonte: Piccoli et al, 2018

O recobrimento molecular (Γ , mol cm⁻²) foi calculado através da equação abaixo

$$\Gamma = \frac{Q}{F \times A_e} \quad (12)$$

Adicionalmente, o mesmo também foi calculado através do valor de capacitância redox (GOES et al., 2012), como mostrado a seguir:

$$\Gamma = \frac{4C_r k_B T}{eF} \quad (13)$$

Os resultados obtidos encontram-se na tabela 4. Os valores podem ser comparados com alguns peptídeos contendo cisteína já reportados na literatura ($14,4 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$), demonstrando que a sequência aqui desenhada possui empacotamento denso (GATTO; VENANZI, 2013b, 2013a; LONGO et al., 2015).

Tabela 4. Comparação do recobrimento molecular da monocamada peptídica redox do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ obtido por três diferentes métodos.

Métodos	Recobrimento Molecular ($10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$)
VC	1.28 ± 0.01
KOH	2.47 ± 0.20
C _r	2.63 ± 0.07

Fonte: Piccoli et al, 2018

4.2.4 Método Laviron para determinação da constante de transferência eletrônica

O método de Laviron para determinar o valor da constante de transferência eletrônica (k_r) é baseado na adsorção, que pode ser feita experimentalmente elevando-se as velocidades de varredura (LAVIRON, 1979a). Tal metodologia pode ser utilizada variando a velocidade de varredura de baixas à altas ($0,01 \text{ V s}^{-1}$ - 5 V s^{-1}), o que apresenta dois comportamentos distintos do sistema (ECKERMANN et al., 2010; LAVIRON, 1979b, 1979a). Em baixas velocidades o processo é considerado difusional, quando o ΔV_p não mostra grandes diferenças nos voltamogramas, enquanto que, nas velocidades mais rápidas o processo ocorre sem difusão, e a separação dos picos é maior. Assim, para determinar k_r o pico do potencial é plotado versus o log da velocidade de varredura (figura 19 b). O valor do coeficiente angular em velocidades mais rápidas (1 V s^{-1}) é utilizado para determinar o parâmetro do coeficiente de transferência eletrônica α , que está relacionado a barreira energética do sistema eletroquímico, de acordo com as fórmulas abaixo (ECKERMANN et al., 2010; LAVIRON, 1979a).

$$slope = \frac{2,3*RT}{(1-\alpha)nF} \quad (14)$$

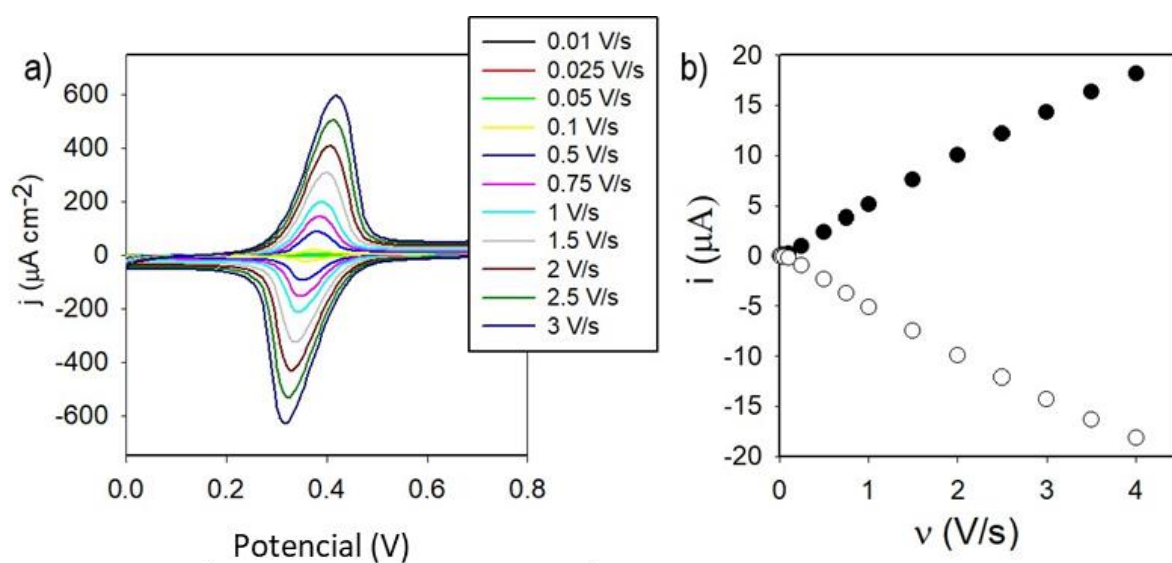
$$slope = \frac{-2,3*RT}{\alpha nF} \quad (15)$$

O k_r pode ser determinado aplicando-se a restrição de $n = 0$ quando o log é aplicado na equação acima, reduzindo a:

$$k_r = \frac{\alpha n F v_c}{RT} = \frac{(1-\alpha) n F v_a}{RT} \quad (16)$$

Determinando a intercepção de x para os gráficos anódicos e catódicos tem-se v_a e v_c , respectivamente. O coeficiente de transferência (α) é a medida de simetria da energia da reação redox. Em sistemas ideais o valor é de 0,5, contudo, é sabido que os sistemas não são ideais, e assim, ainda é possível calcular k_r para valores entre 0,3 e 0,7. De acordo com Laviron pode-se aceitar um erro relativo em torno de 6% (LAVIRON, 1979a).

Figura 19. Voltamogramas cíclicos da SAM peptídica Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ em diferentes velocidades de varredura (a) e, picos de corrente anódicos e catódicos em diferentes velocidades de varredura (b).

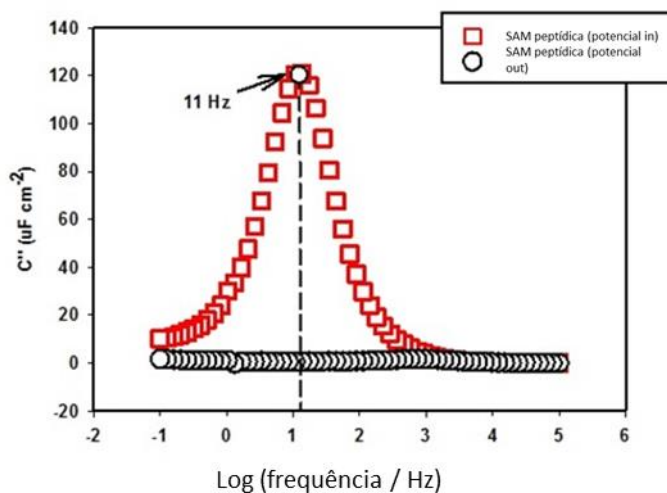


Fonte: Piccoli et al, 2018

Em processos faradaicos de espécies redox confinadas em filmes eletroativos, como já demonstrado, k_r pode ser obtido a partir do diagrama de Bode como pode ser visto na figura 20, desde que o experimento tenha sido realizado dentro do potencial formal, onde os estados eletrônicos da sonda estão acoplados ao eletrodo em um processo de equilíbrio (BUENO; FABREGAT-SANTIAGO; DAVIS, 2012; BUENO; MIZZON; DAVIS, 2012). A perturbação da frequência máxima nesse caso ocorre próximo a 0,09 Hz, onde a resistividade é mínima e a capacitância máxima. Uma vez que condutividade (inverso da resistência) é proporcional a capacitância imaginária, o pico do diagrama de Bode corresponde a k_r , o que equivale a $11,50 \pm 0,71 \text{ s}^{-1}$, em concordância com o obtido pelo método de Laviron.

Pode-se notar também que, o pico no qual se encontra o valor de transferência eletrônica está ausente no gráfico onde o potencial aplicado encontra-se na região não faradaica, o que se deve ao fato que nessa região não ocorre o acoplamento eletrônico do sistema. Na tabela 5 pode-se ver como os valores obtidos por ambas metodologias estão próximos e dentro do erro.

Figura 20. Diagrama de Bode para capacitância imaginária da SAM formada pelo peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂.



Fonte: Própria Autora. Software SigmaPlot 11.0.

Tabela 5. Comparação de valores de k_r para SAM do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ obtidos por diferentes metodologias.

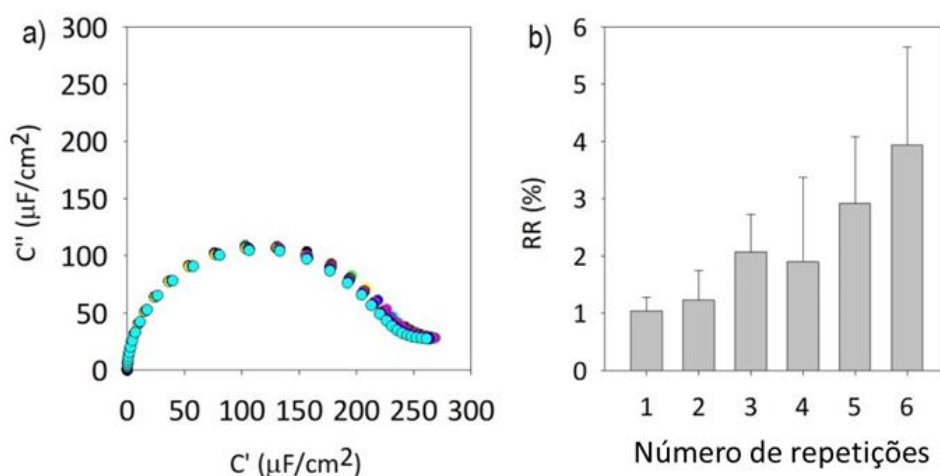
	Valores
k_r por Capacitância	$11,50 \pm 0,71 \text{ s}^{-1}$
k_r por Laviron	$12,27 \pm 3,80 \text{ s}^{-1}$

Fonte: Própria Autora.

4.2.5 Caracterização do imunossensor

A estabilidade do sensor foi testada frente a diferentes etapas de incubações com tampão PBS, durante 30 min. Em seguida medidas de impedância foram realizadas e o procedimento repetido 6 vezes (figura 21). Qualquer variação de C_r maior que a diferença obtida na estabilidade da monocamada peptídica seria devido à interação receptor/alvo.

Figura 21. Estabilidade da SAM formada pelo peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂. Diagrama de Nyquist Capacitivo após cada incubação em PBS (a) e sua respectiva alteração na resposta relativa da capacitância redox após cada incubação (b).



Fonte: Piccoli et al, 2018.

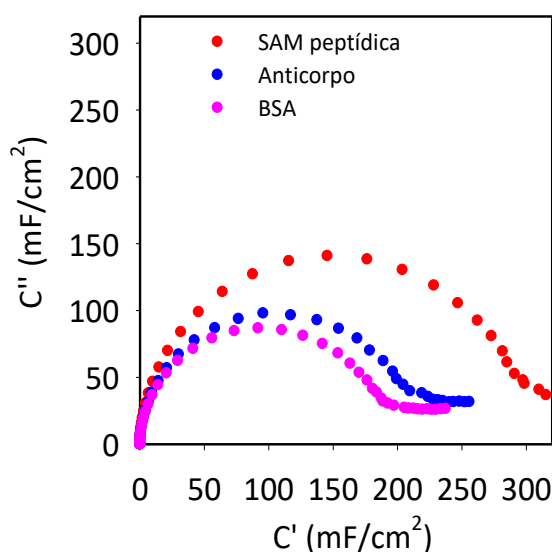
Estudos têm demonstrado que a capacidade de armazenamento eletroquímico da monocamada auto-organizada é susceptível ao acoplamento receptor-ligante que ocorre nas proximidades do grupo redox (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2016; YANG et al., 1995). Desta forma, o peptídeo foi utilizado como plataforma para detectar a proteína CRP diluída em solução tampão PBS.

Para construir o imunossensor, o anti-CRP, foi imobilizado no peptídeo. Para a ativação dos grupos carboxílicos do ácido glutâmico presente no peptídeo, visando a ligação

com o anticorpo, o eletrodo foi mergulhado em solução aquosa contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NHS e $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ de EDC, por 30 min. Posteriormente, o eletrodo foi lavado com água e mergulhado numa solução contendo $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de anticorpo por 1 h. Para bloquear os sítios remanescentes foi utilizado solução de BSA 0,1%, mergulhando o eletrodo por 30 min na solução.

Os processos de imobilização do anticorpo e bloqueio foram avaliados pela espectroscopia de impedância eletroquímica. Na figura 22 são mostrados os diagramas de Nyquist obtidos na região faradaica para esses processos. Uma vez que alterações nos valores de capacitância redox estão relacionadas com a modificação da superfície, as variações de C_r observadas na figura 22, sugerem que a superfície foi modificada com êxito (GOES et al., 2012).

Figura 22. Diagrama de Nyquist capacitivo, obtido na região faradaica para os processos de modificação do eletrodo contendo SAM formada pelo peptídeo de Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ (vermelho), anti-CRP (azul) e bloqueio com BSA (roxo).

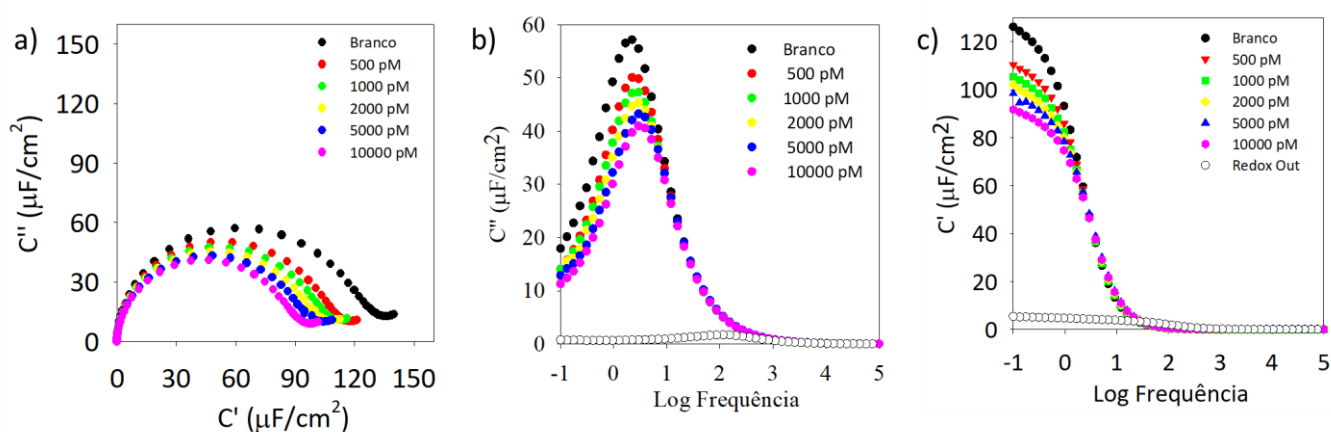


Fonte: Própria Autora. Software SigmaPlot 11.0.

Após a modificação do eletrodo de ouro com o anticorpo, avaliou-se por impedância eletroquímica a resposta de capacitância eletroquímica frente a diferentes concentrações crescentes do analito CRP (figura 23). Quando os dados complexos de impedância em função da frequência [$Z^*(\omega)$] são convertidos para capacitância [$C^*(\omega)$], torna-se possível verificar a alteração nos diagramas de Nyquist em função da concentração do analito. Desta forma, os valores de capacitância eletroquímica (C_r) podem ser obtidos facilmente pelo diâmetro do semicírculo. Além disso, através dos diagramas de Bode pode-se ver que as medidas realizadas

fora da região faradaica não responde às diferentes concentrações de CRP, indicando que o sistema é sensível somente na região faradaica (potencial in).

Figura 23. Diagrama de Nyquist Capacitivo (a); e diagrama de Bode capacitivo para capacitância imaginária (b) e capacitância real (c) do imunossensor constituído por monocamada do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂, demonstrando a sensibilidade frente a CRP na região faradaica do sistema e ausência de resposta do sensor na região não faradaica (círculos brancos).



Fonte: Própria Autora. Software SigmaPlot 11.0.

Os dados de capacitância eletroquímica foram utilizados com o objetivo de construir a curva de calibração com cinco diferentes concentrações de CRP, na faixa clinicamente útil de 0,5-10 nmol L⁻¹. A curva de calibração mostrada na figura 24 apresenta comportamento linear em função do logaritmo da concentração de CRP na faixa estudada.

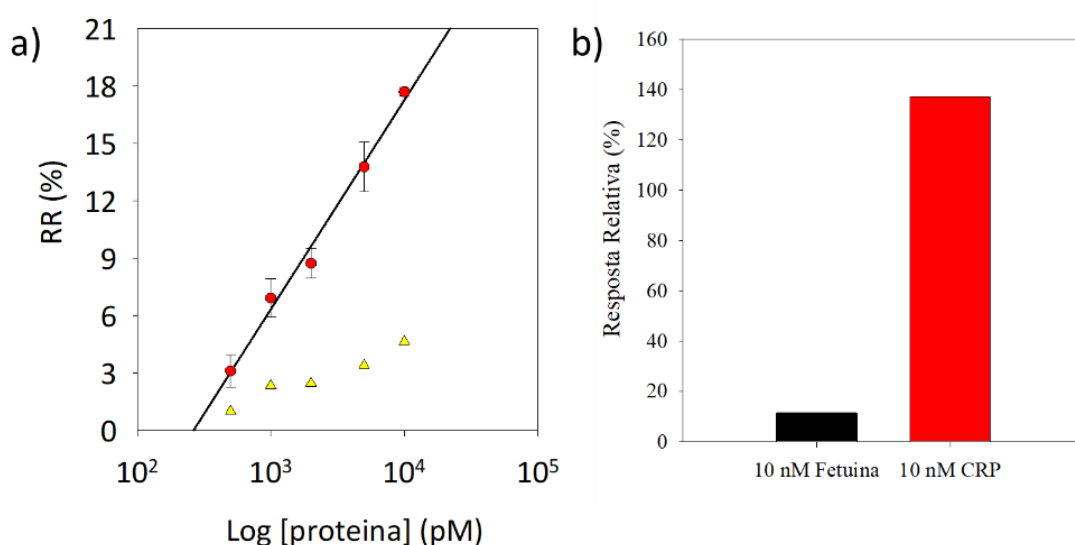
Para avaliar o desempenho analítico alguns parâmetros foram obtidos, como a sensibilidade (coeficiente angular da curva de calibração), limite de detecção (LDD) e especificidade (resposta do ensaio frente a uma proteína não específica, neste caso a fetuína e a BSA).

A sensibilidade do ensaio encontrada foi de 11,4 por década de concentração do analito, com um LDD de 0,24 nmol L⁻¹ (240 pmol L⁻¹), na faixa linear de 0,05-10 nmol L⁻¹. O LDD apresenta valor menor daquele encontrado para o ELISA (500 pmol L⁻¹) (RIDKER et al., 2000) e na mesma grandeza para o obtido por capacitância redox (500 pmol L⁻¹) (JOHNSON et al., 2012). Importante notar que o LDD obtido se encontra abaixo do cut-off de 30 nmol L⁻¹ (valor entendido como sendo o limite que evidencia risco de doenças cardiovasculares) (PEPYS; HIRSCHFIELD, 2003).

Para avaliar a especificidade, foi utilizada uma solução de fetuína 10 nmoL L⁻¹ ao invés de CRP, apresentando valor de sinal não superior à 10% do obtido para a CRP em 10 nmoL L⁻¹.

¹ (figura 24b). Além disso, a BSA também foi utilizada, nas mesmas concentrações de CRP, para comparação da resposta relativa na curva de calibração (figura 24a).

Figura 24. Resposta relativa após cada incubação do imunossensor constituído por monocamada do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ em crescentes concentrações de CRP (círculos vermelhos) e, depois de incubação com BSA (triângulos amarelos) (a); comparação com 10 nM de Fetuína e 10 nM de CRP (b). Barras de erros representam o desvio relativo das medidas em três eletrodos diferentes.



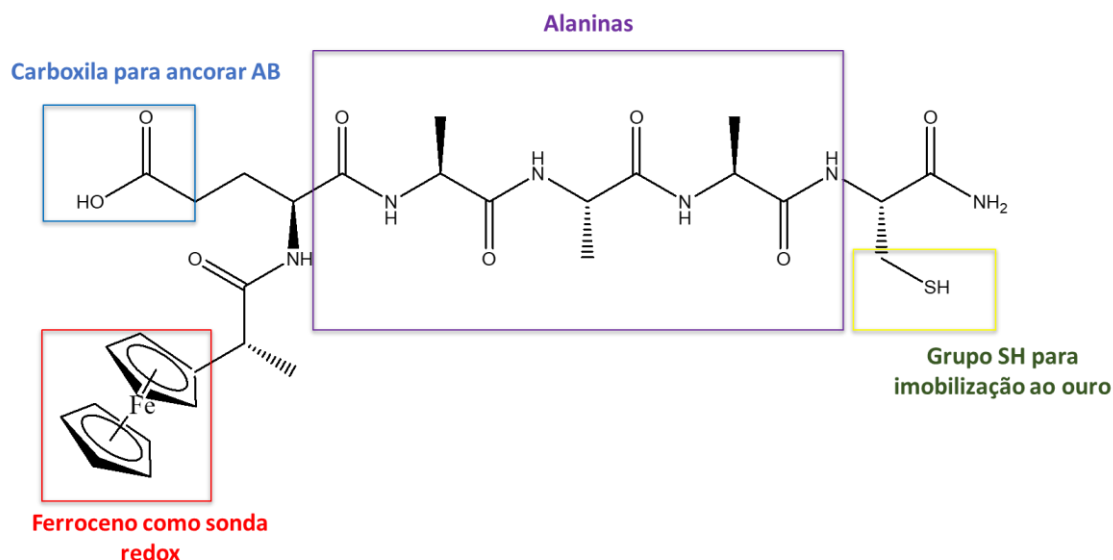
Fonte: Própria Autora. Software SigmaPlot 11.0.

Como os resultados obtidos para o imunossensor formado pelo peptídeo contendo duas alaninas foram os melhores, em termos de seletividade e sensibilidade, que os encontrados anteriormente para a monocamada mista de aciltióis (FERNANDES et al., 2014), foi avaliado se o aumento ou diminuição do tamanho da cadeia peptídica (número de alaninas da cadeia) afetaria as propriedades do imunossensor. Para isso novos peptídeos foram sintetizados e avaliados, um com um resíduo a mais de alanina e outro com um resíduo a menos. Lembrando que, os demais aminoácidos foram mantidos.

4.3 Peptídeo: Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH₂

Inicialmente o peptídeo com uma alanina a mais foi sintetizado. A estrutura do novo peptídeo encontra-se apresentada na figura abaixo.

Figura 25. Estrutura química do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH₂.



Fonte: Própria Autora. Software ChemDraw 12.0.

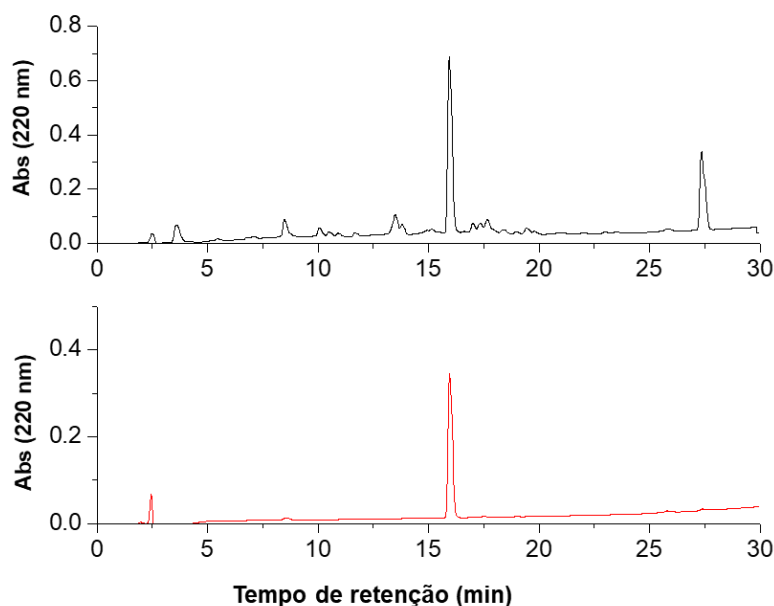
4.3.1 Síntese do Peptídeo

Da mesma forma que o peptídeo anterior, o peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH₂ foi sintetizado, utilizando a resina rink amida para obter a extremidade C-terminal amidada, evitando-se além das reações colaterais descritas anteriormente, a carga negativa da carboxila, que poderia dificultar a imobilização ao eletrodo de ouro.

Após a síntese do peptídeo, o grupo Fmoc foi retirado e o anidrido 3-ferrocenilpropionico foi acoplado à peptidil-resina em sua extremidade N-terminal. Nessa reação não foi utilizado excesso devido ao alto custo do ferroceno, e o acoplamento ocorreu por 24 h, utilizando-se como meio reacional uma solução de DMC e DMF (50:50). O teste de ninidrina confirmou o acoplamento do ferroceno. Após a obtenção do peptídeo contendo o ferroceno, a peptidil-resina foi submetida a clivagem utilizando uma solução contendo: 94% de TFA, 2,5% de H₂O, 2,5% de EDT e 1% de TIS. Na figura 26 está apresentado o perfil cromatográfico do peptídeo bruto, com tempo de retenção em 16,1 min. O peptídeo bruto obtido

foi purificado por CLAE e o perfil cromatográfico do peptídeo puro obtido está colocado na figura 26. A massa molar de 708 g mol^{-1} foi confirmada por espectrometria de massas.

Figura 26. Perfil cromatográfico do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH₂ bruto (preto) e puro (vermelho).



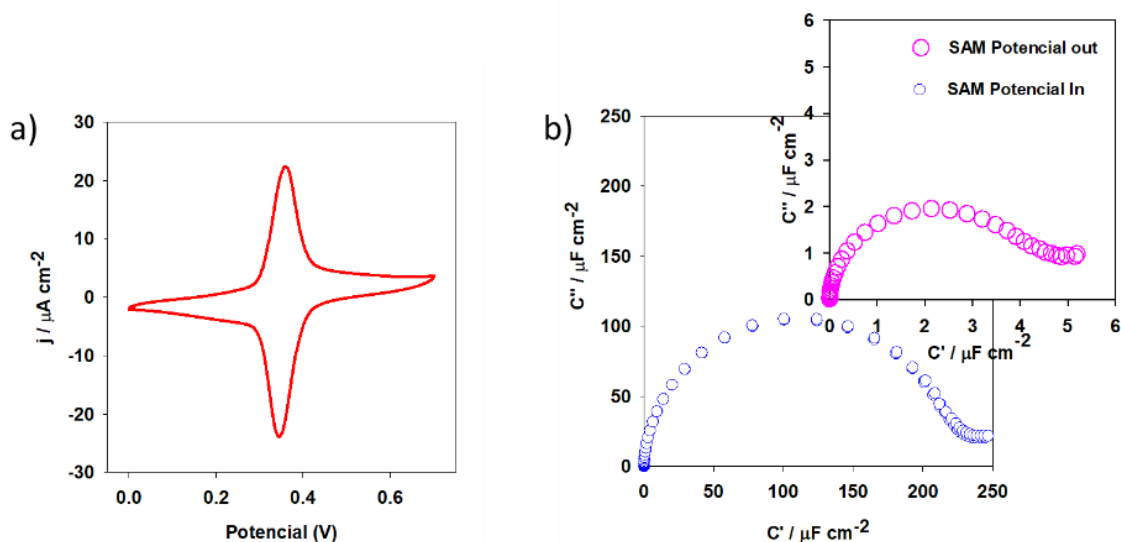
Fonte: Própria Autora. Software Origin Pro 8.

4.3.2 Caracterização Eletroquímica

Com o peptídeo puro prosseguiu-se para a caracterização eletroquímica. A SAM foi formada sob eletrodo de ouro e ciclos de voltametria cíclica foram realizados (figura 27a). O peptídeo demonstrou boa estabilidade, uma vez que, em 100 ciclos não houve considerável mudança de corrente (aproximadamente 5% de queda de sinal) (KANG et al., 2009).

O potencial de meia-onda encontrado foi de 0,35 V relativo ao eletrodo de referência e foi utilizado para a realização de medidas de impedância eletroquímica (na região faradaica). Na figura 27 b pode-se notar que o peptídeo apresentou C_r de em torno de $220 \mu\text{F cm}^{-2}$, sendo que não apresentou sinal na região não-faradaica ($4,5 \mu\text{F cm}^{-2}$)

Figura 27. Voltametria cíclica da monocamada auto-organizada formada pelo peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH₂ (a); diagrama de Nyquist capacitivo para o peptídeo em regiões faradaica e não faradaica (b).



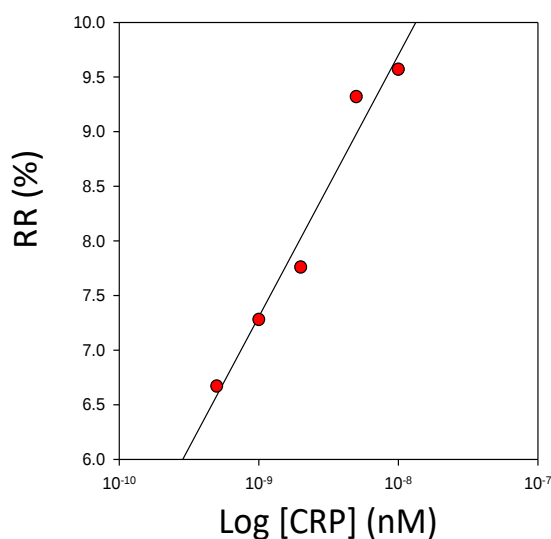
Fonte: Própria Autora. Software Origin Pro 8.

4.3.3 Caracterização do Imunossensor

Após a modificação do eletrodo de ouro com o peptídeo, o anti-CRP foi ancorado no grupo γ -carboxila presente na cadeia lateral do ácido glutâmico. Este acoplamento foi avaliado por impedância eletroquímica em resposta de capacitância frente a diferentes concentrações do analito CRP (figura 28).

O imunossensor mostrou linearidade na faixa de concentração entre 0,5 e 10 nmol L⁻¹.

Figura 28. Resposta relativa após a incubação do imunossensor contendo SAM formada pelo peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH₂ em crescentes concentrações de CRP.



Fonte: Própria Autora. Software Origin Pro 8.

A tabela 6 mostra os parâmetros analíticos obtidos. Os dados demonstram um ótimo desempenho na detecção da proteína CRP, com uma faixa de detecção de 0,5 a 10 nmol L⁻¹. Em relação aos resultados utilizando monocamadas mistas de aciltióis, o peptídeo apresentou limite de detecção de 0,30 nmol L⁻¹, similar ao valor de 0,24 nmol L⁻¹ para os aciltióis e para o peptídeo contendo 2 resíduos de alanina (FERNANDES et al., 2014). O coeficiente linear obtido utilizando peptídeo foi adequado, apesar da sensibilidade do sistema não ter sido o suficientemente baixa. Esse resultado negativo pode ser atribuído ao fato de a monocamada peptídica não ser suficientemente compacta para detecção, além de levar um tempo maior para se estabilizar. Medidas de impedância realizadas consecutivamente mostraram uma queda inicial de 10-15% no sinal, porém após 1 h ocorre uma oscilação de ~5%.

Contudo, os resultados foram menos adequados do que os obtidos anteriormente para o peptídeo com duas alaninas, mostrando que a distância entre o ferroceno e a superfície do ouro é importante na sensibilidade do sistema (DAUPHIN-DUCHARME; PLAXCO, 2016; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2016).

No entanto, estes resultados mostraram que o ferroceno acoplado na extremidade do peptídeo é a melhor opção para a formação da SAM peptídicas, sendo que a distância entre o ferroceno e a superfície do ouro poderia ser alterada, visando melhorar a sensibilidade do sistema.

Tabela 6. Parâmetros analíticos obtidos em solução tampão PBS (pH 7,4) para detecção da proteína CRP com o imunossensor contendo SAM do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH₂.

Parâmetros	Valores
Intervalo linear (nmol L⁻¹)	0,5 – 10
Coeficiente Linear (R^2)	0,98
Sensibilidade (% década⁻¹)	3,70 ± 0,90
Limite de Detecção (nmol L⁻¹)	0,30
K_a (L mol⁻¹)	(1,7 ± 0,3) x 10 ⁸
Recobrimento Molecular (mol cm⁻²)	(1,2 ± 0,2) x 10 ⁻¹⁰
Capacitância Redox SAM (μF cm⁻²)	(226,4 ± 1,4)

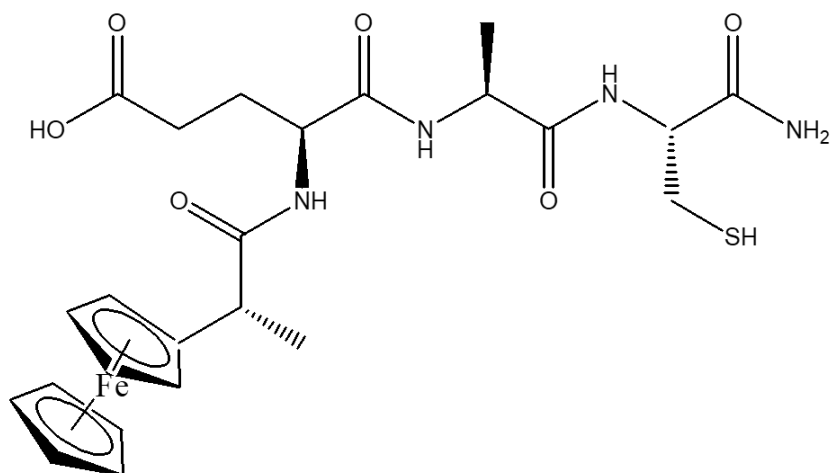
Fonte: Própria Autora

4.4 Peptídeo: Fc-Glu-Ala-Cys-NH₂

O peptídeo com três alaninas apresentou bons resultados, porém não melhores que o anterior. As sequências com duas alaninas foi a mais eficiente para uso em filmes nanoestruturados. Os resultados anteriores mostraram que, a distância menor poderia ser um fator importante nessa eficiência, sendo assim, resolveu-se diminuir a distância por meio da síntese e avaliação de um peptídeo contendo apenas uma alanina.

A estrutura do peptídeo, além de uma alanina, manteve o resíduo de cisteína amidado na extremidade C-terminal e o ácido glutâmico contendo o ferroceno no grupo α-amino na porção N-terminal (Fc-Glu-Ala-Cys-NH₂ - figura 29).

Figura 29. Estrutura Química do Peptídeo Fc-Glu-Ala-Cys-NH₂.

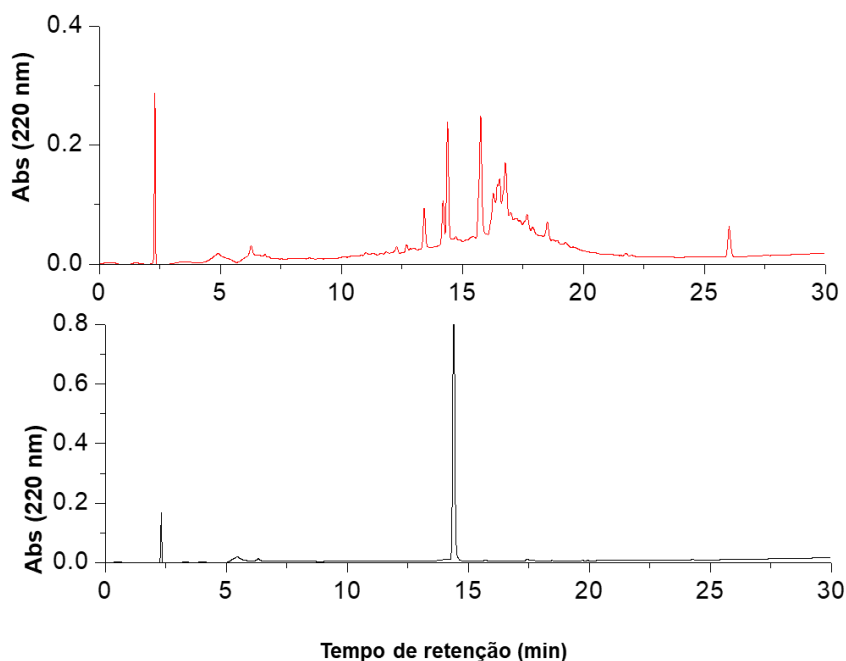


Fonte: Própria Autora Software ChemDraw Pro 12.0.

4.4.1 Síntese do Peptídeo

A síntese do peptídeo foi realizada seguindo o mesmo protocolo já mencionado. O peptídeo foi obtido com pureza > 98% como pode ser visto na figura abaixo. O tempo de retenção para esse peptídeo foi em torno de 14 min, e o peso molecular foi confirmado por espectrometria de massas 560 g mol⁻¹.

Figura 30. Perfil cromatográfico do peptídeo Fc-Glu-Ala-Cys-NH₂ bruto (vermelho) e puro (preto).



Fonte: Própria Autora. Software Origin Pro 8.

4.4.2 Caracterização Eletroquímica

O peptídeo puro foi utilizado para imobilização no eletrodo de ouro e medidas de VC e EIE foram realizadas. Nos voltamogramas obtidos pode-se notar (figura 31a) que, o peptídeo foi imobilizado com sucesso, e os processos de oxidação e redução ocorrem no sistema, gerando um potencial formal em torno de 0,38 V e picos bem definidos.

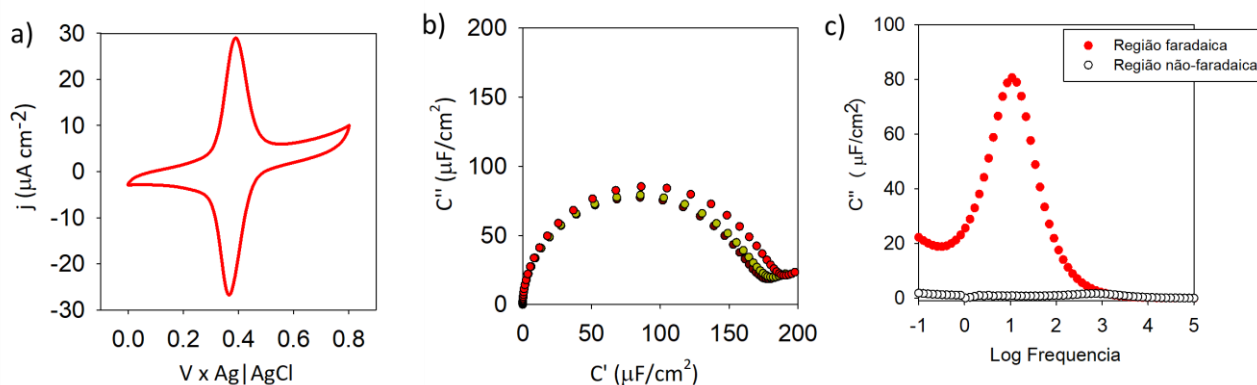
Quando medidas de impedância foram realizadas e convertidas em capacitância, o sistema demonstrou uma capacitância menor que o esperado para a monocamada, em torno de $180 \mu\text{F cm}^{-2}$. O diagrama de Bode da figura 31c também confirmou o processo redox na monocamada peptídica, com um K_r em torno de 11 s^{-1} , e sem a presença do pico fora da região faradaica, o que estava de acordo com os peptídeos anteriores.

Após a estabilização do sistema, o anti-CRP foi ancorado através do EDC/NHS, porém a diminuição da C_r foi menor que o esperado, variando de $190 \mu\text{F cm}^{-2}$ para $185 \mu\text{F cm}^{-2}$, o que levou-nos a pensar que o peptídeo contendo apenas uma alanina não é adequado para a montagem de monocamadas estruturadas e para o uso em imunossensores.

O bloqueio com BSA foi realizado, e novamente a mudança de C_r foi mínima, de $185 \mu\text{F cm}^{-2}$ para $180 \mu\text{F cm}^{-2}$ (figura 31).

Dois outros experimentos foram realizados em paralelo, enquanto dois eletrodos estavam sendo imersos em solução tampão e medidas de EIE eram realizadas, outros dois eletrodos foram avaliados em concentrações crescentes de CRP, porém não se obteve resultado satisfatório. Os eletrodos que foram submetidos a solução tampão apresentaram uma variação de C_r em torno de 7,10% (variando de $177,57 \mu\text{F cm}^{-2}$ para $163,86 \mu\text{F cm}^{-2}$), medidas realizadas durante 6 h de experimentos, o que a princípio é um bom resultado para a estabilidade do sistema, demonstrando quase nula interação com o tampão. Contudo, os eletrodos imersos em CRP apresentaram variação de apenas 5,14% (variando de $172,88 \mu\text{F cm}^{-2}$ para $163,99 \mu\text{F cm}^{-2}$), ou seja, o imunossensor não foi sensível à proteína, e mesmo quando em contato com a CRP o sinal alterava-se na mesma proporção que para o tampão. Esses resultados podem ser interpretados de duas formas diferentes: 1) a imobilização do anticorpo não foi eficiente, havendo poucas moléculas para identificação do alvo; ou 2) a monocamada não estava organizada, dificultando a visualização das alterações eletrônicas envolvidas no processo.

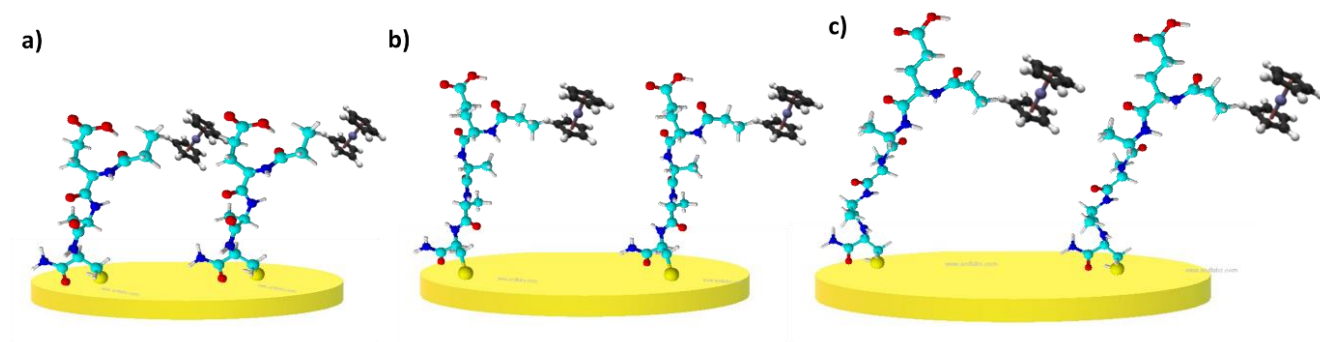
Figura 31. Voltametria Cíclica da monocamada peptídica Fc-Glu-Ala-Cys-NH₂ (a); diagrama de Nyquist capacitivo para montagem do imunossensor: SAM formada pelo peptídeo (vermelho), após imobilização do anti-CRP (verde) e bloqueio com BSA (marrom) respectivamente (b); diagrama de Bode para capacitância imaginária (c).



Fonte: Própria Autora. Software Origin Pro 8.

4.5 Comparação do uso das diferentes monocamadas peptídicas e monocamadas mistas em imunossensores.

Figura 32. Monocamadas auto-organizadas formadas pelos peptídeos (a) Fc-Glu-Ala-Cys-NH₂ (b) Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ (c) Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH₂



Fonte: Própria Autora. Software Power Point 2013 e ChemSketch.

A síntese dos peptídeos foi possível por meio da metodologia em fase sólida. Os processos utilizados permitiram a obtenção dos peptídeos conjugados com ferroceno com alto grau de pureza (tabela 7). O local de acoplamento do ferroceno foi fundamental para a melhoria do rendimento obtido, quando esse foi realizado no meio da cadeia principal o rendimento foi baixo, provavelmente em função do impedimento estérico. O peptídeo de sequência Cys-Ala-Ala-Lys(fc)-Ala-Ala-COOH e teve um rendimento de 5,3% na síntese (SANTOS et al., 2015), enquanto que o Cys-Ile-Ile-Lys(Fc)-Ile-Ile-COOH apresentou rendimento de 1,3% (PICCOLI et al., 2016). O acoplamento à cadeia lateral do ácido glutâmico, permitiu um aumento substancial do rendimento do peptídeo, uma vez que, a etapa de desproteção do grupo lateral da Lys foi removida e o impedimento estérico foi minimizado pelo fato do acoplamento ocorrer na extremidade da cadeia. Somado a isso, a presença do ferroceno na extremidade N-terminal possibilitou a eficiência na ligação com o imunossensor.

Tabela 7. Características da síntese em fase sólida dos peptídeos contendo molécula de ferroceno acoplada.

Peptídeo	Peso Molecular (g mol ⁻¹)	Pureza (%)	Tempo de retenção (min)	Rendimento da Síntese (%)
1) Cys-Ile-Ile-Lys(Fc)-Ile-Ile-COOH	984,5	> 95%	23,9	1,3
2) Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH ₂	708,0	> 98%	16,1	10
3) Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH ₂	635,6	> 98%	12,5*	12
4) Fc-Glu-Ala-Cys-NH ₂	560,0	> 98%	14,3*	16

Fonte: Própria Autora [* - os dados de tempo de retenção (Rt) para esses peptídeos foram realizados em colunas diferentes, por isso o peptídeo 4 possui tempo de retenção maior, para ambos analisados em mesma coluna os Rt são de 14,5 (peptídeo 3) e 14,0 (peptídeo 4)]

As características eletroquímicas dos peptídeos obtidos estão reunidas nas tabelas 8 e 9. É importante ressaltar que o peptídeo contendo resíduos de isoleucina mostrou um recobrimento molecular menor que os dois peptídeos formados por resíduos de alanina, e também de monocamadas mistas ($3,0 \times 10^{-10}$) (FERNANDES et al., 2014, 2013b). Esse resultado está relacionado com o volume da cadeia lateral presente na isoleucina e ausente na alanina, o que dificulta o empacotamento. Por outro lado, monocamadas mistas formadas por aciltióis não possuem ramificações, resultando em um maior recobrimento molecular e maior C_r ($175 \mu F \text{ cm}^{-2}$) (FERNANDES et al., 2014). Além disso, nos peptídeos constituídos por alanina, o ferroceno encontra-se na extremidade N-terminal da cadeia principal, e não mais na lateral da lisina, diminuindo assim também o impedimento estérico existentes entre os peptídeos em sua organização molecular sobre o eletrodo de ouro.

De acordo com a tabela 8, os peptídeos contendo a molécula de ferroceno conjugada apresentaram região faradaica ao redor de 0,36 V, além disso a capacitância redox encontrada para cada monocamada peptídica é proporcional ao recobrimento molecular, ou seja, quanto mais denso o empacotamento, maior a eficiência do sinal redox. A constante de transferência eletrônica, calculada aqui através da capacitância redox, também indica a eficiência do processo de oxi-redução que o sistema está sofrendo. Esse valor varia de acordo com o ambiente em que se encontra a sonda redox, normalmente cadeias onde o ferroceno encontra-se em uma distância maior em relação ao eletrodo de ouro possuem valores menores de constante de transferência eletrônica, porém o ambiente ao qual a sonda está exposta também influencia a transferência, podendo facilitar ou dificultar a mesma (ECKERMANN et al., 2010). Por exemplo, para uma monocamada mista de aciltióis formado por cadeia de 15 carbonos, a constante de transferência

eletrônica encontra-se em torno de 12 s^{-1} , próxima aos resultados obtidos com os peptídeos formados por alanina (DAVIS et al., 2008). O peptídeo formado por isoleucina pode ter apresentado um maior valor devido a presença das cadeias hidrofóbicas ao redor da molécula de ferroceno.

Tabela 8. Características eletroquímicas das monocamadas peptídicas investigadas: Cys-Ile-Ile-Lys(Fc)-Ile-Ile-COOH (1); Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH₂ (2), Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ (3) e Fc-Glu-Ala-Cys-NH₂ (4).

Peptídeos	Potencial Meia-Onda (V)	Distância do Ferroceno (nm)	Recobrimento molecular (mol cm^{-2})	Capacitância redox - SAM ($\mu\text{F cm}^{-2}$)	Constante de transferência eletrônica (Hz)
1	0,37	1,61	$(0,40 \pm 0,20) \cdot 10^{-10}$	$(105,00 \pm 10,00)$	$(35,00 \pm 2,00)$
2	0,35	1,83	$(1,20 \pm 0,20) \times 10^{-10}$	$(226,40 \pm 1,40)$	$(10,55 \pm 0,38)$
3	0,36	1,60	$(2,13 \pm 0,70) \times 10^{-10}$	$(300,00 \pm 17,10)$	$(11,50 \pm 0,71)$
4	0,38	1,21	$(1,80 \pm 0,70) \times 10^{-10}$	$(182,00 \pm 4,98)$	$(11,00 \pm 0,38)$
SAM mista*	0,45	1,50	$3,00 \times 10^{-10}$	175,00	----

Fonte: Própria Autora (* dados retirados de Fernandes et al, 2013)

De acordo com os parâmetros voltamétricos das monocamadas formadas pelos peptídeos redox, pode-se concluir que todas apresentam um comportamento próximo ao ideal, com a razão j_{ap}/j_{cp} próximo de 1 (tabela 9), picos próximos a simetria e dependência linear entre corrente de pico e velocidade de varredura.

SAMs bem empacotadas e com alta organização costumam apresentar processos de oxidação/redução em potenciais característicos, e os picos anódicos e catódicos da voltametria cíclica geralmente possuem uma separação mínima entre os potenciais, como pode-se notar na tabela 9. A largura dos picos pode ser atribuída às dispersões cinéticas e termodinâmicas dos sistemas, como por exemplo, a auto-interação entre grupos Fc, ligação heterogênea do peptídeo na superfície do ouro ou defeitos no filme (ECKERMANN et al., 2010; GATTO; VENANZI, 2013b).

Tabela 9. Parâmetros voltamétricos dos conjugados ferroceno-peptídeos após formação da monocamada auto-organizada sobre eletrodo de ouro: Cys-Ile-Ile-Lys(Fc)-Ile-Ile-COOH (1); Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH₂ (2), Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ (3) e Fc-Glu-Ala-Cys-NH₂ (4).

Peptídeos	j_{cp} ($\mu A\ cm^{-2}$)	j_{ap} ($\mu A\ cm^{-2}$)	j_{ap} / j_{cp}	E_{cp} (mV)	E_{ap} (mV)	ΔE (mV)
1	5.24	-5.44	1.10	380	350	18
2	22.46	-23.73	1.10	360	346	14
3	41.26	-41.38	1.00	378	351	20
4	28.77	-26.36	0.92	382	375	7

Fonte: Própria Autora.

O peptídeo contendo a isoleucina não permitiu a formação eficaz do imunossensor, assim não estará reportado no restante das comparações. O mesmo ocorreu para o peptídeo contendo apenas uma alanina.

Comparando os imunossensores obtidos com os dois outros peptídeos estudados (com 2 e 3 alaninas), nota-se que o contendo duas alaninas apresentou os melhores resultados. Esta mesma conclusão é obtida quando se compara com a tradicional monocamada mista de aciltióis (tabela 10). Estes dados mostram que foi encontrado um peptídeo com promissor potencial para substituir as monocamadas auto-organizadas atuais.

O melhor resultado obtido pelo peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ pode estar relacionado ao comprimento da cadeia peptídica que é de aproximadamente 16 Å, enquanto o Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys- NH₂ possui 18 Å. Essa diferença de comprimento, possibilita que a carga acumulada na sonda redox, presente na cadeia de menor tamanho, seja mais facilmente sentida pelo imunossensor, em particular na transferência eletrônica ao ouro, quando o evento de reconhecimento acontece (interação antígeno-anticorpo). Este fato pode ser demonstrado pelas maiores variações da capacitância redox obtidas para o peptídeo de menor tamanho. Essa propriedade também está relacionada a melhor sensibilidade do imunossensor contendo o peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂. Importante ressaltar que, para uma monocamada mista de 11 carbonos, a normalmente utilizada em biossensores, o tamanho da cadeia é de aproximadamente 15 Å, bem próximo ao peptídeo.

Monocamadas auto-organizadas em eletrodos de ouro, com melhorada condutividade, inércia química e biocompatibilidade, têm sido extensamente explorados por aprimorarem a

performance de plataformas sensoriais, sendo que o peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ apresentou todas estas propriedades.

Tabela 10. Parâmetros analíticos na detecção eletroquímica de CRP em PBS (pH 7,4) utilizando imunossensores com SAMs constituídas pelos peptídeos eletroativos Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH₂ (2), Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ (3) e monocamada mista de acilítiois.

Parâmetros	Monocamada Mista(*)	Peptídeo 2	Peptídeo 3
Intervalo linear (nmol L ⁻¹)	0,5-10	0,5-10	0,5-10
R ²	0,98	0,97	0,99
Sensibilidade por década (%)	1248 (L nmol ⁻¹ ΔC _r ⁻¹)	3,7	11,4
LDD (nM)	0,24	0,3 ± 0,1	0,24 ± 0,02
K _a	(5,0 ± 0,3) x 10 ⁸	(1,7 ± 0,3) x 10 ⁸	(5,9 ± 0,3) x 10 ⁸

Fonte: Própria Autora (* dados retirados de Fernandes et al., 2013).

A comparação da performance dos imunossensores aqui desenvolvido e baseados em uma plataforma peptídica, em relação aos reportadas na literatura, mostra que foi possível desenvolver sensores de igual capacidade (tabela 11) ou em alguns casos, de melhorado desempenho.

Tabela 11. Performance de diferentes imunossensores eletroquímico para quantificação da CRP.

Método eletroquímico utilizado	LDD (pM)	Intervalo Linear (nM)	Referência
EIE	300	0 – 1000	(JOHNSON et al., 2012)
EIE	176	0,5–50	(BRYAN et al., 2013)
EIE	200	0,5 – 10	(FERNANDES et al., 2013a)
ECE	240	0,5 – 10	(FERNANDES et al., 2014)
Imitância	8	0,01-100	(PATIL et al., 2015)
ECE	800	0,5 – 10	(SANTOS et al., 2015)
ECE	240	0,5 – 10	Esse trabalho

Fonte: Própria Autora.

Os dados apresentados nesse trabalho mostram que os peptídeos não somente proporcionam um aumento da área de superfície ativa como também facilita a transferência de elétrons na interface do sensor, melhorando sua sensibilidade. Nos casos em que a sonda redox é incorporada na cadeia peptídica, os mesmos são utilizados como meio de ancoramento para receptores moleculares, com uma imobilização controlada e orientação adequada para o reconhecimento do alvo, o que também aprimora a sensibilidade do sensoriamento. Como resultado dessas propriedades únicas, peptídeos modificando superfícies sensoriais vem sendo fabricados e utilizados para detecção eletroquímica de uma vasta classe de alvos biológicos relevantes, incluindo proteínas.

Sendo assim, na próxima etapa do trabalho avaliou-se o peptídeo com melhor desempenho (Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂) para um novo tipo de bioreceptor: um aptâmero de DNA. Esse trabalho foi desenvolvido no estágio realizado na Universidade de Oxford (PICCOLI et al., 2018).

4.6 Aplicação do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ utilizando aptâmero de DNA como bioreceptor

Nos últimos anos houve um grande crescimento de interfaces otimizadas capazes de desempenhar importante função na área de detecção clínica de analitos, principalmente no sentido de análises rápidas e de baixo custo. Os imunossensores eletroquímicos demonstrados no presente trabalho até agora, foram capazes de detectar e quantificar a proteína CRP, utilizando a EIE e sua derivada capacitância por meio do uso de anti-CRP.

Nessa etapa do trabalho, o melhor filme peptídeo foi escolhido para dar suporte a um novo tipo de bioreceptor, ancorando um aptâmero de DNA e subsequentemente traduzindo o reconhecimento do alvo de interesse, o qual continua sendo CRP para fins de comparação.

Foi possível demonstrar, não apenas que a interface gerada exibe alta seletividade ao alvo, mas também que a maior quantidade do receptor presente, proporcionada por aptâmeros ancorados através de filmes formados por peptídeos, possibilita maior sensibilidade do ensaio (CITARTAN et al., 2012; MARRAZZA, 2017). A tabela 12 reúne alguns imunossensores utilizando aptâmeros de CRP já datados.

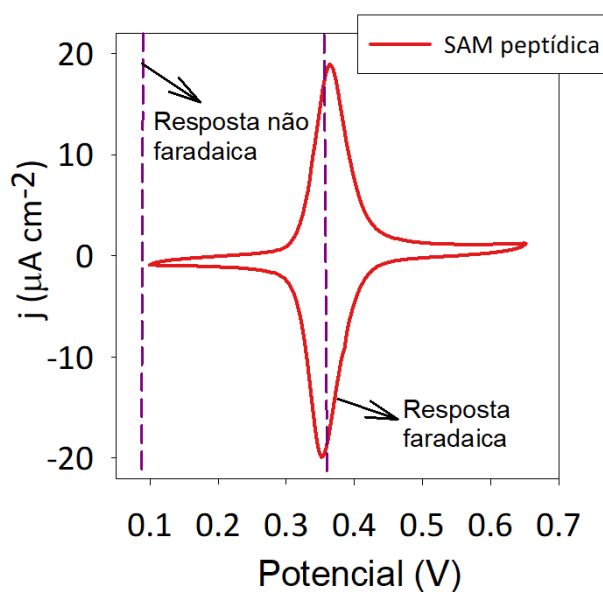
Tabela 12. Comparação de imunossensores para CRP utilizando aptâmero de DNA.

Método Analítico	LDD	Intervalo Linear	Ref.
SPR	1 nM	0 - 100 nM	(WU et al., 2016)
VC/EIE	0,07 pM	0,2 - 4980 pM	(WANG et al., 2017)
Imunoensaio	49 pM	49 - 39900 pM	(HUANG et al., 2010)
Imunoensaio	4,87 nM	0,004 - 3990 nM	(PULTAR et al., 2009)
EIE	7,2 pM	10 - 5000 pM	Esse trabalho

Fonte: Piccoli et al, 2018.

Após a automontagem dos peptídeos (figura 33), 1 μ M de solução do aptâmero sintético de anti-CRP (5'-CGA AGG GGA TTC GAG GGG TGA TTG CGT GCT CCA TTT GGT GTT TTT TTT TTT T- NH₂ 3' - Oxford Aptamer Group), foi acoplado ao peptídeo. O método foi o mesmo utilizado anteriormente, visto que o aptâmero possui um grupo amino reativo. O imunossensor obtido foi investigado por voltametria e capacitância. A resposta faradaica mostrou um potencial de meia onda (E_{in}) de $(0,360 \pm 0,002)$ V e uma pequena separação de pico (aprox. 10 mV).

Figura 33. Voltametria Cíclica da SAM obtida após imobilização do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ sobre eletrodo de ouro.

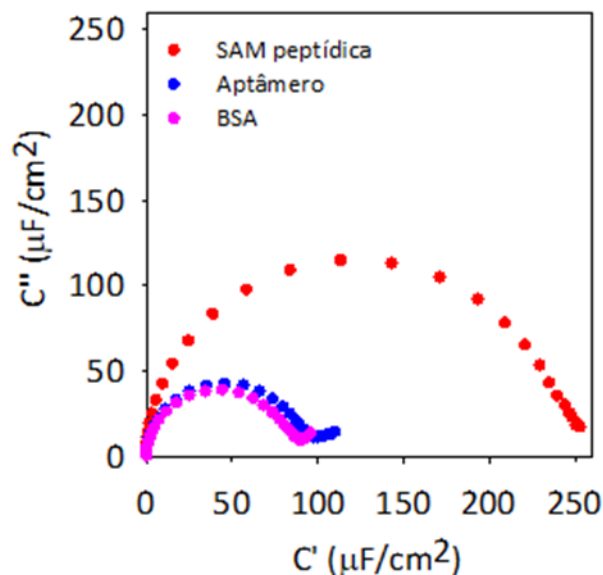


Fonte: Piccoli et al, 2018.

4.6.1 Caracterização do Imunossensor

Após a imobilização covalente do aptâmero de CRP, a capacitância redox (na região faradaica) diminuiu, indicando que foi ancorado com sucesso (figura 34). A grande diminuição de C_r ($54 \pm 1\%$) é indicativa de uma maior quantidade de aptâmeros, quantificada por marcação redox como sendo de $7,8 \pm 1,5 \times 10^{11}$ moléculas cm^{-2} , um valor consideravelmente maior do que o possível para um filme de anticorpos IgG ($8,3 \times 10^9$ moléculas cm^{-2}) (YU et al., 2003).

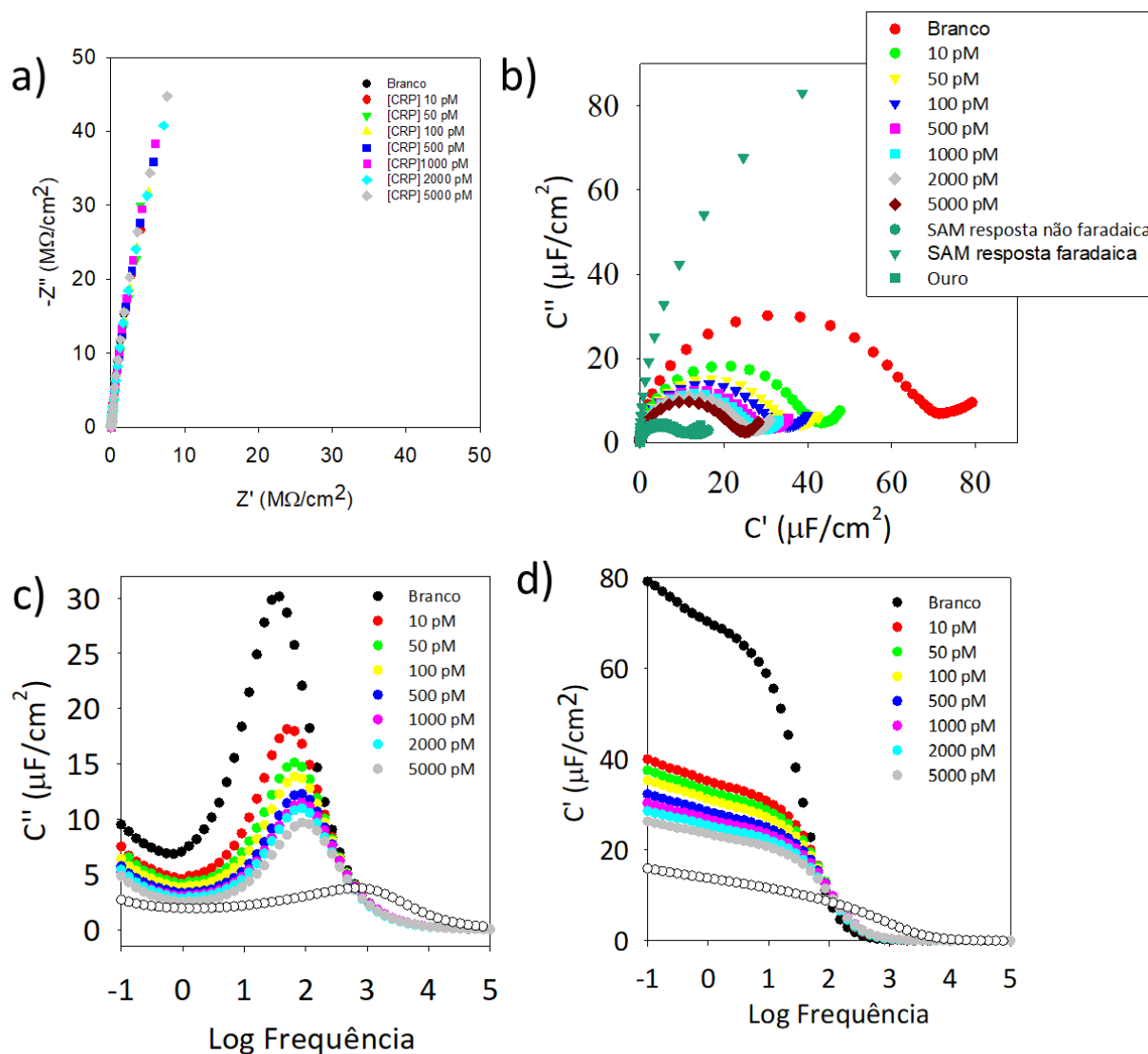
Figura 34. Diagrama de Nyquist capacitivo obtido na região faradaica para os processos de modificação do eletrodo com SAM do peptídeo redox Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ (vermelho), imobilização do aptâmero (azul) e bloqueio com BSA (roxo).



Fonte: Piccoli et al, 2018.

A interface responde sensivelmente ($87,7 \pm 3,7\%$ por década) à CRP (figura 35), conforme avaliado no potencial da região faradaica (0,36 V) em uma faixa de 10 pM - 5000 pM. A análise capacitiva realizada nos potenciais de região não-faradaica (0,1 V) não responde à CRP. Além disso, a análise impedimétrica padrão não exibe alterações mensuráveis após a incubação com CRP, mesmo em concentrações mais altas (figura 35a).

Figura 35. Diagrama de Nyquist Impedimétrico (a) e capacitivo (b). Diagrama de Bode capacitivo para capacitância imaginária (c) e capacitância real (d) demonstrando a sensibilidade do imunossensor constituído por monocamada do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ e receptor de aptâmeros, frente à CRP na região faradaica do sistema e ausência de resposta na região não faradaica (círculos brancos).

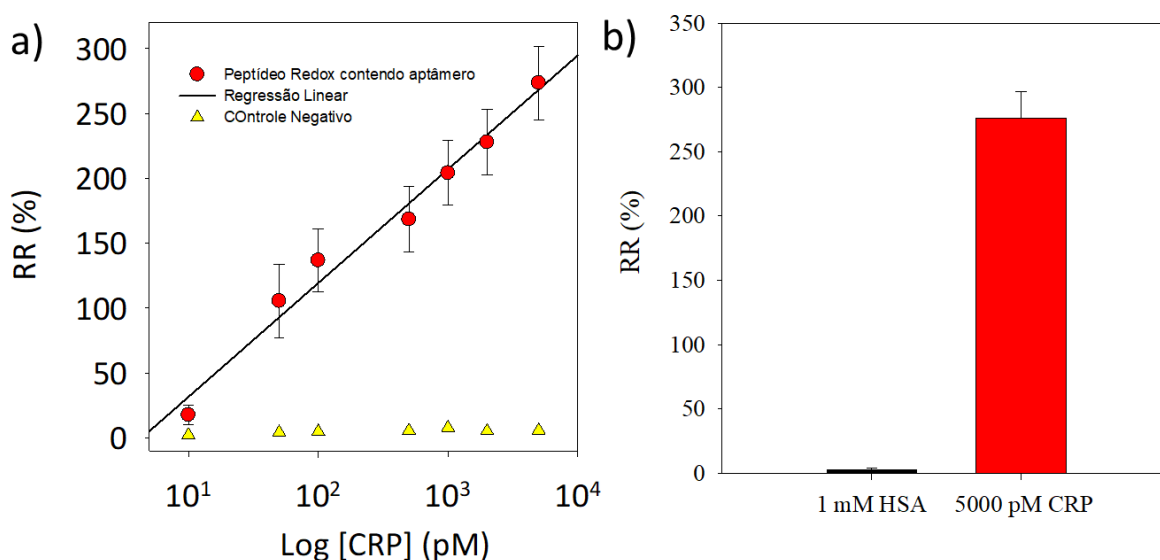


Fonte: Piccoli et al, 2018.

Uma análise comparativa do receptor de mAb anti-CRP e aptâmero de DNA é mostrada na Tabela 13, onde a maior sensibilidade é obtida pelo imunossensor contendo o aptâmero. Acredita-se que isso se deve a uma combinação da maior quantidade do mesmo na superfície e impedimento estérico menor para essa molécula (MARRAZZA, 2017). Além disso, melhorados valores de K_d (3,51 nM) para aptâmeros já haviam sido reportados em outros trabalhos (HUANG et al., 2010).

A especificidade do imunossensor para a CRP foi confirmada por meio da incubação com várias concentrações de BSA (albumina do soro bovino) e albumina sérica humana (HSA), que é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo humano (Figura 36). Os resultados mostraram que, a presença destas proteínas não induzem resposta considerável em comparação àquela observada em CRP.

Figura 36. Resposta relativa após incubação do imunossensor, constituído por SAM do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ e receptor formado por aptâmero de DNA, em crescentes concentrações de CRP (círculos vermelhos) e BSA (triângulos amarelos) (a). Resposta após incubação com 5 nM de CRP e 1 mM de HSA (concentração 200.000 vezes maior) (b). Barras de erros representam o desvio relativo das medidas em três eletrodos diferentes.



Fonte: Piccoli et al, 2018.

Os filmes de aptâmeros têm uma resposta melhor daquela obtida para o imunossensor formado com o anti-CRP (Tabela 13), apesar dos dois apresentarem estabilidades iguais. Estes dados confirmam a possibilidade do uso da SAM formada de peptídeos para qualquer tipo de receptor.

Tabela 13. Parâmetros analíticos para o imunossensor, constituído por SAM de Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂, com Aptâmero de DNA e Anti-CRP como receptores respectivamente.

	Aptâmero	Anticorpo
Intervalo linear (pM)	10 - 5000	500 - 10000
LDD (pM)	7,2	240
Sensibilidade por década (%)	87,7 ± 3,7	11,4 ± 1,1
r²	0,98	0,99
K_d (nM)	0,18 ± 0,02	1,69 ± 0,3

Fonte: Piccoli et al, 2018.

4.7 Processos de adsorção e detecção nos imunossensores

4.7.1 Processos de adsorção

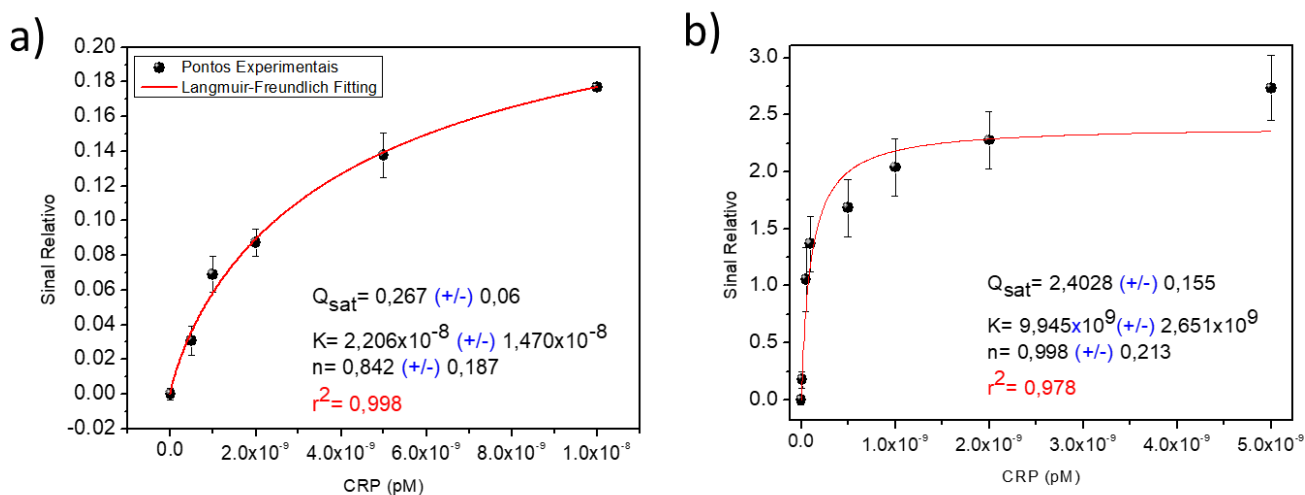
Processos de adsorção em sensores podem ser estudados a partir de curvas de calibração, que podem ser ajustadas por modelos teóricos, tais como Langmuir, Freundlich e Langmuir-Freundlich (JEPPU; CLEMENT, 2012; SOARES et al., 2018, 2016; TURIEL; PEREZ-CONDE; MARTIN-ESTEBAN, 2003). As curvas da calibração permitem estudar os processos de adsorção da proteína CRP nos imunossensores através dos modelos teóricos de Langmuir, Freundlich e Langmuir-Freundlich, como explicado em materiais e métodos (seção 3.9). As figuras das curvas de calibração (figuras 37 e 38) mostram a resposta relativa da capacitância redox em função da concentração do analito para os imunossensores, obtidos com os diferentes peptídeos (Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ e Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH₂) constituintes das SAMs, de acordo com Langmuir-Freundlich (SOARES et al., 2016).

Por meio da modelagem é possível extrair alguns parâmetros, tais como o ponto de saturação (Q_{sat}) e o índice de heterogeneidade (n), e comparar a eficiência dos mesmos. Os sensores apresentam adsorção heterogênea, indicada por n , o que está relacionado com os sítios ativos disponíveis para que haja interação Ab-Ag. Mesmo com índices próximos a 1 (alta homogeneidade), os sensores possuem sítios com diferentes graus de afinidade e seletividade, o que está relacionado com a conservação da camada ativa gerada pela arquitetura molecular da SAM. A massa molar do biomarcador e a arquitetura molecular podem interferir no processo de adsorção por multicamadas, pois afetam o recobrimento do eletrodo, o que influencia no processo de adsorção (SOARES et al., 2015, 2016).

Em relação aos filmes formados pelos peptídeos, em concordância com os resultados para os imunossensores apresentados, o peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ foi o de melhor desempenho, o que pode ser explicado por apresentar um valor de n próximo a 1 (figura 37) e assim, uma superfície do sensor homogênea e sem a formação de multicamadas. Neste sistema ocorre somente interação camada ativa-analito, o que é o esperado para um sensor ideal.

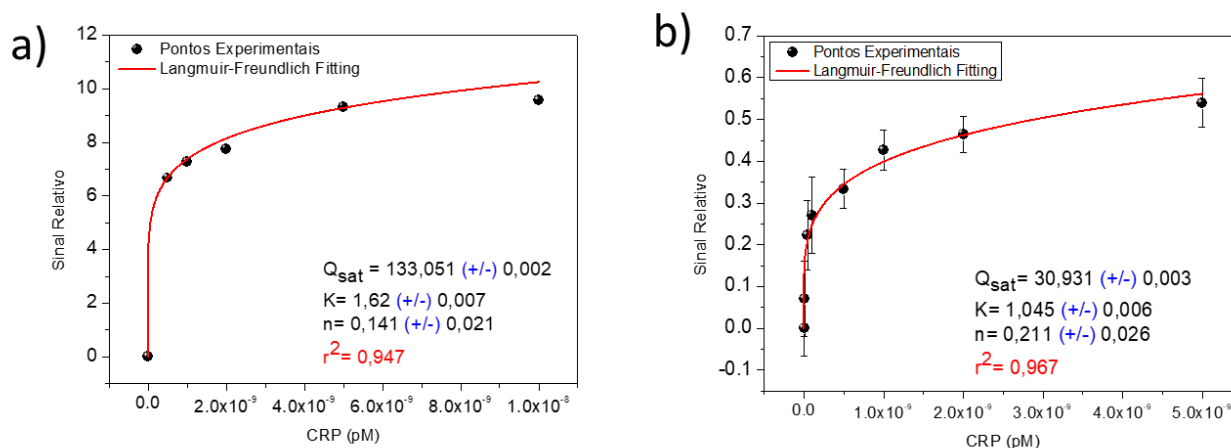
Contudo, nos outros casos que isso não ocorre, isto é, para n longe de 1, ocorre formação de multicamadas, havendo interações entre camada ativa-analito e analito-analito. Para o peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH₂ mesmo apresentando bom resultado no estudo de sensores, o resultado obtido demonstra um padrão de multicamadas (figura 38).

Figura 37. Curvas de Calibração para os imunossensores formados com SAMs do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ utilizando como receptor anticorpo de CRP (a) e aptâmero de DNA (b); índice de heterogeneidade próximo a 1.



Fonte: Própria Autora. Software Origin Pro 8.

Figura 38. Curvas de Calibração para imunossensores formados com SAMs dos peptídeos Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH₂ utilizando anti-CRP como receptor para quantificar CRP (a), e, imunossensor formado por SAM peptídica de sequência Ac-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH₂ (resultados no apêndice) utilizando aptâmero como receptor para quantificar a proteína C-Reativa (b); índice de heterogeneidade longe de 1.



Fonte: Própria Autora. Software Origin Pro 8.

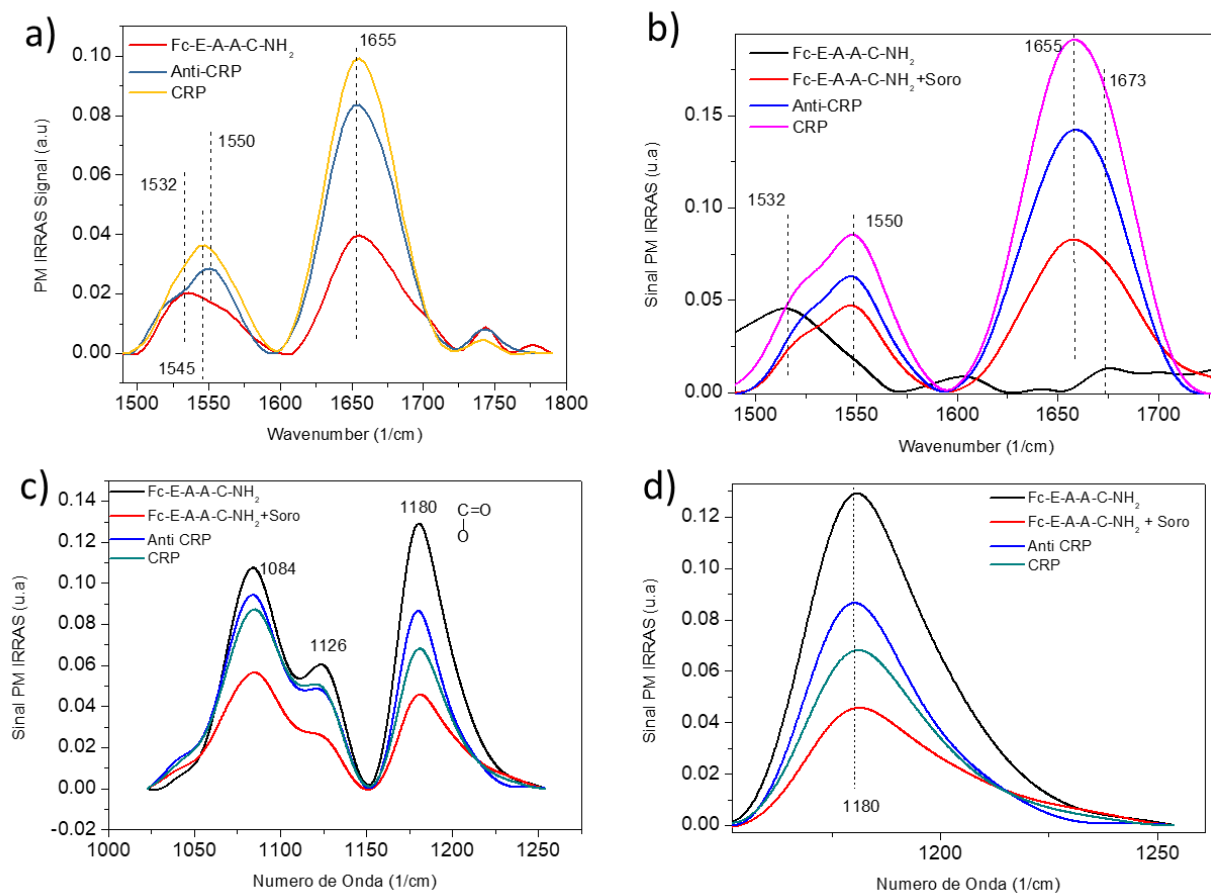
4.7.2 Mecanismos de Detecção dos Imunossensores

Para provar que o mecanismo de detecção é governado por interações específicas entre as biomoléculas e por mudanças nas orientações moleculares dos dipolos em relação ao plano de incidência da luz polarizada, medidas de Espectroscopia de Infravermelho por Reflexão e Absorção de Luz Polarizada (PM-IRRAS) foram realizadas nos filmes nanoestruturados dos peptídeos. O ouro foi utilizado como referência.

O mecanismo de interação entre peptídeo/anticorpo e anticorpo/antígeno é observado principalmente em duas regiões do espectro: nas regiões relativa às amidas I e II e na região do grupo C-N das aminas, presentes na estrutura dos peptídeos.

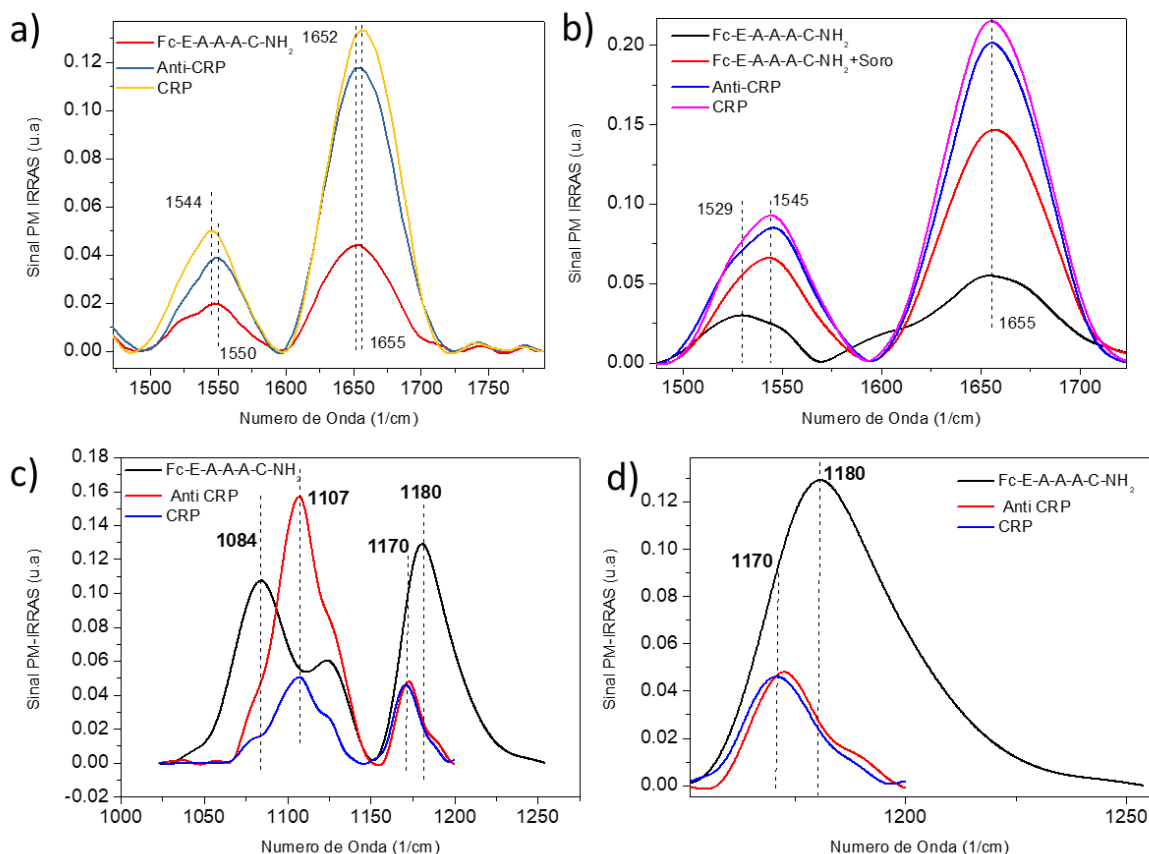
Na primeira região, bandas de amida I localizam-se próximas a 1650 cm⁻¹ e é principalmente representada por 80% da energia potencial associada com a vibração do grupo C=O, 10% C-N e 10% N-H. Já a banda de amida II está representada por 60% da energia potencial do grupo N-H e 40% do grupo C-N (COLTHUP; DALY; WIBERLEY, 1990; FREY; CORN, 1996). Para os imunossensores formados por SAMs dos peptídeos Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH₂ e Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH₂ há um aumento da área e da intensidade das bandas de amida I e II com a adsorção de anticorpos e antígenos na superfície do filme, sinalizando que, a interação específica entre as moléculas do peptídeo, anticorpo e antígeno são as responsáveis pelo mecanismo de detecção (figuras 39 e 40).

Figura 39. Espectro de PM-IRRAS para o imunossensor com SAM formada pelo peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂.



Fonte: Própria Autora. Software Origin Pro 8.

Figura 40. Espectro de PM-IRRAS para o imunossensor com SAM formada pelo peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH₂.



Fonte: Própria Autora. Software Origin Pro 8.

Apesar do imunossensor contendo o peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH₂ ter apresentado bom resultado na detecção da CRP, e ter demonstrado um padrão multicamadas ($n < 1$), a presença de uma alanina a mais gera uma estabilidade química alta, que nem a interação analito-analito consegue mudar a orientação molecular dos grupos amida II e I.

A região dos dipolos C-N de aminas também pode governar o mecanismo de detecção (COLTHUP; DALY; WIBERLEY, 1990; WIĘCKOWSKI; KORZENIEWSKI; BRAUNSCHWEIG, 2013). Para o imunossensor construído com a SAM do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Ala-Cys-NH₂ há um deslocamento da banda no espectro de PM IRRAS em 1180 cm⁻¹ para menores números de onda após interação com o anti-CRP e posteriormente com o biomarcador CRP (figura 40), o que leva o dipolo a oscilar com menor energia. O mesmo comportamento não ocorre no espectro do peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ (figura 39), pois as interações peptídeo/anti-CRP e anti-

CRP/CRP são apenas observadas na mudança da orientação molecular do grupo amina, o que pode explicar a excelente estabilidade da monocamada do peptídeo adsorvida na superfície do eletrodo, obtendo os melhores resultados para os imunossensores construídos.

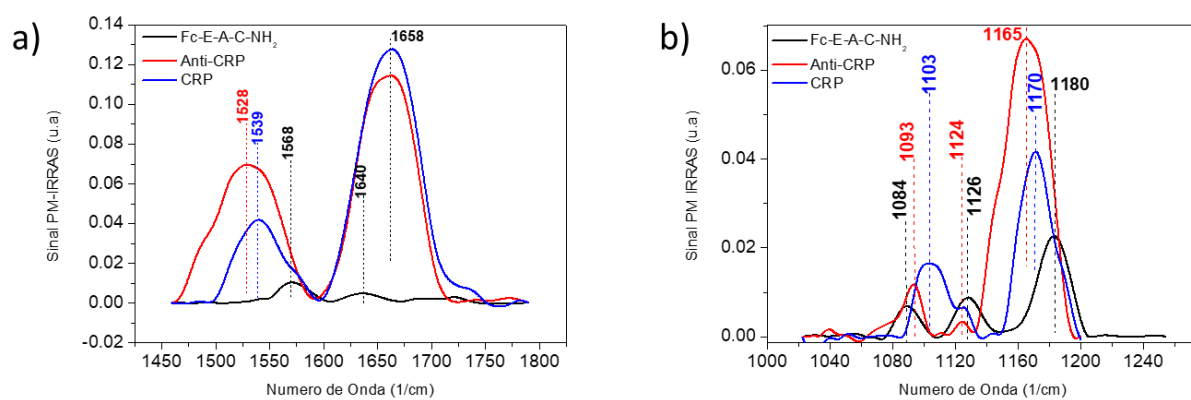
Além dos processos de adsorção, os espectros de PM-IRRAS mostraram interferência do soro sobre o imunossensores. Neste estudo, as monocamadas dos peptídeos foram expostas à 10% de soro, durante 20 min, seguida da lavagem para remoção de moléculas fracamente adsorvidas. Os espectros não mostraram deslocamentos das bandas para maiores e menores números de onda, mas houve um aumento da intensidade das bandas de amida I e II nas regiões próximas a 1650 e 1550 cm^{-1} . De fato, tal aumento pode estar relacionado às interações entre os peptídeos e o soro 10%. Alguns autores realizaram estudos de adsorção de proteínas através de PM-IRRAS, no qual demonstrou um aumento médio (18,5%) na absorbância relativa do pico de amida I após incubação dos eletrodos de carbono (amorfo funcionalizados com galactose e lactose) em proteínas como BSA (RAMIN, 2011). Tal resultado foi comparado por micro balança de cristal de quartzo, no qual há adsorção de 0,20 $\mu\text{g cm}^{-2}$ da proteína BSA na matriz (RAMIN, 2011).

Os peptídeos sintetizados neste trabalho e utilizados como matriz para detecção da proteína CRP apresentaram sinal de interferência com o soro 10%, porém sem influência na interação peptídeo/anticorpo e anticorpo/antígeno. O sinal obtido mostrou um valor acima da interferência obtida.

Para o imunossensor formado pelo peptídeo Fc-Glu-Ala-Cys-NH₂ não houve formação de uma monocamada bem organizada sobre o ouro. Quando ocorre falta de ordenamento molecular da monocamada, pode-se ter algum tipo de interpenetração da CRP na monocamada, o que ocasiona mudança de orientação molecular dos grupos de amida II (o que faz o grupo diminuir a intensidade). Por isso a banda de amida II diminui, enquanto a de amida I aumenta (SOARES et al., 2016) (figura 41).

Somado a isso, a falta de organização impede que as modificações eletrônicas que ocorrem no sistema, sejam efetivamente sentidas no pela sonda redox acoplada ao eletrodo, visto que, essa se encontra em um ambiente com diversas estruturas diferentes.

Figura 41. Espectro de PM-IRRAS para o imunossensor com SAM formada pelo peptídeo Fc-Glu-Ala-Cys-NH₂



Fonte: Própria Autora. Software Origin Pro 8.

CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

5.1 Conclusões

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

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

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

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

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

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

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

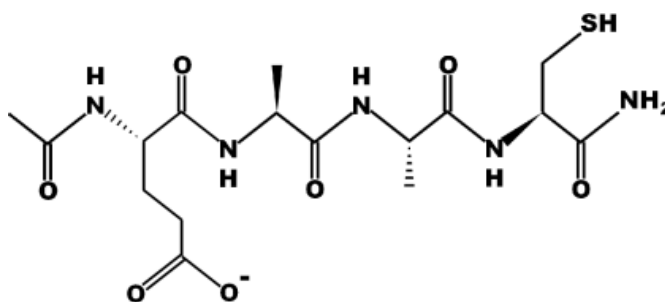
APÊNDICE 1: Peptídeo sem Ferroceno

Peptídeo Ac-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂

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

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

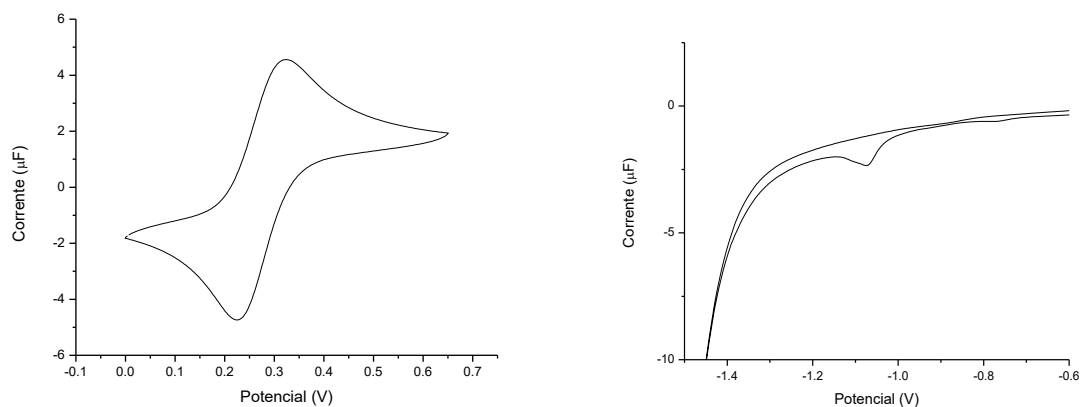
Figura 42. Estrutura química do peptídeo sem ferroceno Ac-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂.



Fonte: Própria Autora. Software PepDraw online.

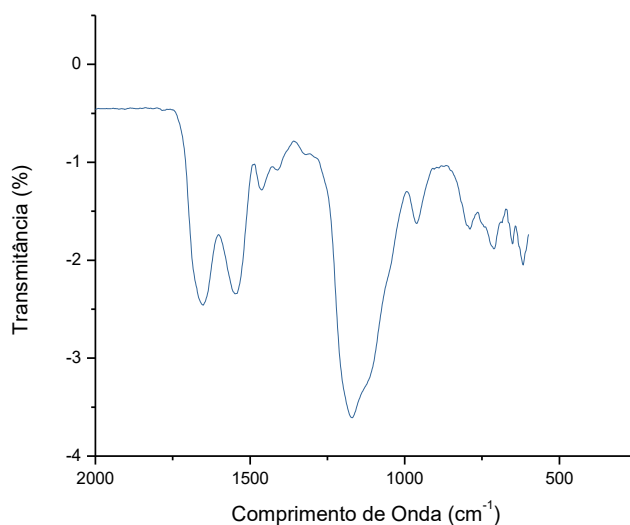
As medidas eletroquímicas foram realizadas na presença de ferroceno metanol 1 mM em PBS. Após imobilização do peptídeo no ouro o voltamograma demonstrou o bloqueio do sistema como pode ser visto na figura 43. As medidas de EIE foram realizadas em potencial de circuito aberto. O recobrimento molecular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

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



Fonte: Própria Autora. Software Origin Pro 8.0.

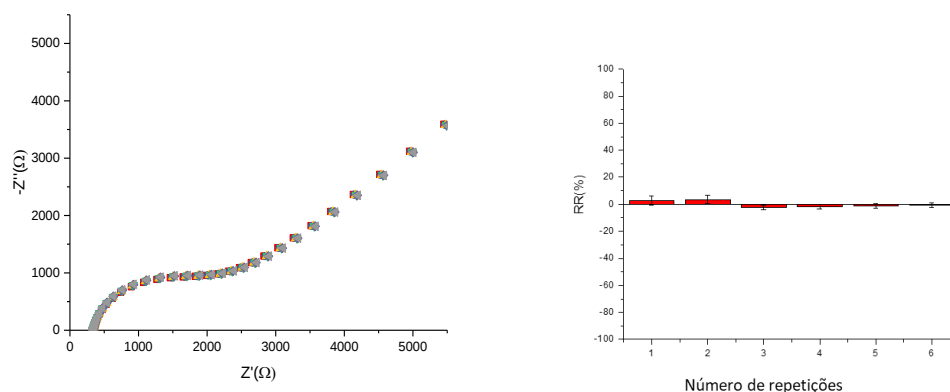
Figura 44. Espectro de FTIR do peptídeo Ac-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂.



Fonte: Própria Autora. Software Origin Pro 8.0.

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

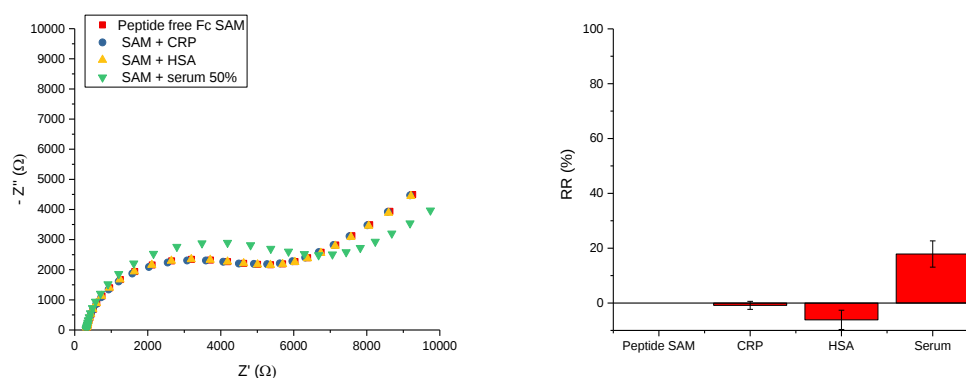
Figura 45. Estabilidade da SAM peptídica Ac-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂. Diagrama de Nyquist após cada incubação em PBS e sua respectiva mudança relativa nos valores de R_{ct} .



Fonte: Própria Autora. Software Origin Pro 8.0.

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

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

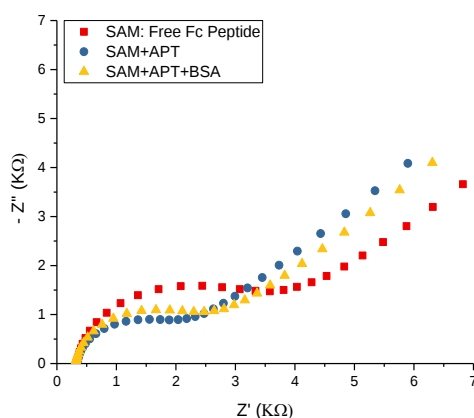


Fonte: Própria Autora. Software Origin Pro 8.0.

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

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

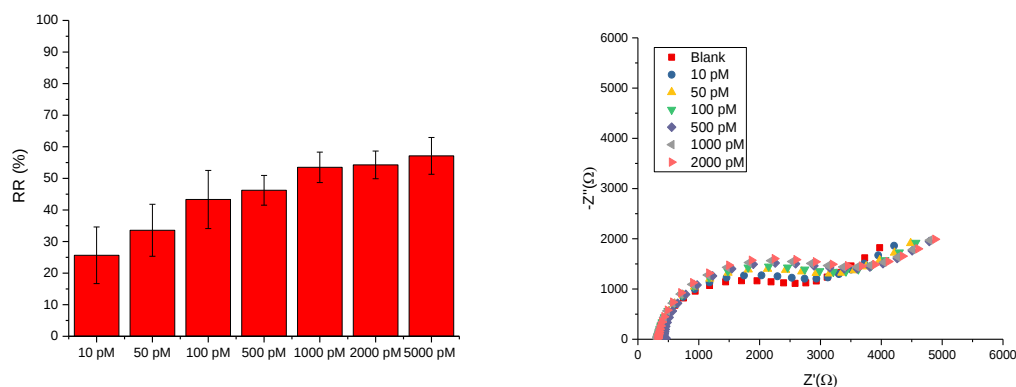
Figura 47. Diagrama de Nyquist impedimétrico para a SAM do peptídeo Ac-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ (vermelho) após o aptâmero ser ancorado (azul) e depois do bloqueio com BSA (amarelo).



Fonte: Própria Autora. Software Origin Pro 8.0.

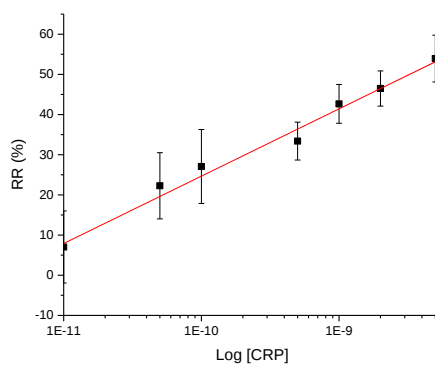
O imunossensor foi então submetido as diferentes concentrações de CRP e uma curva de calibração foi obtida (figuras 48 e 49). Os parâmetros analíticos encontram-se na tabela 14. Os resultados mostraram que o peptídeo sem ferroceno é satisfatório para uso em sensores e ensaios de impedância puderam ser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

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



Fonte: Própria Autora. Software Origin Pro 8.0.

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



Fonte: Própria Autora. Software Origin Pro 8.0.

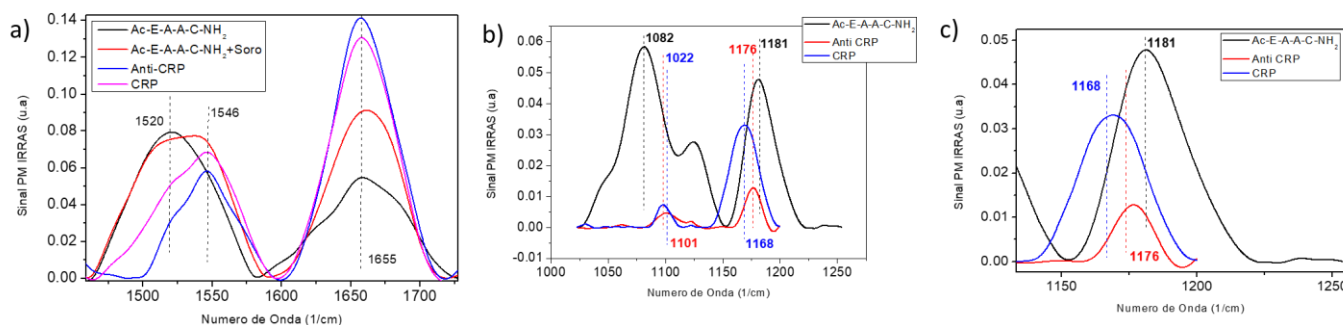
Tabela 14. Parâmetros Analíticos para o imunossensor formado por SAM peptídica Ac-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂.

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

Fonte: Própria Autora.

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

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



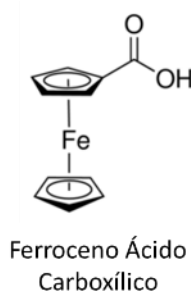
Fonte: Própria Autora. Software Origin Pro 8.0.

APÊNDICE 2: Peptídeo com Ferroceno Ácido Carboxílico

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

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

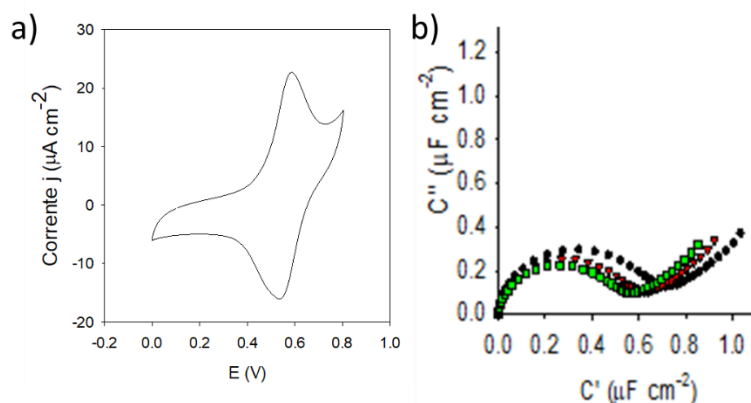
Figura 51. Estrutura química do ferroceno ácido carboxílico.



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

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

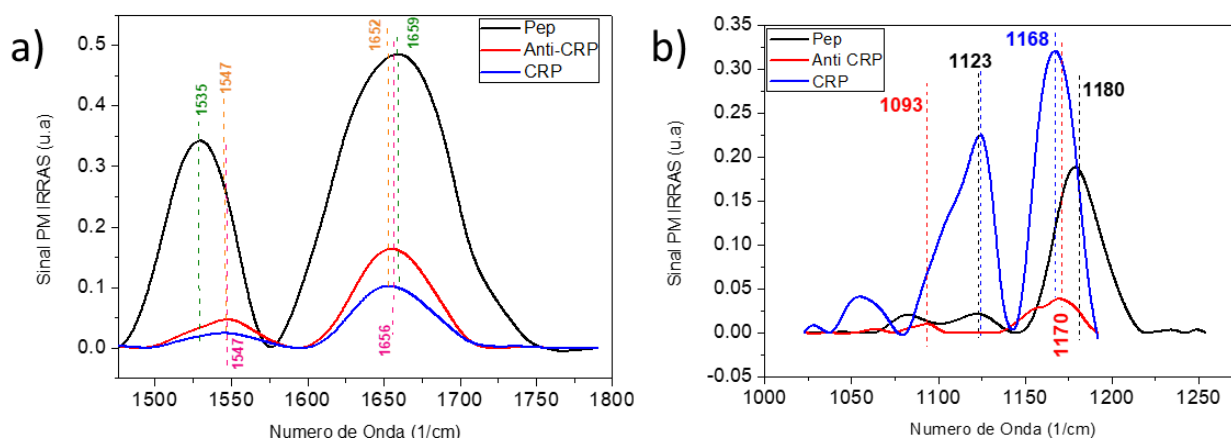
Figura 52. Voltametria cíclica para o peptídeo Fc-Glu-Ala-Ala-Cys-NH₂ com ferroceno ácido carboxílico (a) e diagrama de Nyquist capacitivo (b).



Própria Autora. Software Origin Pro 8.0.

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

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



Fonte: Própria Autora. Software Origin Pro 8.0.

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUPORTE FINANCEIRO

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

ANEXO 1

Copyright ACS

07/01/2019 Rightslink® by Copyright Clearance Center




[Home](#)
[Create Account](#)
[Help](#)



ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Title:	Redox Capacitive Assaying of C-Reactive Protein at a Peptide Supported Aptamer Interface
Author:	Julia Piccoli, Robert Hein, Afaf H. El-Sagheer, et al
Publication:	Analytical Chemistry
Publisher:	American Chemical Society
Date:	Mar 1, 2018

Copyright © 2018, American Chemical Society

LOGIN

If you're a [copyright.com](#) user, you can login to RightsLink using your [copyright.com](#) credentials. Already a [RightsLink](#) user or want to [learn more?](#)

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

[BACK](#)
[CLOSE WINDOW](#)

Copyright © 2019 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#). Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com