UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

JULIANA FELICIANO DOS SANTOS

Construção e aplicação de um imunossensor para detecção do marcador de insuficiência renal aguda: a cistatina C

São Carlos
2016

JULIANA FELICIANO DOS SANTOS

Construção e aplicação de um imunossensor para detecção do marcador de insuficiência renal aguda: a cistatina C

Versão corrigida

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães

Coorientador: Dr. Nirton Cristi Silva Vieira

**São Carlos
2016**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

S237c Santos, Juliana Feliciano dos
Construção e aplicação de um imunossensor para detecção do marcador de insuficiência renal aguda: a cistatina C / Juliana Feliciano dos Santos; orientador Francisco Eduardo Gontijo Guimarães; coorientador Nirton Cristi Silva Vieira. São Carlos, 2016.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais e Área de Concentração em Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2016.

1. Imunossensor. 2. Insuficiência Renal Aguda. 3. Cistatina C. 4. Diagnóstico precoce. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharela **JULIANA FELICIANO DOS SANTOS**.

Título da dissertação: "Construção e aplicação de um imunossensor para detecção do marcador de insuficiência renal aguda: a cistatina C".

Data da defesa: 11/11/2016.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. **Francisco Eduardo Gontijo Guimarães**
(Orientador)
(Instituto de Física de São Carlos/IFSC)

Prof. Dr. **Antonio Riul Junior**
(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

Dra. **Juliana Coatrini Soares**
(Pós-Doutoranda/CNPq)

Resultado:

Aprovada

APROVADA

Aprovada

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais:

Prof. Associado **Antonio José Felix de Carvalho**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Associado **Luis Fernando Costa Alberto**

AGRADECIMENTOS

Ao Ser Supremo e minha família por tudo.

Ao Alexandre pelo companheirismo, ajuda e paciência.

Ao Prof. Dr. Francisco E. G. Guimarães, Dr. Nirton Cristi Silva Vieira e Prof. Dr. Valtencir Zucolotto pela orientação, estrutura e todo o suporte dado para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Aos colegas Raphael, Fernando Tsutae, Izabela, Sandra, Leandro Zago, Gustavo, Vinícius, Idelma, Alessandra, Olavo, Naiara e Fran pela amizade, convivência e disposição em ajudar.

Aos técnicos do Grupo de Semicondutores Haroldo Arakaki e Carlos A. de Souza pelo auxílio e sugestões.

Ao Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia (GNano) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP) pela convivência, ajuda e toda a infraestrutura.

Ao Angelo Luiz Gobbi e a Maria Helena de Oliveira Piazzetta do Laboratório de Microfabricação (LMF/LNNano) que deram todo o suporte e orientação para a fabricação dos eletrodos.

Aos técnicos da Oficina Mecânica e Oficina de Óptica do IFSC/USP pelo trabalho desempenhado.

Ao Grupo de Óptica pelo auxílio financeiro para a compra das proteínas.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais (EESC/USP).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma colaboraram direta ou indiretamente para o desenvolvimento desse trabalho.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.

(George Bernard Shaw)

RESUMO

SANTOS, J. F. dos. **Construção e aplicação de um imunossensor para detecção do marcador de insuficiência renal aguda: a cistatina C**. 2016. 91 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Os rins desempenham um papel fundamental no sistema urinário e sua principal função é a filtração do sangue. Uma das causas que podem comprometer o funcionamento dos rins é a Insuficiência Renal Aguda (IRA) que é definida como a diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG) de forma rápida e inesperada, causando a perda da função renal. Essa doença apresenta um número significativo de internações e também óbitos. O marcador padrão usado nos exames laboratoriais é a creatinina sérica, no entanto, a concentração da creatinina sérica pode variar dependendo de vários fatores, como idade, sexo, nutrição, entre outros. Além disso, sua concentração não varia consideravelmente nas primeiras indicações da lesão renal. Dessa forma, o diagnóstico é tardio e a função renal já pode estar comprometida. A proteína cistatina C (CST3) vem sendo indicada como um novo marcador para a doença, mostrando superioridade especialmente para detectar pequenas variações da TFG. A concentração da cistatina C não varia significativamente com a idade, sexo e massa muscular. Assim, foi desenvolvido um imunossensor para detectar a cistatina C, usando a configuração de transistor de efeito de campo de porta estendida e separada (SEGFET). Os eletrodos foram caracterizados por várias técnicas como MEV, microscopia de força atômica, técnicas eletroquímicas e também foi analisada a sensibilidade do ouro. As etapas de construção do imunossensor, e a interação do anticorpo com concentrações crescentes da proteína foram verificadas através de técnicas eletroquímicas, na faixa de concentração de 3 a 100 ng.mL⁻¹. Nas medidas no SEGFET observou-se uma mudança significativa da corrente após a adição da cistatina C e para as substâncias interferentes não. O imunossensor apresentou alta sensibilidade detectando concentrações bem baixas da proteína alvo. A curva analítica $\Delta I_{DS} \% \times [CST3]$ obteve-se L.D. = 0,75 ng.mL⁻¹, L.Q. = 2,27 ng.mL⁻¹ e $r = 0,98122$. A curva analítica $\Delta V_{GS} \% \times [CST3]$ obteve-se L.D. = 0,28 ng.mL⁻¹, L.Q. = 0,87 ng.mL⁻¹ e $r = 0,99846$. Embora tenha algumas limitações o imunossensor é inovador e apresenta muitas vantagens podendo ser aplicado futuramente para o diagnóstico da doença.

Palavras-chave: Imunossensor. Insuficiência Renal Aguda. Cistatina C. Diagnóstico precoce.

ABSTRACT

SANTOS, J. F. dos. **Construction and application of an immunosensor for the detection of the acute kidney injury marker: cystatin C.** 2016. 91 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

The kidneys play a key role in the urinary system and its main function is the filtration of blood. One of the causes that can compromise the functioning of the kidneys is the Acute Kidney Injury (AKI), which is defined as the quickly and unexpected decrease in Glomerular Filtration Rate (GFR), causing the loss of kidney function. This disease presents a significant number of hospitalizations and also deaths. The standard marker used in laboratory tests is serum creatinine, however, serum creatinine concentration may vary depending on a number of factors, such as age, sex, nutrition, and so on. In addition, its concentration does not vary considerably in the first indications of renal injury. Thus, the diagnosis is delayed and renal function may already be compromised. The cystatin C protein (CST3) has been indicated as a new marker for the disease, showing superiority especially for detecting small variations in GFR. The concentration of cystatin C does not vary significantly with age, sex and muscle mass. Thus, an immunosensor was developed to detect cystatin C using the extended and a separate gate field effect transistor (SEGFET) configuration. The electrodes were characterized by several techniques such as SEM, atomic force microscopy, electrochemical techniques and also the sensitivity of gold was analyzed. The construction of the immunosensor, and the interaction of the antibody with increasing concentrations of the protein were verified by electrochemical techniques, in the concentration range of 3 to 100 ng.mL⁻¹. In the measurements in the SEGFET a significant change of the current was observed after the addition of cystatin C and for the interfering substances there was no difference. The immunosensor showed high sensitivity detecting very low concentrations of the target protein. The analytical curve $\Delta I_{DS}\% \times [CST3]$ was obtained L.D. = 0,75 ng.mL⁻¹, L.Q. = 2,27 ng.mL⁻¹ and $r = 0,98122$. The analytical curve $\Delta V_{GS}\% \times [CST3]$ was obtained L.D. = 0,28 ng.mL⁻¹, L.Q. = 0,87 ng.mL⁻¹ and $r = 0,99846$. Although it has some limitations the immunosensor is innovative and presents many advantages and can be applied in the future to diagnose the disease.

Keywords: Immunosensor. Acute kidney Injury. Cystatin C. Early diagnosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1 - Estrutura do rim e néfron.....	22
Figura 2- Classificação clínica da IRA (1) pré-renal, (2) A renal/intrínseca e (3) pós-renal....	23
Figura 3 - Distribuição da creatinina sérica e cistatina C sérica na lesão renal aguda.	26
Figura 4 - Estrutura cristalográfica da cistatina C.	26
Figura 5 - Receptores utilizados em biossensores.....	28
Figura 6 - Esquema geral do biossensor.....	28
Figura 7 - Representação da estrutura da IgG... ..	29
Figura 8 - Fragmentos típicos da IgG.....	30
Figura 9 - (a) Curva de saída e regiões de operação e (b) curva de transferência do MOSFET tipo n no modo enriquecimento	32
Figura 10 - Corte transversal do MOSFET tipo n modo depleção.....	33
Figura 11 - Diagrama esquemático do (a) MOSFET, (b) ISFET e a (c) representação do circuito elétrico equivalente.....	33
Figura 12 - Representação do modelo do sítio de ligação	34
Figura 13 - Diagrama esquemático de um SEGFET	37
Figura 14 - Esquema da dupla camada.....	38
Figura 15 - (a) Circuito de Randles e (b) sua resposta idealizada no plano da impedância complexa.....	39
Figura 16 - (a) Substrato de vidro BK7 (5 cm × 5 cm) contendo vários eletrodos e conjunto individual de eletrodos após o corte do substrato e (b) dimensões do eletrodo. (c) Eletrodo interdigitado planar utilizado no SEGFET e (d) suas dimensões (17 pares de dígitos com largura de 50 µm, comprimento de 3,4 mm e espaçamento de 50 µm).	45
Figura 17 - Etapas de funcionalização do eletrodo e imobilização do anticorpo.....	47
Figura 18 - Representação de uma célula eletroquímica típica com três eletrodos (a) eletrodo de trabalho, (b) eletrodo de referência (Ag/AgCl) e (c) contra eletrodo (placa de platina).	48
Figura 19 - Conjunto de eletrodos fabricados no LMF utilizados nas medidas eletroquímicas. Os eletrodos de Au (1 e 2) foram utilizados como eletrodo de trabalho e contra eletrodo, e o eletrodo de Pt (3) como pseudoreferência.....	48
Figura 20 - Suporte com agulhas de contato para conexão dos eletrodos no potenciostato.....	49
Figura 21 - (a) CI ALD212900A, (b) pinos e diagrama de conexão do CI, (c) SMU da <i>Keithley Instruments</i> modelo 2612a e (d) configuração esquemática do SEGFET.	50
Figura 22 - Célula de acrílico para a realização das medidas no sistema SEGFET.	51
Figura 23 - Aparato experimental: (a) SMU, (b) caixa metálica contendo o CI, (c) suporte para o eletrodo de referência, (d) célula de acrílico e (e) leitura dos dados através de um computador via software LabVIEW 2012.....	52
Figura 24 - Imagens de MEV-FEG dos eletrodos de (a) ouro e (b) platina.	55
Figura 25 - Imagens de AFM (a) do eletrodo de ouro sem os anticorpos e (b) imagem em 3D, (c) do eletrodo de ouro modificado com os anticorpos e (d) imagem em 3D.	56
Figura 26 - Sensibilidade do eletrodo de ouro para diferentes valores de pH.....	58

Figura 27 - (a) Curva de saída ($I_{DS} \times V_{DS}$) e (b) curva de transferência ($I_{DS} \times V_{GS}$) para diferentes valores de pH.....	59
Figura 28 - (a) Voltamogramas cíclicos e (b) diagrama de Nyquist na configuração proposta comparativamente a uma configuração eletroquímica convencional.	60
Figura 29 - Corrente de pico anódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.	61
Figura 30 - (a) Voltamograma cíclico e (b) diagrama de Nyquist das etapas de construção do imunossensor.....	62
Figura 31 - (a) Voltamograma cíclico e (b) diagrama de Nyquist da interação do anticorpo com concentrações crescentes da proteína.....	63
Figura 32 - Curva analítica das medidas de (a) voltametria cíclica e (b) impedância eletroquímica obtidas para concentrações crescentes de cistatina C.	64
Figura 33 - (a) Curvas de saída características do CI ALD212900A e (b) as curvas obtidas experimentalmente.....	66
Figura 34 - (a) Curva de transferência e (b) derivada segunda da curva de transferência para obtenção da V_T	67
Figura 35 - Curva de transferência aplicando uma tensão constante de $V_{DS} = 10$ mV.....	68
Figura 36 - Comprimento de Debye em função do tampão PBS.....	69
Figura 37 - (a) Curva de saída, (b) curva de transferência e (c) derivada segunda.....	71
Figura 38 - Comparação da resposta do imunossensor à adição de (a) cistatina C e de (b) interferentes.....	72
Figura 39 - (a) Curva de saída e a (b) curva analítica de ΔI_{DS} % em função de diferentes concentrações da proteína (3, 10, 20 e 30 ng.mL ⁻¹).	73
Figura 40 - (a) Curvas de transferência e (b) curva analítica de ΔV_{GS} % em função de diferentes concentrações da proteína (3, 10, 20, 30 e 50 ng.mL ⁻¹).	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
BK7	Vidro de borossilicato
AFM	Microscopia de Força Atômica
CAD	Computer-Aided Design
CI	Circuito integrado
CST3	Cistatina 3
EDC	Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FET	Field Effect Transistor
IgG	Imunoglobulina G
L.D.	Limite de detecção
L.Q.	Limite de quantificação
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MOS	Metal-Óxido-Semicondutor
NHS	N-Hidroxisuccinimida
OCP	Open Circuit Potential
PA	Pureza analítica
PBS	Phosphate Buffered Saline
pI	Ponto isoelétrico
Ra	Roughness average
RMS	Root Mean Square
rpm	Rotações por minuto
SAM	Self-Assembled Monolayer
SAXS	Small-Angle X-Ray Scattering
SCE	Eletrodo de Calomelano Saturado
SMU	Source Measure Unit
SPRI	Surface Plasmon Resonance Imaging

LISTA DE SÍMBOLOS

$C_3H_7NO_2S$	Cisteína
K	Constante de afinidade
Si	Silício
V_{GS}	Tensão porta-fonte
V_{DS}	Tensão dreno-fonte
V_T	Tensão de limiar
β	Fator de ganho do transistor
μ_N	Mobilidade dos elétrons
ϵ_{OX}	Permissividade do óxido de porta
x_{OX}	Espessura do óxido de porta
L	Comprimento do canal
W	Largura do canal
SiO_2	Óxido de silício
Si_3N_4	Nitreto de silício
Ta_2O_5	Óxido de tântalo
Al_2O_3	Óxido de alumínio
ψ	Potencial de superfície
pH_S	pH na superfície
pH_{Sol}	pH da solução
α	Parâmetro de sensibilidade
C_s	Capacitância da superfície
β_s	Capacidade tamponante
σ	Densidade superficial de carga
Au	Ouro
Pt	Platina
Cr	Cromo
nm	nanômetro
HDMS	Hexametildisilazano
O_2	Oxigênio
KCl	Cloreto de potássio
NaCl	Cloreto de sódio

KMnO_4	Permanganato de potássio
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
N_2	Nitrogênio
$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	Glicina
$^\circ\text{C}$	grau Celsius
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Fosfato de sódio dibásico di-hidratado
NaH_2PO_4	Fosfato de sódio monobásico
Au_2O	Óxido auroso
Au_2O_3	Óxido áurico
Al	Alumínio
I	Força iônica
c	Concentração molar
z	Carga do íon
K^{-1}	Comprimento de Debye
ϵ_0	Permissividade do vácuo
ϵ_r	Constante dielétrica
T	Temperatura absoluta
N_A	Número de Avogadro
q	Carga elementar
k_B	Constante de Boltzmann
R_G	Raio de giro
$S_{x,y}$	desvio padrão residual
b	inclinação da curva
R_S	resistência da solução
R_{tc}	resistência de transferência de carga
C_{dc}	capacitância da dupla camada
W	impedância de Warburg

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Sistema urinário e particularidades da Insuficiência Renal Aguda.....	21
1.1.1. Cistatina C.....	26
1.2. Biossensores	27
1.3. Transistor de efeito de campo metal-óxido-semicondutor	30
1.4. Transistor de efeito de campo sensível a íons (ISFET).....	33
2. OBJETIVOS	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1. Procedimento geral de limpeza do substrato de vidro.....	43
3.2. Fabricação dos eletrodos	43
3.3. Corte do substrato de vidro e procedimento de limpeza dos eletrodos	45
3.4. Funcionalização química dos eletrodos e imobilização dos anticorpos	46
3.5. Medidas Eletroquímicas	47
3.6. Configuração do SEGFET	50
3.7. Caracterização dos eletrodos	52
3.7.1. Sensibilidade do ouro.....	52
3.7.2. MEV e AFM	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1. Caracterização do eletrodo	55
4.1.1. MEV e AFM	55
4.1.2. Sensibilidade do ouro.....	57
4.2. Medidas Eletroquímicas	60
4.2.1. Caracterização eletroquímica do eletrodo.....	60
4.2.2. Etapas de construção do imunossensor.....	62
4.2.3. Imunossensor eletroquímico: interação do anticorpo com concentrações crescentes da proteína	63
4.3. Curvas características do circuito.....	65
4.4. Imunossensor baseado em SEGFET para detecção da cistatina C.....	68
4.4.1. Configuração do SEGFET	68
4.4.2. Resposta do imunossensor: para a cistatina C e interferentes	71
5. CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sistema urinário e particularidades da Insuficiência Renal Aguda

O sistema urinário consiste de dois rins, dois ureteres, uma bexiga e uma uretra, sendo responsável pela filtração do sangue, reabsorção de substâncias importantes e excreção da urina. Todo o sistema é indispensável para executar as funções e manter o corpo saudável, especialmente os rins. Os rins são parecidos com um grão de feijão, tem entre 120 a 170 g e o rim direito é um pouco deslocado para baixo em relação ao esquerdo devido à presença do fígado. Filtram aproximadamente 180 litros de sangue por dia e são gerados entre 1,2 a 1,8 litros de urina, ou seja, a maior parte do filtrado é reabsorvido e retorna para a corrente sanguínea. O volume dos líquidos no corpo é controlado através da urina, o que também contribui para a regulação da pressão arterial. Os rins reabsorvem substâncias essenciais para o organismo, principalmente sódio (Na^+), cloreto (Cl^-), potássio (K^+), bicarbonato (HCO_3^-), fosfatos, glicose e aminoácidos. Além disso, regulam as substâncias no organismo, eliminando no caso de excessos ou poupando no caso de carências, assim mantêm as condições ideais de água e eletrólitos. Ajudam no equilíbrio ácido-base do sangue mantendo o pH sanguíneo estável. Eliminam os resíduos nitrogenados provenientes do metabolismo (amônia, ureia, ácido úrico e creatinina) e outras substâncias nocivas¹.

A parte interna do rim é formada pelo córtex renal, medula renal e pelve renal. O sangue entra pelo córtex através da artéria renal e o córtex está localizado na região periférica do rim estendendo-se até a medula através das colunas renais. A medula localizada mais ao centro é formada por estruturas chamadas de pirâmides renais, que são separadas pelas colunais renais. O ápice da pirâmide renal é denominado de papila renal que está orientada para a pelve renal. A papila renal fica em contato com uma estrutura no formato de funil chamado de cálice renal. Os cálices menores formam um cálice maior direcionando a urina para a pelve renal, que a conduz para o ureter ligado a bexiga. A urina fica armazenada provisoriamente na bexiga até ser expelida pela uretra para o meio externo².

O néfron é a unidade morfofuncional do rim, sendo o elemento que executa a função renal. Cada rim tem cerca de um milhão de néfrons que se localizam entre o córtex e a medula. O néfron é constituído pelo corpúsculo renal (cápsula de Bowman e um glomérulo) e o túbulo renal (túbulo contorcido proximal, alça de Henle, túbulo contorcido distal e ductos

coletores). O glomérulo forma uma rede de capilares dentro da cápsula de Bowman, sendo bastante permeável para a água e solutos. O processo de filtração do sangue ocorre no glomérulo e o filtrado vai sendo reabsorvido conforme passa pelo túbulo renal. A maior parte da água e substâncias importantes como eletrólitos, aminoácidos e a glicose são reabsorvidas no túbulo proximal. No final do néfron, nos túbulos coletores, ocorre a regulação fina da formação da urina, ou seja, concentração ou diluição através da secreção de hormônios que facilitam a reabsorção de mais água e eletrólitos³. A urina formada é o resultado do que não foi reabsorvido no túbulo renal e os hormônios secretados, sendo constituída de água (95%), ureia, ácido úrico, creatinina, eletrólitos, vitaminas, hormônios, ácidos orgânicos e uma série de compostos⁴. A Figura 1 ilustra a estrutura do rim e do néfron.

Figura 1 – Estrutura do rim e néfron. Adaptado^{5,6}.

Uma das causas que podem comprometer o funcionamento dos rins é a Insuficiência Renal Aguda (IRA), que é definida como a diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG) de forma rápida e inesperada, isto é, a perda da função renal⁷. A IRA é uma doença comum nas unidades de terapia intensiva (UTI) representando 7 % de todas as internações hospitalares, e ainda está associada a um número significativo de óbitos. Dos casos registrados com IRA 5 a 6 % necessitam de terapia renal substitutiva, mais conhecida como hemodiálise, que tem por finalidade restabelecer o equilíbrio hidroeletrólítico do organismo, sendo um tratamento que substitui as funções renais. Em pacientes com um quadro grave da doença e que fazem o tratamento de hemodiálise os óbitos estão entre 50 a 70 % dos casos^{8,9}. As principais manifestações clínicas são: ausência de apetite, náuseas, vômitos incoercíveis, hemorragia digestiva, dispneia, edema, hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, edema agudo de pulmão, arritmias, pericardite, pleurite, sonolência, tremores, agitação, torpor, convulsão, sangramentos, anemia, tendência a infecções, perda de massa muscular, prurido, entre outras. A IRA pode ser classificada em três tipos que vão depender da região que ocorreram as alterações agudas: pré-renal (antes do rim), renal/intrínseca (no rim) ou pós-renal (depois do rim). A Figura 2 apresenta as regiões que ocorrem os três tipos de IRA¹⁰.

Figura 2- Classificação clínica da IRA (1) pré-renal, (2) A renal/intrínseca e (3) pós-renal. Elaborado pela autora.

A pré-renal ocorre devido à diminuição do volume de sangue circulante, ou ainda pela queda da pressão arterial (menos de 80 mmHg). Se o paciente for atendido dentro de 2 dias há como reverter o quadro, logo o diagnóstico é muito importante nesse caso. A renal/intrínseca ocorre diretamente no rim e as principais causas são: nefrotóxicas

(antibióticos, metais pesados, agrotóxicos, veneno de cobra, anti-inflamatórios, etc), doenças glomerulares e vasculares, nefrite intersticial aguda, necrose tubular aguda (NTA) que representa 70 % dos casos de IRA, entre outras. A pós-renal acomete até 4% dos pacientes com IRA e pode ser reversível, sendo as principais causas: tumores da próstata e colo do útero, cristais de ácido úrico e sulfa, edema, coágulos, cálculos, hipertrofia da próstata, carcinoma de bexiga, infecção na bexiga, etc^{7,11}.

A *clearance* avalia a função renal baseando-se na depuração de uma substância, ou seja, utiliza-se uma substância que pode indicar se os rins estão funcionando bem. A substância mais indicada para ser usada deve ter sua concentração praticamente constante, não ser afetada por outras doenças e ser filtrada livremente pelos glomérulos. As substâncias usadas podem ser exógenas: inulina, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido etilenodiaminopentacético (DTPA), iotalamato de sódio e iohexol¹². No entanto, o uso dessas substâncias é muito mais complicado e custoso, logo substâncias endógenas que estão presentes no organismo são mais requeridas¹³. O marcador padrão usado nos exames laboratoriais é a creatinina (113 g.mol^{-1}), que é o produto da degradação da creatina fosfato, fonte de energia presente nos músculos. No entanto, a concentração da creatinina sérica pode variar dependendo da idade, sexo, peso corporal, nutrição e hidratação da pessoa. Além disso, pode diagnosticar a IRA já quando a função renal está comprometida, com redução de pelo menos 30% da TFG¹⁴, pois sua concentração não varia consideravelmente nas primeiras indicações de lesão renal. A *clearance* de creatinina pode ser utilizada para estimar a taxa de filtração glomerular na rotina clínica, de acordo com as seguintes fórmulas¹⁰:

$$\text{clearance de Cr} = \frac{Cr_{\text{urinária}} \times V}{Cr_{\text{sérica}}} \quad (1)$$

$$\text{clearance de Cr} = (140 - \text{idade}) \times \frac{\text{peso}}{(72 \times Cr_{\text{sérica}})} \times 0,85(\text{se mulher}) \quad (2)$$

sendo V o volume referente a coleta de urina no período de 24 h. Os valores de referência para a creatinina sérica são de 0,3 a 0,8 mg.dL^{-1} para crianças até 10 anos, para adultos do sexo feminino deve ser inferior a 1,1 mg.dL^{-1} e para adultos do sexo masculino deve ser inferior a 1,2 mg.dL^{-1} . Níveis elevados de creatinina normalmente indicam doença renal¹⁵. A utilização da fórmula 1 pode ter um problema, pois tem que ter certeza que o paciente coletou todo o volume de urina de 24 h, caso não tenha efetuado o procedimento corretamente o valor estimado pode não ser o real. A fórmula 2 conhecida como Cockcroft-Gault não é muito utilizada e pode

apresentar erros, por exemplo, não leva em consideração pacientes que já tenham alteração na TFG podendo estimar a depuração plasmática de creatinina incorretamente. A fórmula 3 conhecida como MDRD representada abaixo e a fórmula CKI-EPI são as mais precisas por apresentarem valores mais condizentes com a realidade¹⁰.

$$TFG = 186 \times Cr_{sérica}^{-1,154} \times idade^{-0,203} \times 0,742(se\ mulher) \times 1,21(se\ negro) \quad (3)$$

A TFG varia de acordo com o sexo, idade e peso, como mostrado na Tabela 1 para pessoas saudáveis¹².

Tabela 1 – Média da TFG para pessoas saudáveis.

Idade	Média da TFG para pessoas saudáveis (mL/min/1,73 m ²)
20 - 29	116
30 - 39	107
40 - 49	99
50 - 59	93
60 - 69	85
mais de 69	75

Um dos indicadores que a função renal pode estar comprometida é a TFG entre 60 a 89 mL/min/1,73 m² durante 3 meses ou mais. A TFG < 60 mL/min/1,73 m² por 3 meses ou mais indica um quadro mais crítico^{12,16}.

A cistatina C é uma proteína pequena sintetizada por todas as células nucleadas do organismo e tem potencial para substituir a creatinina sérica na avaliação da função renal, principalmente para monitorar pequenas reduções na taxa de filtração glomerular. Ela é filtrada livremente nos glomérulos e a excreção urinária da proteína em concentrações fora da faixa normal é um indicativo de lesão renal. Estudos mostram a superioridade da cistatina C especialmente para detectar pequenas variações da TFG. A concentração da cistatina C não varia significativamente com a idade, sexo, massa muscular, entre outros¹³. Murty et al. realizaram um estudo com 130 pacientes com IRA e compararam a creatinina sérica e a cistatina C sérica na detecção da doença. O marcador cistatina C sérica apresentou concentrações acima da normalidade em 100 % dos pacientes doentes, enquanto a creatinina sérica não¹⁷. A Figura 3 apresenta a distribuição da creatinina sérica e cistatina C sérica na lesão renal aguda.

Figura 3 - Distribuição da creatinina sérica e cistatina C sérica na lesão renal aguda¹⁷.

Portanto, a cistatina C nesse estudo mostrou-se um marcador mais eficiente e também pode detectar a doença precocemente. Na próxima seção a cistatina C será descrita com mais detalhes.

1.1.1. Cistatina C

A cistatina C ou cistatina 3 (CST3) é uma proteína pequena não-glicosilada de 13 kDa formada por uma única cadeia polipeptídica de aproximadamente 120 resíduos de aminoácidos. Existem 3 tipos de famílias conhecidas de cistatina, sendo que a cistatina C faz parte da família 2 e são sintetizadas com o peptídeo-sinal para serem secretadas, assim provavelmente atuam mais no meio extracelular. Além disso, possuem duas ligações dissulfeto (-S-S-). Em seres humanos a cistatina C está presente em tecidos e fluídos corporais, principalmente no fluido cerebrospinal e no plasma seminal. A Figura 4 ilustra a estrutura cristalográfica da cistatina C¹⁸.

Figura 4 - Estrutura cristalográfica da cistatina C¹⁹.

O ponto isoelétrico (pI) é o ponto onde a carga líquida total da proteína é nula, no caso da CST3 é 9,3 tendo um caráter básico e estando carregada positivamente em pH fisiológico^{18,20}. As cistatinas são inibidoras reversíveis das cisteíno proteases, que são enzimas proteolíticas e atuam principalmente nas regiões internas das cadeias polipeptídicas das proteínas, logo as cistatinas controlam a atividade das cisteíno proteases dentro e fora da célula^{21,22}. As concentrações de cistatina C encontradas no soro sanguíneo estão entre 530 e 920 ng.mL⁻¹ para indivíduos saudáveis com menos de 50 anos e entre 580 e 1020 ng.mL⁻¹ para pessoas acima de 50 anos²³. Na urina as concentrações normais estão entre 33 e 300 ng.mL⁻¹.

1.2. Biossensores

Em 1962 Clark descreveu como fazer um sensor eletroquímico mais inteligente utilizando a enzima glicose oxidase encapsulada em uma membrana de diálise, então, monitorava-se a redução da concentração de oxigênio na presença de glicose com um sensor de O₂. O primeiro biossensor foi conhecido como “eletrodo enzimático”, termo também usado em 1967 por Updike & Hicks, que desenvolveram um sensor utilizando a enzima glicose oxidase imobilizada em gel de poliacrilamida sobre a superfície de um eletrodo de oxigênio para quantificar a glicose^{24,25}. Desde então, vários tipos de biossensores foram criados para diferentes aplicações mostrando-se um campo atraente no meio científico.

Um biossensor é um dispositivo integrado transdutor-receptor que é capaz de fornecer informação qualitativa, quantitativa ou semiquantitativa através de um elemento de reconhecimento biológico. O biossensor baseado em reações catalisadas por macromoléculas são os mais conhecidos e estudados. Nesse caso, os receptores são geralmente enzimas, células, organelas celulares e tecidos. Já o biossensor de afinidade se baseia na interação do analito com a macromolécula e fazem parte dessa classe os imunossensores, que se fundamentam na reação imunoquímica entre antígenos e seus anticorpos específicos. Tanto o anticorpo quanto o antígeno podem ser os receptores, dependendo da finalidade do biossensor. As interações não específicas devem ser minimizadas no biossensor de afinidade para que a formação do complexo antígeno-anticorpo possa ser satisfatória e não incorrer em erros de detecção. A Figura 5 ilustra exemplos de receptores usados nos biossensores²⁶.

Figura 5 - Receptores utilizados em biossensores. Adaptado²⁷.

O transdutor do biossensor pode ser eletroquímico, óptico, piezoelétrico ou calorimétrico. A função do transdutor é transformar o sinal da interação ou reação dos receptores com o analito presente em uma determinada amostra em um sinal mensurável²⁶. O sinal de saída do transdutor é geralmente amplificado e a leitura do sinal pode ser verificada no computador através de um software apropriado, a Figura 6 representa o esquema geral de um biossensor²⁸.

Figura 6 - Esquema geral do biossensor. Elaborado pela autora.

Os transdutores eletroquímicos que também podem ser denominados de biossensores eletroquímicos são os mais antigos e usados no meio científico. Nesse trabalho optou-se por trabalhar com a classe de biossensores pertencentes a esse grupo que são os transistores de efeito de campo FET (do inglês, *Field Effect Transistor*). Os FETs são sensíveis à alteração de carga produzida pela interação ou reação dos elementos biológicos.

1.2.1 Imunossensores

Os anticorpos (Ac) são glicoproteínas produzidas pelos linfócitos B que se ligam especificamente aos antígenos (Ag), dessa forma podem inativar ou desenvolver uma resposta imune através da associação com outras células de defesa a fim de eliminar o antígeno. Os

antígenos são geralmente moléculas grandes (acima 5 kDa) e apresentam regiões específicas denominadas epítomos ou determinantes antigênicos que são reconhecidas pelos anticorpos. A interação antígeno-anticorpo pode formar pequenos complexos cíclicos ou cadeias lineares quando o antígeno têm dois determinantes antigênicos ou grandes redes quando têm três ou mais²⁹.

Os anticorpos pertencem a classe das imunoglobulinas (Ig), sendo que nem todas as imunoglobulinas são anticorpos. Podem ser divididos em cinco classes: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. A IgG tem cerca de 150 kDa é a mais abundante representando 75 % dos anticorpos no organismo, se divide em quatro subclasses: IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄³⁰.

A IgG é muito parecida com o formato da letra Y e têm dois sítios de ligação idênticos para a interação com os antígenos. Sua estrutura é formada por quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias leves (λ ou κ) e duas cadeias pesadas γ . A formação de ligação dissulfeto entre as cadeias laterais do aminoácido cisteína ($C_3H_7NO_2S$) unem as cadeias leves e pesadas, bem como nas próprias cadeias há a presença de ligações dissulfeto formando os domínios da IgG. Em cada cadeia leve L (do inglês, *Light*) há um domínio variável (V_L) e um constante (C_L). Já em cada cadeia pesada H (do inglês, *Heavy*) há um domínio variável (V_H) e três domínios constantes (C_{H1} , C_{H2} e C_{H3}). O domínio variável apresenta variabilidade nas sequências de aminoácidos e dentro dessa região tem outra denominada hipervariável (5 a 10 aminoácidos), que é responsável pela interação com o antígeno. A região da dobradiça da IgG é um importante ponto de flexibilidade da estrutura. A Figura 7 representa a estrutura da IgG.

Figura 7 - Representação da estrutura da IgG. Adaptada³¹.

Comumente o anticorpo também pode ser descrito pelos seus fragmentos que são: r IgG (75 kDa), Fab'₂ (110 kDa), Fab' (55 kDa), Fab (50 kDa), Fv (25 kDa) e Fc (50 kDa). A Figura 8 apresenta os fragmentos da IgG³².

Figura 8 - Fragmentos típicos da IgG. Adaptado³².

A base de funcionamento do imunossensor é a reação imunoquímica entre anticorpos e seus antígenos específicos que formam um complexo estável. Os pontos isoelétricos dos anticorpos e antígenos são importantes e dependendo do pH da solução podem estar carregados positivamente ou negativamente, isso também se relaciona na distribuição de cargas do complexo formado que terá uma nova configuração. A reação específica de cada sítio de ligação do anticorpo com o antígeno livre (epítopo) forma um complexo estável Ag-Ac segundo a relação abaixo³³:

$$K = \frac{[AgAc]}{[Ag][Ac]} \quad (5)$$

em que Q1 representa a carga do antígeno, Q2 a carga do anticorpo, Q3 a carga do complexo e K (L.mol⁻¹) é a constante de afinidade baseada nas concentrações do antígeno livre e dos sítios livres dos anticorpos no equilíbrio.

A alta afinidade entre anticorpos e antígenos aliada à sensibilidade do FET é uma ferramenta promissora para a construção de dispositivos simples e miniaturizados, que podem ser aplicados na biomedicina. Dessa forma, a próxima seção apresenta uma breve descrição acerca do funcionamento do transdutor utilizado nesse trabalho.

1.3. Transistor de efeito de campo metal-óxido-semicondutor

O FET do tipo Metal-Óxido-Semicondutor (MOS) também denominado MOSFET é construído a partir de um substrato semicondutor como o silício (Si). A condução elétrica como se sabe é consequência do movimento de elétrons ou buracos denominados de portadores de carga. A densidade volumétrica de portadores de carga em um semicondutor pode ser

determinada e controlada pelos traços de impurezas (dopagem). A dopagem é a inserção de um pequeno número de átomos substitutos na rede do semicondutor, com a finalidade de modificar suas propriedades elétricas. Existem dopantes doadores e receptores, que caracterizam os semicondutores como tipo n e tipo p, respectivamente. Nos semicondutores tipo n são os elétrons os portadores de carga majoritários e tipo p são os buracos (portadores de carga positivos)³⁴. A região entre fonte (do inglês, *source*) e dreno (do inglês, *drain*) é denominada canal e difere do substrato, pois a densidade eletrônica é maior devido à introdução de impurezas específicas. A região do canal é coberta por uma fina camada de material isolante que normalmente é um óxido, por exemplo, o óxido de silício (SiO_2). Sobre a camada isolante é depositada outra metálica cuja estrutura é denominada de porta (do inglês, *gate*). Isso resulta em uma alta impedância devido à presença da camada isolante entre o canal e a camada metálica, que impede a “fuga” de corrente através da porta. Além disso, a alta impedância na porta consegue medir pequenas variações de tensão elétrica. Para possibilitar o contato entre as regiões também é depositada uma fina camada metálica sobre as regiões de dreno e fonte³⁵.

O princípio de funcionamento do MOSFET resume-se ao fluxo de portadores da fonte para o dreno, ou seja, eles fluem através do canal e esse fluxo é controlado pela tensão elétrica aplicada na porta (V_{GS}). Modulando-se V_{GS} e a tensão aplicada entre dreno e fonte (V_{DS}) é possível observar as regiões de operação do MOSFET. Essas regiões de operação para um MOSFET tipo n são mostradas na Tabela 2, onde V_T (do inglês, *Threshold Voltage*) é a tensão de limiar que corresponde ao mínimo valor de V_{GS} para que haja a formação do canal de condução da corrente dreno-fonte (I_{DS}), no caso de um MOSFET tipo n no modo enriquecimento, pois neste modo de funcionamento, não há um canal de condução existente³⁶.

Tabela 2 - Regiões de operação do MOSFET tipo n no modo enriquecimento.

Região	Características
Corte	$V_{GS} < V_T$, $V_{GS} - V_T < 0$, $I_{DS} \sim 0$
Tríodo ou linear	$V_{GS} - V_T \geq V_{DS} > 0$, $I_{DS} > 0$
Saturação	$V_{DS} \geq V_{GS} - V_T$, $I_{DS} > 0$

As curvas de saída e transferência características de um MOSFET tipo n são ilustradas na Figura 9. Na região de corte não há condução entre o dreno e fonte, ou seja, I_{DS} é idealmente zero e o MOSFET permanece desligado. Na região de tríodo ou linear o MOSFET é controlado pela tensão aplicada na porta e opera de forma similar a um resistor. Na região de saturação a corrente de dreno tem uma leve dependência de V_{DS} , no entanto, fazendo uma

primeira aproximação pode-se estimar I_{DS} independente de V_{DS} e controlada somente pela tensão aplicada na porta.

Figura 9 – (a) Curva de saída e regiões de operação e (b) curva de transferência do MOSFET tipo n no modo enriquecimento³⁷.

As equações da I_{DS} da região linear e de saturação são mostradas abaixo, respectivamente^{36,38}.

$$I_{DS} = \beta \left[(V_{GS} - V_T) V_{DS} - \frac{V_{DS}^2}{2} \right] \quad (6)$$

$$I_{DS} = \beta \frac{(V_{GS} - V_T)^2}{2} \quad (7)$$

$$\beta = \frac{\mu_N \cdot \epsilon_{OX}}{x_{OX}} \cdot \left(\frac{W}{L} \right) \quad (8)$$

onde β é denominado de fator de ganho do transistor. Os elementos que dependem do processo de fabricação são: μ_N – mobilidade dos elétrons, ϵ_{OX} – permissividade do óxido de porta e x_{OX} – espessura do óxido de porta. Os elementos que dependem da geometria da região do canal: L – comprimento do canal e W – largura do canal. A partir da reordenação dos termos da equação (6) pode-se isolar V_T :

$$V_T = V_{GS} - \frac{V_{DS}}{2} \quad (9)$$

O MOSFET tipo n no modo de funcionamento depleção não necessita da aplicação de tensão na porta com a finalidade de formar o canal de condução, pois já possui um canal existente. As curvas de saída e transferência são bem similares as do modo enriquecimento, havendo somente um deslocamento da tensão de limiar para valores menores e também as equações (6) e (7) são válidas neste caso³⁶. A Figura 10 ilustra

esquemáticamente a estrutura do MOSFET tipo n modo depleção onde observa-se o canal de condução já existente.

Figura 10 - Corte transversal do MOSFET tipo n modo depleção.

1.4. Transistor de efeito de campo sensível a íons (ISFET)

O ISFET (do inglês, *Ion-Sensitive Field-Effect Transistor*) foi introduzido por Bergveld em 1970 e se baseia em um MOSFET sem a camada metálica da porta, que foi substituída por um eletrodo de referência. O óxido da região da porta está na mesma solução eletrolítica do eletrodo de referência^{39,40}. A Figura 11 ilustra o diagrama esquemático do MOSFET, ISFET e a representação do circuito eletrônico equivalente que é igual para ambos.

Figura 11 - Diagrama esquemático do (a) MOSFET, (b) ISFET e a (c) representação do circuito elétrico equivalente⁴⁰.

A facilidade do ISFET de detectar íons em solução (Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Cl^- e Ca^{2+})⁴¹, e a capacidade de miniaturização⁴² possibilitaram a sua utilização em várias aplicações, sendo as mais relevantes como sensor de pH⁴³ e biossensores⁴⁴.

O mecanismo de resposta do ISFET pode ser descrito pelo modelo do sítio de ligação (*site-biding*). Esse modelo sugere que existe uma relação direta entre a sensibilidade do ISFET aos íons H^+ e o comportamento da carga superficial⁴⁵, ou seja, o mecanismo de obtenção de carga da interface óxido de porta/solução é baseado na adsorção/dessorção dos íons H^+ . Muitos óxidos metálicos em solução aquosa podem formar uma camada de hidróxido na superfície⁴⁶. No modelo do sítio de ligação esses óxidos da superfície são assumidos como anfóteros, ou seja, são capazes de reagir tanto com bases quanto com ácidos. Os sítios de ligação da superfície podem ser negativos (AO^-), neutros (AOH) ou positivos (AOH_2^+). A Figura 12 ilustra a teoria do modelo de sítio de ligação.

Figura 12 – Representação do modelo do sítio de ligação. Elaboradora pela autora.

As seguintes reações podem ocorrer na superfície^{33,47}:

O óxido de silício é usualmente o óxido de porta do ISFET, entretanto, apresenta sensibilidade entre 24 e 36 mV.pH^{-1} não estando em concordância com o valor teórico da equação de Nernst que é de 59,3 mV.pH^{-1} a 25 °C⁴⁸. Logo, foram introduzidas outras camadas isolantes também de materiais sensíveis aos íons H^+ como o nitreto de silício (Si_3N_4), o óxido de alumínio (Al_2O_3) e o óxido de tântalo (Ta_2O_5). Esses materiais^{41,49} mostraram maior sensibilidade aos íons H^+ como pode-se verificar na Tabela 3 abaixo:

Tabela 3 – Camadas isolantes comumente introduzidas nos ISFETs.

Material	Sensibilidade (mV.pH ⁻¹)
Óxido de silício (SiO ₂)	24 - 36
Óxido de alumínio (Al ₂ O ₃)	54 - 56
Nitreto de silício (Si ₃ N ₄)	52 - 58
Óxido de tântalo (Ta ₂ O ₅)	56 - 58

A densidade de carga superficial depende do potencial de superfície (ψ), das propriedades do material e da concentração de íons H⁺ da solução⁵⁰. Especificamente, o potencial de superfície se altera segundo a equação:

$$\psi = \frac{2,3k_B T}{q} (\text{pH}_S - \text{pH}_{\text{Sol}}) \quad (12)$$

sendo pH_S o pH na superfície, pH_{Sol} o pH da solução, k_B a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta e q a carga elementar. Se $\text{pH}_S = \text{pH}_{\text{Sol}}$ resulta em $\psi = 0$, no caso $\text{pH}_S < \text{pH}_{\text{Sol}}$ então ψ é negativo, significando que os íons H⁺ estão sendo atraídos para a vizinhança da superfície⁵¹. A variação de ψ em relação ao pH da solução pode ser expressa da seguinte forma⁴⁰:

$$\frac{d\psi_S}{d\text{pH}_{\text{Sol}}} = -\frac{2,3k_B T}{q} \alpha \quad (13)$$

$$\frac{d\psi_S}{d\text{pH}_{\text{Sol}}} = -59,3 \cdot \alpha \quad (14)$$

$$\alpha = \frac{1}{\frac{2,3k_B T}{q^2} \cdot \frac{C_s}{\beta_s} + 1} \quad (15)$$

onde C_s é a capacitância da superfície e β_s é a capacidade tamponante da superfície dos óxidos de porta. A capacidade tamponante significa o limite de ácido ou base que pode ser adicionado antes que o tampão não consiga mais resistir a mudança de pH⁵². O parâmetro α descreve a sensibilidade ao pH dos óxidos de porta do ISFET. Esse parâmetro se aproxima do valor unitário para valores grande de β_s/C_s , como pode ser observado na equação (15). Isso significa que quanto maior o valor de β_s e menor C_s (baixa concentração de eletrólitos) mais o valor se aproxima de 59,3 mV a 25 °C⁴⁸.

Os materiais que se comportam de acordo com a equação de Nernst são mais requeridos em sensores de íons devido a sua maior sensibilidade, no entanto, não são funcionais quando aplicados em imunossensores. Materiais não nernstianos são mais eficazes

para detectar a reação imunoquímica de forma direta. Na expressão usada para descrever essa abordagem se compara o valor de V_{GS} do óxido de porta do ISFET e do óxido modificado com a proteína (V_{GS}'), como pode ser observado na equação abaixo³³:

$$V_{GS}' - V_{GS} = (1 - \alpha)\Delta\psi \quad (16)$$

se a sensibilidade do material aos íons H^+ é muito próxima ao valor teórico da equação de Nernst isso resulta em $\alpha = 1$ e a tensão de porta do ISFET não é alterada pela nova distribuição de cargas do complexo formado. Logo, os chamados imunoFETs são restringidos a utilização de materiais não nernstianos para sua funcionalidade³³. O ouro (Au) tem sido usado em imunossensores eletroquímicos, porque é quimicamente inerte e também é um suporte excelente para a imobilização de receptores biomoleculares⁵³. O ouro é um metal nobre resistente à corrosão isso se deve ao seu elevado primeiro potencial de ionização que é de 9,2 eV resultando em uma barreira para a oxidação do material⁵⁴. Os metais nobres não formam óxidos metálicos termodinamicamente estáveis⁵⁵. Os óxidos do ouro são o óxido auroso (Au_2O) e óxido áurico (Au_2O_3) que são facilmente decompostos por calor com a libertação do metal. O Au_2O é um óxido fracamente básico, enquanto o Au_2O_3 é principalmente um óxido levemente ácido^{56,57}. O ouro não forma óxidos anfóteros e a sensibilidade não obedece a equação de Nernst. A sensibilidade do ouro é de aproximadamente 30 mV.pH^{-1} de acordo com resultados empíricos obtidos pelo grupo e publicados em revistas conceituadas^{38,58,59}, logo pode ser utilizado para a construção dos imunoFETs.

A vantagem da aplicação de ISFETs como imunossensores é a possibilidade do uso da microeletrônica na sua produção, o que possibilita sua confecção em larga escala. Em contrapartida, um inconveniente é a dificuldade de isolamento da parte FET do meio reacional e também da imobilização de biomoléculas em um suporte de dimensões reduzidas. Dessa forma, um MOSFET comercial pode ser adaptado para a mesma finalidade com a utilização de um eletrodo externo³⁸, como mostrado na próxima seção.

1.4.1. SEGFET

Imunossensores potenciométricos capazes de detectar alterações de carga podem ser construídos a partir de MOSFETs disponíveis comercialmente^{58,60}, e são alternativas de

baixo custo ao convencional ISFET evitando, portanto, várias etapas de microfabricação e proporcionando um efetivo isolamento do transdutor de sinal a partir da solução.

O EGFET (do inglês, *Extended Gate Field Effect Transistor*) introduzido por Van der Spiegel et al. em 1983 consiste de uma adaptação do ISFET convencional e trata-se de um MOSFET com a porta estendida, onde a membrana (ou eletrodo) sensível é fabricada no mesmo substrato do transistor⁶¹. Esse sistema foi aprimorado por Chi et al. em 2000 usando um MOSFET comercial (CD4007UB). Nessa nova configuração a membrana não está mais sobre o substrato do transistor, mas conectada ao MOSFET comercial através de um fio⁶². Assim, é mais conveniente denominar o dispositivo de SEGFET (do inglês, *Separative Extended Gate Field Effect Transistor*) ou EGFET de porta separada. A montagem do SEGFET está representada na Figura 13.

Figura 13 - Diagrama esquemático de um SEGFET. Elaborado pela autora.

Nessa configuração (Figura 13) o eletrodo (membrana sensível) que pode ser modificado com os receptores biomoleculares está conectado com a porta do MOSFET comercial, e o eletrodo de referência está na mesma solução fechando o circuito. Então, os processos que ocorrem no eletrodo modificado podem ser monitorados através da variação da I_{DS} . Devido à alta impedância de entrada do MOSFET pequenas alterações de carga, como variações de pH, reações enzimáticas ou imunoquímicas podem ser detectadas⁶³. Além disso, a alta impedância é um requisito importante para que correntes não sejam geradas entre o eletrodo de referência e a membrana sensível.

A região eletrodo/solução eletrolítica é caracterizada por forças anisotrópicas, sendo essa região denominada de dupla camada⁶⁴. A dupla camada é formada pelas cargas da

superfície (σ^0), cargas dos íons contrários aos da superfície (σ^1) que são atraídos eletrostaticamente (camada de Stern) e a camada difusa (σ^d)⁶⁵. A dupla camada é eletricamente neutra, sendo que a soma das densidades de carga é zero⁶⁶. A Figura 14 ilustra esquematicamente a dupla camada elétrica formada na interface eletrodo/solução.

Figura 14 – Esquema da dupla camada. Adaptado⁶⁵.

O modelo da dupla camada é importante para o entendimento da distribuição de cargas na interface eletrodo/solução e a introdução do comprimento de Debye. A reação imunoquímica deve ocorrer dentro do comprimento de Debye (κ^{-1}) em uma distância x a partir da superfície de imobilização dos anticorpos, sendo $x < \kappa^{-1}$. Isso ocorre devido aos contra íons da solução que criam um efeito de blindagem na superfície impossibilitando a detecção da interação em distâncias superiores a x . O comprimento de Debye depende da força iônica que é definida como a medida da concentração total de íons na solução^{67,68}. O comprimento de Debye (κ^{-1}) é inversamente proporcional a raiz quadrada da força iônica^{33,66}:

$$I = \mu = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 \quad (17)$$

$$\kappa^{-1} = \left(\frac{\epsilon_0 \epsilon_r k_B T}{2 N_A q^2 I} \right)^{1/2} \quad (18)$$

$$\kappa^{-1} = \frac{0.304}{\sqrt{I}} \quad (19)$$

sendo I a força iônica (mol.L^{-1}), c a concentração molar (mol.L^{-1}), z a carga do íon, κ^{-1} o comprimento de Debye, ϵ_0 a permissividade do vácuo, ϵ_r a constante dielétrica, T a

temperatura absoluta (K), N_A o número de Avogadro, q a carga elementar e k_B a constante de Boltzmann. A constante dielétrica da água utilizada foi de 78,4 a 25 °C (298 K).

1.5. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica e Voltametria Cíclica

A técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica EIS (do inglês, *Electrochemical Impedance Spectroscopy*) é usada para se obter dados como a resistência de transferência de carga R_{tc} e a capacitância do objeto de estudo. O seu mecanismo de funcionamento consiste geralmente na aplicação de uma corrente alternada em potencial fixo, utilizando uma faixa variada de frequências para o estudo de uma amostra^{69,70}. O circuito da Figura 15a é denominado de circuito de Randles e representa um modelo (circuito equivalente) dos processos que ocorrem no eletrodo. A Figura 15b está relacionada a resposta idealizada no plano da impedância complexa (diagrama de Nyquist) do circuito de Randles⁷¹.

Figura 15 – (a) Circuito de Randles e (b) sua resposta idealizada no plano da impedância complexa.

onde R_s , R_{tc} , C_{dc} e W , representam a resistência da solução, a resistência de transferência de carga, a capacitância da dupla camada e a impedância de Warburg, respectivamente.

A voltametria cíclica se baseia na aplicação de ciclos em um intervalo de potencial no eletrodo de trabalho, nesse processo a corrente obtida ao longo da medida é registrada. O voltamograma é a curva da corrente versus o intervalo de potencial aplicado, dessa forma pode-se obter informações sobre a redução e oxidação das espécies eletroativas através dos picos formados⁷², por exemplo, da espécie eletroativa já bem estabelecida no meio científico $Fe(CN)_6^{-3/-4}$. Ainda, é importante utilizar juntamente com a espécie eletroativa um

eletrólito de suporte em excesso na solução, para diminuir efeitos de migração e resistência da solução⁷³.

2. OBJETIVOS

Essa dissertação teve como objetivo principal o estudo e o desenvolvimento de um novo imunossensor para detecção do marcador de insuficiência renal aguda, a proteína cistatina C, usando a configuração de transistor de efeito de campo de porta estendida e separada (SEGFET). Ademais, utilizaram-se técnicas eletroquímicas para analisar as etapas de construção do imunossensor através de um sistema eletroquímico não convencional. Assim, eletrodos foram fabricados, caracterizados e modificados com anticorpos anti-cistatina C a fim de avaliar sua efetividade através de técnicas distintas. A cistatina C é uma proteína que tem potencial para substituir a creatinina sérica como marcador padrão, mostrando superioridade especialmente para detectar pequenas variações da TFG. Logo, espera-se que esse trabalho contribua no sentido de diagnosticar a doença de forma rápida e precoce antes do estabelecimento de um quadro mais grave.

Especificamente, os seguintes objetivos foram alcançados:

I - Implementação do sistema de medida na configuração de SEGFET: Optamos por utilizar uma nova classe de MOSFET comercial com alto valor de transcondutância ($g_m = dI_{out}/dV_{in}$) com tensão de limiar zero para construção do sensor SEGFET. O uso de um MOSFET onde a tensão porta-fonte (V_{GS}) pode ser zero impede a imposição de tensões relativamente elevadas no eletrodo de referência, o que é vantajoso para sua estabilidade. As medidas foram realizadas em uma célula de acrílico com volumes de solução da ordem de microlitros (μL).

II - Fabricação de eletrodos condutores por fotolitografia e sua caracterização. No Laboratório de Microfabricação (LMF) do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano/CNPEN) foram fabricados eletrodos metálicos de ouro e platina em substrato de vidro BK7. O primeiro modelo de eletrodos refere-se a um conjunto de três eletrodos; dois de ouro e um de platina. O segundo modelo é um eletrodo interdigitado de ouro. Os eletrodos foram caracterizados através de Microscopia Eletrônica de Varredura, Microscopia de Força Atômica e por técnicas eletroquímicas.

III - Modificação dos eletrodos com anticorpos anti-cistatina C. Os eletrodos foram modificados com anticorpos anti-cistatina C para o reconhecimento específico da proteína

cistatina C. Técnicas eletroquímicas e a Microscopia de Força Atômica foram utilizadas para verificar o processo de funcionalização do ouro e imobilização dos anticorpos.

IV - Detecção de cistatina C utilizando técnicas eletroquímicas. Utilizou-se um sistema eletroquímico não convencional e miniaturizado para a realização das medidas de Voltametria Cíclica e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica, assim analisou-se a interação antígeno-anticorpo.

V - Detecção de cistatina C utilizando a configuração de SEGFET. Montou-se o sistema na configuração de SEGFET aplicado como imunossensor para a detecção de cistatina C. As medidas foram realizadas em uma célula de acrílico com pequenos volumes de solução da ordem de microlitros e um eletrodo de referência (Ag/AgCl).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os materiais utilizados no trabalho, assim como o processo de fabricação dos eletrodos. Além disso, a funcionalização dos eletrodos e posterior imobilização dos anticorpos, a configuração do sistema de medida experimental e a caracterização dos eletrodos também são descritos em detalhes.

3.1. Procedimento geral de limpeza do substrato de vidro

O processo de limpeza dos substratos de vidro é de vital importância para a remoção de contaminantes como material particulado, resíduos orgânicos e inorgânicos que podem impactar no processo de fotolitografia causando danos aos eletrodos.

Os substratos de vidro BK7 (placas de 5 cm x 5 cm) primeiramente foram lavados com detergente comum e uma esponja macia, seguido de lavagem em água. Posteriormente, foram imersos por 24 horas em uma solução de 1 g.L⁻¹ de permanganato de potássio (KMnO₄), que é um forte agente oxidante. Após esse período lavou-se os substratos com água destilada e foram imersos em uma solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 20% por 2 horas. Logo depois, os substratos foram lavados com água ultrapura e imersos em acetona (PA) aquecida por 5 minutos para secagem. Os substratos de vidro limpos foram embrulhados com papel alumínio para posterior utilização.

3.2. Fabricação dos eletrodos

Os protótipos dos eletrodos foram projetados através do software CAD (do inglês, *Computer-Aided Design*) e então encaminhados para a empresa DGM Design Eletrônicos Ltda, que é especializada em fotoplotação para a produção de fotolitos em filme transparente. A fabricação dos eletrodos foi realizada no Laboratório de Microfabricação (LMF) do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano/CNPEM), localizado em Campinas/SP. O

laboratório dispõe de uma infraestrutura com diversos equipamentos para a microfabricação e uma sala limpa ISO-7 (classe 10.000) de 30 m².

Aplicou-se um jato de nitrogênio (N₂) no substrato de vidro limpo para retirar qualquer material particulado. Primeiramente, o agente promotor de aderência hexametildisilazano 20 % (HDMS) da Sigma-Aldrich foi aplicado sobre o substrato via *spin coating* (2500 rpm por 10s). Os substratos foram submetidos a um tratamento térmico a 100 °C (chapa aquecedora Tecnal modelo TE-038/2-MP) por 10 min para a evaporação e fixação do HDMS. Em seguida, o fotoresiste positivo AZ5214E (AZ Electronic Materials USA Corp.) foi depositado sobre os substratos via *spin coating* a uma rotação de 2000 rpm durante 30 s, seguido de tratamento térmico a 120 °C por 5 min para melhorar a adesão do fotoresiste e evaporação do solvente. A fotoalinhadora Karl Süss KG foi utilizada para a exposição dos substratos à radiação ultravioleta entre 250 a 300 nm, durante 40 s para a sensibilização do fotoresiste. Imergiu o substrato no revelador AZ® 300MIF (AZ Electronic Materials USA Corp.) e segurando-o lateralmente sem estar em contato com o fundo do recipiente, agitou-se levemente por 40 a 50 s para a remoção das regiões degradadas. Lavou-se o substrato em fluxo de água ultrapura passando um pano esponja delicadamente nas bordas e centro do substrato. O substrato foi seco com jato de nitrogênio e colocado na chapa aquecedora a 60 °C. Posteriormente, verificou-se no microscópio óptico (Olympus modelo BH-2) se ainda havia resquício de fotoresiste nas regiões degradadas. Se houvesse o procedimento da revelação era efetuado novamente. Utilizou-se plasma de oxigênio (Plasma Technology Incorporated) para remover resíduos orgânicos, sob pressão de 100 mTorr e potência de 70 W durante 30 s.

Uma fita adesiva foi utilizada para fixar os substratos nos pratos do *sputtering* (Oerlikon Balzers). Depositou-se uma fina camada de cromo (Cr) de 20 nm e posteriormente uma camada de 130 nm de ouro (Au). A utilização do cromo é importante, pois o ouro não adere bem no vidro. A seguir o substrato foi imerso em acetona para o processo de *Litf-off*, esfregando-os levemente com um pedaço de algodão embebido no solvente para remover o fotoresiste. A etapa anterior foi repetida utilizando outro recipiente com acetona e delicadamente passou-se um cotonete nos eletrodos. Por fim, os eletrodos foram lavados com água ultrapura, imersos em álcool isopropílico e secos com jato de nitrogênio.

Foram projetados dois modelos, sendo que em um só foi depositado Cr/Au e no outro modelo que era composto de um conjunto de três eletrodos (dois eletrodos de Cr/Au e um eletrodo de Cr/Pt) foi necessário repetir todo o procedimento da fotolitografia para a

deposição da platina (Pt). As placas foram recobertas com fotoresiste para proteger os eletrodos.

3.3. Corte do substrato de vidro e procedimento de limpeza dos eletrodos

Utilizou-se um cortador de vidro para separar os eletrodos, a Figura 16 apresenta os eletrodos. O fotoresiste protegeu os eletrodos contra riscos que poderiam danificá-lo nesta etapa.

Figura 16 - (a) Substrato de vidro BK7 (5 cm × 5 cm) contendo vários eletrodos e conjunto individual de eletrodos após o corte do substrato e (b) dimensões do eletrodo. (c) Eletrodo interdigitado planar utilizado no SEG-FET e (d) suas dimensões (17 pares de dígitos com largura de 50 μ m, comprimento de 3,4 mm e espaçamento de 50 μ m).

Primeiramente, utilizou-se acetona PA por 15 min no sonicador para remover o fotoresiste de proteção. Em seguida descartou-se a acetona e os eletrodos foram lavados com água ultrapura (Milli-Q®). O procedimento foi repetido mais uma vez. Os eletrodos foram secos com N_2 e reservados.

Na outra etapa de limpeza foram imersos em acetona contida em uma placa de Petri, utilizou-se um pedaço de algodão embebido no solvente e esfregou-se levemente o algodão no eletrodo. Em seguida, transferiu-se para outra placa de Petri com álcool isopropílico (C_3H_8O) para a realização do mesmo processo. Os eletrodos foram transferidos para um béquer contendo água ultrapura, então, foram imersos em uma solução contendo

50 mM de hidróxido de potássio (KOH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na proporção de (4:1), por 5 min. Depois disso foram lavados com água ultrapura em abundância e secos com N_2 .

3.4. Funcionalização química dos eletrodos e imobilização dos anticorpos

Os reagentes utilizados para a funcionalização do ouro e imobilização dos anticorpos foram o ácido 3-mercaptopropiônico (3-MPA), cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e N-Hidroxisuccinimida (NHS), todos provenientes da Sigma-Aldrich. Os anticorpos policlonais anti-cistatina C (IgG) foram comprados da empresa Fitzgerald (código do produto 20-B9123GD00-D0) e para o bloqueio dos sítios remanescentes utilizou-se o aminoácido glicina ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$).

O tampão de fosfato salino PBS (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*) utilizado nas medidas foi adquirido da Sigma-Aldrich. Dissolveu-se 5 tabletes para 1 L de água ultrapura que resultou nas seguintes concentrações de seus constituintes: 10 mM de fosfato, 2,7 mM de cloreto de potássio (KCl) e 137 mM de cloreto de sódio (NaCl), pH 7,4 a 25 °C. O tampão quando está nessas concentrações molares de sais é denominado “1×PBS”. As concentrações de íons, osmolalidade e pH do sangue humano se assemelham as do tampão, além disso ele não é tóxico para a maioria das células⁷⁴. Para o preparo do tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ pH 6,5 foram dissolvidos em água ultrapura os sais: fosfato de sódio dibásico di-hidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), ambos adquiridos da Sigma-Aldrich.

Os eletrodos foram imersos em uma solução de 5 mM de 3-MPA em água ultrapura por 1 h a temperatura ambiente, para a modificação da superfície e formação das monocamadas automontadas. Os eletrodos foram lavados cuidadosamente com água ultrapura. Utilizou-se uma mistura de 20 mM de EDC e 30 mM de NHS ambos em tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ pH 6,5 durante 1 h para ativação dos grupos carboxila das monocamadas automontadas. Lavou-se com tampão fosfato e imediatamente depositou-se 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de anticorpo diluído em 1×PBS sobre o eletrodo por *drop casting*. Após 2 h os eletrodos foram lavados em tampão 1×PBS e os possíveis sítios de ligação remanescentes foram bloqueados com 50 mM de glicina em tampão 1×PBS durante 30 min. A seguir o eletrodo foi lavado em tampão 1×PBS e estocado na geladeira (4 °C) no mesmo tampão até a sua utilização. A Figura 17 resume as etapas de funcionalização do eletrodo e imobilização do anticorpo.

Figura 17 - Etapas de funcionalização do eletrodo e imobilização do anticorpo.

A ligação covalente do grupo tiol (-SH) do reagente 3-MPA com o ouro deixa os grupos carboxílicos livres (-COOH). A carbodiimida reage com os grupos carboxílicos livres na presença do NHS formando um composto intermediário (éster NHS). O reagente NHS promove a eficiência da reação, pois a utilização somente do EDC forma um composto intermediário ativo mais instável denominado O-acilisouréia. A solubilidade do EDC deve ser preferencialmente em tampão com o pH entre 4,5 e 7,2 desprovido de grupo amina e carboxílico. A dupla EDC/NHS permite a reação eficiente de aminas primárias (-NH₂) do anticorpo, esse deve estar preferencialmente em pH entre 7 e 8. As aminas primárias do anticorpo ligam-se aos grupos carboxílicos originais formando uma amida e assim libera-se o NHS em solução^{75,76}. A glicina é importante para bloquear os possíveis sítios de ligação remanescentes evitando, portanto, reações não específicas.

3.5. Medidas Eletroquímicas

As medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria cíclica foram realizadas no potenciostato/galvanostato (Eco Chemie/Metrohm Autolab PGSTAT12 GPES versão 4.9), localizado no Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia (GNano) do Instituto de Física de São Carlos/USP. As técnicas eletroquímicas foram utilizadas para avaliar as características superficiais dos eletrodos com relação à transferência de carga. A partir da

resposta eletroquímica, informações sobre a resistência de transferência de carga R_{tc} e corrente de pico foram obtidas. Usualmente, experimentos eletroquímicos são realizados em uma célula eletroquímica contendo o eletrólito e três eletrodos conforme mostrado esquematicamente na Figura 18: eletrodo de trabalho, eletrodo de referência (usualmente Ag/AgCl ou calomelano saturado) e o contra eletrodo (placa de platina).

Figura 18 - Representação de uma célula eletroquímica típica com três eletrodos (a) eletrodo de trabalho, (b) eletrodo de referência (Ag/AgCl) e (c) contra eletrodo (placa de platina).

O sistema eletroquímico convencional foi modificado e utilizou-se o conjunto de três eletrodos coplanares fabricados no LMF da seguinte maneira: um eletrodo de Au como eletrodo de trabalho, o outro eletrodo de Au como contra eletrodo e o eletrodo de Pt como pseudoreferência (Figura 19). A platina é uma “falsa referência”, pois não consegue manter o potencial constante como um eletrodo de referência usual. No entanto, pode ser adequada dentro de determinadas condições. As vantagens do uso da pseudoreferência são a simplicidade e miniaturização do sistema⁷⁷.

Figura 19 - Conjunto de eletrodos fabricados no LMF utilizados nas medidas eletroquímicas. Os eletrodos de Au (1 e 2) foram utilizados como eletrodo de trabalho e contra eletrodo, e o eletrodo de Pt (3) como pseudoreferência.

Além disso, projetou-se um modelo de adesivo que foi produzido por uma gráfica, para ser utilizado nas medidas como delimitador da área do eletrodo que estaria em contato com a solução, dessa maneira substituiu-se a célula eletroquímica pelo adesivo e foi utilizado somente 30 μ L de solução eletrolítica. Não houve contaminação da cola do adesivo, pois foram realizadas medidas preliminares antes das definitivas. Lavou-se o eletrodo juntamente com o

adesivo várias vezes e substituiu-se o tampão, e não houve descolamento do adesivo. Também não foram observadas mudanças na corrente de pico e resistência de transferência de carga. Como as técnicas eletroquímicas são muito sensíveis qualquer resíduo de cola do adesivo no eletrodo seria detectado. Utilizou-se um suporte com agulhas de contato para a conexão elétrica no potenciostato através de cabos *jumper*s e garras de jacaré, como mostrado na Figura 20.

Figura 20 - Suporte com agulhas de contato para conexão dos eletrodos no potenciostato.

A configuração proposta foi comparada a um sistema eletroquímico usual, sob as mesmas condições experimentais. Utilizou-se uma solução de KCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ como eletrólito de suporte contendo 1 mM da espécie eletroativa $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$. A janela de potencial utilizada na voltametria foi de $-0,4$ a $0,4 \text{ V}$ para os eletrodos fabricados no LMF e $-0,2 \text{ V}$ a $0,6 \text{ V}$ para o sistema convencional, a velocidade de varredura foi de 100 mV.s^{-1} durante dois ciclos. As medidas de EIS foram realizadas em potencial zero na escala de frequências de 10 kHz a $0,1 \text{ Hz}$.

Na configuração proposta foram realizados voltamogramas em várias velocidades de varredura de 10 mV.s^{-1} até 400 mV.s^{-1} para análise da corrente de pico anódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. Utilizou-se o tampão $1\times\text{PBS}$ contendo $2,5 \text{ mM}$ da espécie eletroativa $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$ e dois ciclos para cada velocidade. O eletrodo de trabalho também foi analisado nas etapas de funcionalização, imobilização do anticorpo, bloqueio e interação do anticorpo com o antígeno. A proteína cistatina C foi adquirida liofilizada em PBS da ThermoFisher Scientific (código do produto PHP0044), então, foi diluída em tampão $1\times\text{PBS}$. Avaliou-se também a interação do anticorpo com concentrações crescentes da proteína (3 a 100 ng.mL^{-1}), o tempo de interação foi de 30 min para cada concentração. A janela de potencial utilizada na voltametria cíclica foi de $-0,4$ a $0,4 \text{ V}$, velocidade de varredura de 50 mV.s^{-1} e dois ciclos. As medidas de EIS foram realizadas em potencial zero na escala de frequências de 10 kHz a $0,1 \text{ Hz}$.

3.6. Configuração do SEGFET

Uma unidade de alimentação e medição SMU (do inglês, *Source Measure Unit*) da empresa *Keithley Instruments* (modelo 2612A Dual-channel) foi utilizada para as medidas elétricas no sistema SEGFET. Essa foi conectada ao computador via cabo USB/GPIB e controlada pelo software LabVIEW 2012. O SMU possui dois canais independentes (A e B) para aplicação e medição de tensão e corrente simultaneamente. Os canais foram conectados a um circuito integrado (CI) ALD212900A que contém MOSFETs tipo n modo depleção de alta impedância de entrada ($2.5 \times 10^{10} \Omega$). Conectou-se a porta G_{N1} (pino 2) ao eletrodo interdigitado, que estava em curto-circuito para usar toda a área do eletrodo. O dreno D_{N1} (pino 3) foi conectado ao terminal positivo do canal B e a fonte S_{12} (pino 4) ao terminal negativo do mesmo canal para aplicação da tensão V_{DS} (tensão dreno-fonte). O eletrodo de referência Ag/AgCl (Metrohm Autolab, QCM. REF. EL.) foi conectado ao terminal positivo do canal A e a fonte ao terminal negativo, para aplicação da tensão porta-fonte (V_{GS}) de forma que os negativos dos canais A e B estão conectados. O eletrodo de referência e o eletrodo interdigitado estavam na mesma solução para fechar o circuito. A Figura 21 apresenta o CI e os pinos e diagrama de conexão, o SMU e a configuração esquemática do SEGFET.

Figura 21 - (a) CI ALD212900A, (b) pinos e diagrama de conexão do CI, (c) SMU da *Keithley Instruments* modelo 2612a e (d) configuração esquemática do SEGFET.

Antes de montar o sistema para efetuar as medidas de interação antígeno-anticorpo reproduziram-se as curvas características do circuito integrado, dessa forma comparou-se com

as curvas do *datasheet*. A montagem se deu conectando o canal A do SMU diretamente na porta (V_{GS}) do MOSFET e o restante manteve-se igual. Em seguida, procedeu-se com a montagem do sistema para as medidas de interação antígeno-anticorpo no SEGFET. As curvas de saída foram obtidas variando a tensão dreno-fonte ($I_{DS} \times V_{DS}$) para diferentes valores fixos de tensão no V_{GS} . Posteriormente, as curvas de transferência foram obtidas variando a tensão V_{GS} para valores fixos de V_{DS} ($I_{DS} \times V_{GS}$).

Antes, nas medidas do SEGFET aplicou-se uma tensão $V_{GS} = 0$ V no eletrodo de referência para o monitoramento da I_{DS} ao longo do tempo para uma tensão fixa $V_{DS} = 100$ mV. Só então as curvas de saída e transferência foram obtidas para o SEGFET, ou seja, após certo tempo de estabilização da corrente (em torno de 20 min) e formação da dupla camada elétrica. Vale ressaltar que o circuito integrado ALD212900A possui um canal de condução já existente, pois é um transistor tipo n modo depleção com tensão de limiar $V_T = 0$ V e, portanto, não necessita de tensão elétrica V_{GS} para a formação do canal³⁶.

A solução utilizada na medida foi o tampão PBS diluído 100 vezes “0,01×PBS” que tem uma força iônica baixa. A tensão de porta real aplicada (V_{GS}) no circuito é a tensão sentida pelo eletrodo de trabalho proveniente da solução de medida e do potencial intrínseco do eletrodo de referência. O uso do MOSFET com $V_T = 0$ V mostrou-se muito oportuno para o sistema de medida, pois a aplicação de tensão e uso constante podem comprometer o eletrodo de referência e inevitavelmente a estabilidade da medida. Eletrodos de referência ideais não são polarizados, isto é, permanecem com o potencial de referência estável independentemente da corrente que o atravessa. Na prática isso não se verifica, pois fluxos constantes de correntes consideravelmente grandes passando pelo eletrodo de referência consomem as espécies eletroativas, ocasionando a mudança da atividade e consequentemente do potencial⁷⁸. A Figura 22 apresenta a célula de acrílico empregada nas medidas utilizando o SEGFET que comporta um volume máximo de 600 μ L. A célula possui um anel de borracha (*O’Ring*) e quatro imãs que auxiliam no fechamento, evitando assim o vazamento da solução.

Figura 22 - Célula de acrílico para a realização das medidas no sistema SEGFET.

Utilizou-se o eletrodo interdigitado após passar por todas as etapas de funcionalização e imobilização do anticorpo. O eletrodo foi então encaixado na célula de medida e adicionou-se 500 μL de tampão 0,01 $\times$ PBS. O eletrodo de referência Ag/AgCl foi ajustado corretamente com um suporte e entrou em contato com o tampão de medida através da abertura superior da célula. A medida da interação Ag-Ac foi realizada após se observar a estabilização da corrente, ou seja, I_{DS} deve estar praticamente constante no tempo. Adicionou-se na célula de medida primeiramente o tampão 0,01 $\times$ PBS e depois a proteína cistatina C (solubilizada em tampão 0,01 $\times$ PBS) em concentrações crescentes (3 até 50 ng.mL^{-1}), monitorou-se a variação de I_{DS} no tempo, seguido das medidas das curvas de saída e/ou transferência do SEG-FET. A Figura 23 apresenta o aparato experimental utilizado nas medidas.

Figura 23 – Aparato experimental: (a) SMU, (b) caixa metálica contendo o CI, (c) suporte para o eletrodo de referência, (d) célula de acrílico e (e) leitura dos dados através de um computador via software LabVIEW 2012.

Também foram realizados testes com alguns interferentes como a glicose e a proteína avidina de clara de ovo de galinha, adquirida da empresa Pierce®. A proteína e a glicose foram solubilizadas em tampão 0,01 $\times$ PBS.

3.7. Caracterização dos eletrodos

3.7.1. Sensibilidade do ouro

A sensibilidade do ouro foi verificada usando diferentes soluções ácidas e alcalinas de tampão fosfato 0,1 mol.L^{-1} . Utilizou-se um béquer com 5 mL de cada solução

tampão e o eletrodo de referência de Ag/AgCl. As medidas de sensibilidade ao pH foram realizadas no eletrodo interdigitado previamente limpo sem funcionalização. As medidas potenciométricas foram realizadas no potenciostato no método de cronopotenciometria (corrente zero) e esperou-se a tensão elétrica estar praticamente estável no tempo. As medidas de corrente foram realizadas no SEGFET e esperou-se a estabilização da corrente, para a realização das curvas de saída e transferência para cada valor de pH. O tempo de cada medida em ambos os casos foi de aproximadamente 20 min.

3.7.2. MEV e AFM

Os eletrodos fabricados foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e por microscopia de força atômica AFM (do inglês, *Atomic Force Microscopy*). As imagens de MEV foram realizadas no microscópio eletrônico de varredura com canhão de emissão de campo (FEI modelo Inspect F50) de alta resolução e ampliação de 14 - 1000000 vezes, localizado no Departamento de Engenharia de Materiais (EESC/USP).

O microscópio de força atômica utilizado era proveniente da empresa Nanosurf modelo FlexAFM sonda Tap300Al-G (Budget Sensors) modo Tapping e frequência de ressonância de 300 kHz, localizado no GNano/IFSC. As imagens de AFM foram utilizadas para analisar a morfologia superficial dos eletrodos de ouro com e sem anticorpos imobilizados. Antes das medidas as amostras foram secas com jato de nitrogênio e dessecador a vácuo por 30 minutos. Utilizou-se o software *Gwyddion* versão 2.44 para análise das imagens.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados referentes as imagens de MEV/AFM, a sensibilidade do ouro, as medidas eletroquímicas na configuração proposta comparativamente a um sistema eletroquímico convencional. Ainda, no sistema eletroquímico foram analisadas as etapas envolvidas na construção do imunossensor e interação antígeno-anticorpo. Por fim, são mostrados os resultados das medidas realizadas no SEGFET atuando como imunossensor.

4.1. Caracterização do eletrodo

4.1.1. MEV e AFM

Primeiramente, os eletrodos foram caracterizados por MEV-FEG e AFM. As imagens obtidas por MEV-FEG evidenciam a homogeneidade na deposição do ouro e platina.

Figura 24 - Imagens de MEV-FEG dos eletrodos de (a) ouro e (b) platina.

As imagens de AFM apresentam detalhes sobre a morfologia superficial como a imagem em 3D, rugosidade e altura da rugosidade. Utilizou-se um eletrodo de ouro antes e

depois da imobilização dos anticorpos para confirmar a efetividade do protocolo de imobilização. Os dados são apresentados na Figura 25.

Figura 25 - Imagens de AFM (a) do eletrodo de ouro sem os anticorpos e (b) imagem em 3D, (c) do eletrodo de ouro modificado com os anticorpos e (d) imagem em 3D.

As imagens foram analisadas no software *Gwyddion* versão 2.44 e os resultados obtidos são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados obtidos nas imagens de AFM através do software *Gwyddion*.

Eletrodo de ouro	Altura máxima (nm)	Valor médio da altura (nm)	RMS (nm)	Ra (nm)
Sem os anticorpos	10,66	5,18	1,45	1,15
Com os anticorpos	21,64	9,45	2,59	2,08

O parâmetro Ra (do inglês, *Roughness average*) é o valor médio da altura da superfície (z) em relação ao plano médio. O parâmetro RMS (do inglês, *Root Mean Square*) avalia a rugosidade de uma superfície, calculando o desvio padrão das alturas em torno de um

valor médio. Observa-se o aumento de todos os parâmetros após a imobilização dos anticorpos, dadas que as dimensões de um anticorpo são de aproximadamente $14,2 \text{ nm} \times 8,5 \text{ nm} \times 3,8 \text{ nm}$ ^{79,80} e que eles se adsorvem na superfície de forma quase randômica sendo bastante flexíveis⁸¹, conclui-se que os resultados confirmam a presença dos anticorpos sobre o eletrodo de ouro.

Além disso, observa-se uma mudança na morfologia superficial. As granulações do eletrodo de ouro sem os anticorpos (Figura 25a e 25b) têm o raio médio de 40 a 70 nm e mostram os grãos com formatos mais homogêneos, o que não é observado nas Figuras 25c e 25d que apresentam formatos mais variados de estruturas com raio médio de 19 a 60 nm. Dong e Shannon obtiveram o valor médio da altura de 7,1 nm para os anticorpos imobilizados (IgG) utilizando uma monocamada mista sobre o eletrodo de ouro. A concentração usada foi de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ bem menor a que foi aplicada no protocolo de imobilização ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$), a alta concentração pode levar a formação de agregados na superfície devido às interações dos anticorpos o que pode resultar no aumento do valor médio da altura^{82,83}. Segundo Bergkvist e Ouerghi anticorpos (IgG) adsorvidos na mica apresentaram rugosidade de $2,51^{84}$ e $2,50^{82}$, respectivamente. Os resultados estão próximos ao valor de rugosidade obtido no trabalho que foi de 2,59 nm (RMS).

4.1.2. Sensibilidade do ouro

É importante avaliar se o eletrodo de ouro é sensível às variações de cargas em sua superfície. Uma maneira de fazer isso é medir o potencial de circuito aberto OCP (do inglês, *Open Circuit Potential*) entre o eletrodo de ouro e um eletrodo de referência^{58,85}. Uma mudança na densidade de carga superficial altera o potencial de superfície, isto é, o potencial de circuito aberto⁸⁶. As medidas do OCP foram realizadas no potenciostato no método de cronopotenciometria (corrente zero). Optamos também por avaliar a sensibilidade ao pH do eletrodo no sistema SEGFET. Nesse caso, nas curvas de saída, não se obtém diretamente o valor do OCP, mas sim variações de corrente no MOSFET induzidas pela variação do OCP quando se altera o pH^{38,87}.

Nas medidas de cronopotenciometria após a tensão elétrica estar praticamente estável no tempo utilizou-se o último ponto da curva para a construção do gráfico da variação de tensão em função do pH, como ilustrado na Figura 26.

Figura 26 - Sensibilidade do eletrodo de ouro para diferentes valores de pH.

Em soluções ácidas o OCP é maior devido a maior concentração de cargas positivas e em soluções básicas, o OCP é menor, pois aumenta-se a concentração de cargas negativas presentes nas soluções. O coeficiente de correlação linear (r) foi bem próximo de 1 ($r = 0,99462$), o que evidencia uma boa linearidade entre os pontos. Obteve-se a sensibilidade ao pH do eletrodo de ouro através da inclinação da reta mostrada na Figura 26. O valor obtido foi de 32 mV por unidade de pH.

Nas medidas na configuração de SEGFET, esperou-se a estabilização da corrente para posteriormente fazer as curvas de saída e transferência para cada valor de pH. Nas curvas de saída (Figura 27a), observam-se maiores valores de corrente I_{DS} para soluções ácidas do que para soluções básicas. Este resultado é esperado, uma vez que o MOSFET é tipo n (canal negativo, formado por elétrons). Uma maior concentração de cargas positivas na superfície do eletrodo atrai mais elétrons para a região do canal do MOSFET, aumentando, portanto, o valor de I_{DS} . Por outro lado, em soluções básicas ocorre o contrário, ou seja, uma diminuição da corrente I_{DS} , pois nesse caso, é menor a concentração de íons H^+ na solução e, consequentemente, na superfície do eletrodo. Um comportamento similar foi obtido por Mulato, Edson e Chi utilizando configurações semelhantes e eletrodos de óxido de estanho (SnO_2), óxido de índio-estanho (ITO) e SnO_2 depositado sobre Al/Si, respectivamente. Já nas curvas de transferência (Figura 27b) verifica-se um deslocamento da tensão de limiar V_T para valores mais positivos à medida que se aumenta o valor do pH da solução e, consequentemente, diminui a concentração de íons H^+ na superfície do eletrodo, sendo que observa-se o contrário para soluções ácidas. Quanto menor a concentração de íons H^+ na

solução e, conseqüentemente, na superfície do eletrodo, o potencial é maior e o MOSFET “liga” mais tarde. Em outras palavras, há um deslocamento da tensão de limiar para a direita^{62,87,88}.

Figura 27 - (a) Curva de saída ($I_{DS} \times V_{DS}$) e (b) curva de transferência ($I_{DS} \times V_{GS}$) para diferentes valores de pH.

Os resultados anteriores são importantes, pois demonstram que o sistema é sensível às variações locais de carga e poderá ser aplicado para a detecção Ag-Ac utilizando um conceito similar. A interação Ag-Ac não altera o pH da solução, contudo, uma nova distribuição de carga é esperada já que dependendo dos pontos isoelétricos e do pH da solução os antígenos e anticorpos podem estar carregados positivamente ou negativamente.

4.2. Medidas Eletroquímicas

4.2.1. Caracterização eletroquímica do eletrodo

Primeiramente, a configuração proposta foi comparada ao sistema eletroquímico usual, sob as mesmas condições experimentais. No sistema usual empregou-se o eletrodo de Ag/AgCl como referência, a Figura 28 ilustra os voltamogramas cíclicos e as medidas de impedância eletroquímica (diagrama de Nyquist).

Figura 28 - (a) Voltamogramas cíclicos e (b) diagrama de Nyquist na configuração proposta comparativamente a uma configuração eletroquímica convencional.

Observa-se que os eletrodos fabricados no LMF exibem as mesmas características eletroquímicas do sistema clássico. Entretanto, há um deslocamento do potencial redox do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ para potenciais mais negativos em virtude da diferença do potencial zero entre o eletrodo de trabalho e a pseudorreferência de platina. Na literatura foi encontrado resultados semelhantes obtidos por Carvalho et al. e Ferrario et al. que utilizaram uma pseudorreferência de ouro em comparação com o eletrodo de calomelano saturado (SCE) e o eletrodo de Ag/AgCl, respectivamente^{89,90}. Os eletrodos utilizados nas técnicas eletroquímicas no sistema miniaturizado são interessantes, pois necessitam de pequenos volumes de solução e podem ser aplicados em amostras reais. O diagrama de Nyquist na Figura 28b da configuração proposta é muito semelhante ao sistema usual.

Avaliou-se também o efeito da velocidade de varredura para verificar a resposta dos eletrodos nas medidas de voltametria cíclica utilizando 2,5 mM da espécie eletroativa $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em tampão 1×PBS. A velocidade de varredura foi variada de 10 até 400 mV.s^{-1} . A partir dos dados obtidos construiu-se uma curva da corrente de pico anódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura⁹¹. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 29.

Figura 29 - Corrente de pico anódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.

Observa-se uma excelente correlação dos dados com $r = 0,99995$. Os voltamogramas cíclicos mostram correntes crescentes conforme a velocidade de varredura aumenta e um pequeno deslocamento dos picos anódicos e catódicos. Em um processo reversível a corrente de pico anódico/catódico varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, e a transferência de carga é controlada pelo processo de difusão das espécies.

4.2.2. Etapas de construção do imunossensor

As técnicas eletroquímicas também foram utilizadas para verificar as etapas de funcionalização do eletrodo e imobilização dos anticorpos, bem como a interação do antígeno com o anticorpo. A Figura 30 ilustra a voltametria cíclica e impedância eletroquímica realizada em cada etapa.

Figura 30 - (a) Voltamograma cíclico e (b) diagrama de Nyquist das etapas de construção do imunossensor.

Na Figura 30a verifica-se a diminuição da corrente de pico anódico conforme ocorre a modificação do eletrodo. Na Figura 30b a curva em preto representa o eletrodo de ouro limpo e indica que o processo de limpeza foi bem executado. Em todas as etapas

verificam-se variações crescentes da resistência de transferência de carga R_{tc} , o que confirma a efetividade dos processos envolvidos na construção do imunossensor.

4.2.3. Imunossensor eletroquímico: interação do anticorpo com concentrações crescentes da proteína

Foi analisada a interação do anticorpo com concentrações crescentes da proteína e o tempo de interação foi de 30 min para cada concentração. A Figura 31 ilustra o voltamograma cíclico e a medida de impedância eletroquímica (diagrama de Nyquist) representativos.

Figura 31 - (a) Voltamograma cíclico e (b) diagrama de Nyquist da interação do anticorpo com concentrações crescentes da proteína.

Como esperado as medidas de CV e EIS estão em concordância, pois observa-se o decaimento da corrente de pico anódico e a variação da resistência de transferência de carga conforme aumenta-se a concentração da proteína. Os valores obtidos da corrente de pico anódico e R_{tc} foram utilizados para construir a curva analítica em função da concentração da proteína, usando o resultado das medidas de dois eletrodos, como ilustrado na Figura 32a e Figura 32b.

Figura 32 - Curva analítica das medidas de (a) voltametria cíclica e (b) impedância eletroquímica obtidas para concentrações crescentes de cistatina C.

A curva analítica de ΔI_p % em função da concentração (Figura 32a) apresenta boa linearidade com $r = 0,99286$. ΔR_{tc} é o valor da resistência de transferência de carga do eletrodo modificado 3-MPA-IgG-glicina antes e depois da interação com diferentes concentrações da proteína. ΔI_p % foi calculado da seguinte forma⁹²:

$$\Delta I_p \% = \frac{I_p(glicina) - I_p(proteína)}{I_p(glicina)} \times 100 \quad (20)$$

Não existe até o momento imunossensores eletroquímicos para a detecção de cistatina C. Contudo, uma comparação com publicações recentes usando eletrodos semelhantes é válida. Badea et al.⁹³ utilizaram um eletrodo de ouro impresso da DropSens® (contra eletrodo de platina e pseudoreferência de prata) modificado com BSA e anticorpos, para detectar a ocratoxina A em concentrações na faixa de 2,5 a 100 ng.mL⁻¹, e os resultados mostraram-se satisfatórios usando a pseudoreferência de prata. Ferrario et al. desenvolveram um genossensor via *sputtering* com quatro eletrodos de ouro coplanares (contra eletrodo e pseudoreferência de ouro) e investigou-se os eletrodos em relação a um sistema eletroquímico convencional⁹⁰.

Na literatura há um número considerável de publicações mostrando sistemas não convencionais, como o eletrodo impresso fabricado pela DropSens® que é utilizado no desenvolvimento de sensores por vários centros de pesquisa. Isso dá base para o desenvolvimento de sistemas mais otimizados, como os eletrodos fabricados no LMF que produziram resultados consistentes na voltametria cíclica e EIS.

4.3. Curvas características do circuito

Antes de realizar as medidas na configuração do SEGFET, reproduziram-se as curvas características do MOSFET CI ALD212900A para compará-las com as curvas do *datasheet*. As curvas de saída foram obtidas variando-se o valor de V_{DS} de 0 até 4 V, aplicando-se várias tensões constantes de V_{GS} . As Figuras 33a e 33b ilustram as curvas de saída do *datasheet* e as curvas obtidas experimentalmente.

Figura 33 – (a) Curvas de saída características do CI ALD212900A e (b) as curvas obtidas experimentalmente.

Como se pode notar as curvas de saída apresentaram valores próximos aos do *datasheet*, por exemplo, aplicando $V_{GS} = 2$ V e V_{DS} variando de 0 até 4 V observa-se na Figura 33a que a corrente é de aproximadamente 47 mA⁹⁴, logo está próximo da corrente obtida que foi de 42 mA. Portanto, o CI está em boas condições para a realização das medidas.

Efetuuou-se também a curva de transferência variando V_{GS} de -0,5 até 0,5 V e aplicando uma tensão constante de $V_{DS} = 100$ mV, a partir da derivada segunda da curva obteve-se a tensão de limiar (V_T). Os resultados estão representados na Figura 34a e 34b abaixo:

Figura 34 - (a) Curva de transferência e (b) derivada segunda da curva de transferência para obtenção da V_T .

A derivada segunda da curva $I_{DS} \times V_{GS}$ é um excelente método para a obtenção da tensão de limiar através do pico máximo da curva, no caso do MOSFET tipo n³⁶. Como descrito anteriormente o circuito integrado ALD212900A possui um canal tipo n já existente, pois é um transistor tipo depleção com $V_T = 0$ V. Nota-se na derivada segunda que V_T obtida experimentalmente é de aproximadamente 0,225 V. O valor de V_T diminui para 0,150 V com

a aplicação de uma tensão menor em V_{DS} , como pode-se verificar na Figura 35 abaixo obtida para $V_{DS} = 10$ mV.

Figura 35 – Curva de transferência aplicando uma tensão constante de $V_{DS} = 10$ mV.

Modulando-se V_{GS} e V_{DS} é possível observar mudanças em I_{DS} , assim como deslocamentos de V_T . O circuito integrado ALD212900A é um dispositivo tipo depleção com $V_T = 0,00 \pm 0,01$ V aplicando-se $V_{DS} = 100$ mV, no entanto, como é um dispositivo sensível pode haver deslocamento da tensão de limiar.

4.4. Imunossensor baseado em SEGFET para detecção da cistatina C

4.4.1. Configuração do SEGFET

Após confirmar o funcionamento do CI montou-se a configuração de SEGFET para a realização das medidas usando o eletrodo interdigitado modificado com anticorpos anti-cistatina C. O PBS diluído por um fator de 100 vezes foi utilizado devido à baixa força iônica (I). A partir das equações (17) e (19) pode-se obter os valores de I e κ^{-1} :

$$I = \frac{1}{2} \left((0,137 \times 2) + (0,0027 \times 2) + (0,01 \times 5) + (0,0018 \times 2) \right) \times 0,01 \quad (21)$$

$$I = 0,001665 \text{ mol.L}^{-1}$$

$$\kappa^{-1} = 7,45 \text{ nm} \quad (22)$$

A equação (18) é indicada para eletrólitos monovalentes ($z = \pm 1$). No tampão 0,01×PBS há predominância de íons monovalentes Na^+ , Cl^- e K^+ que tem uma concentração bem maior que o íon bivalente HPO_4^{2-} , portanto, a equação é válida para obter o comprimento de Debye⁶⁶.

Apesar das vantagens de sensores ou biossensores tipo FET, somente variações de potencial que ocorrem dentro do comprimento de Debye (κ^{-1}) podem ser detectadas nesses dispositivos, pois os contra íons da solução criam um efeito de blindagem na superfície do eletrodo de trabalho. Entretanto, em biossensores geralmente as medidas são realizadas próximas às condições fisiológicas visando proporcionar um ambiente mais amigável para as proteínas evitando assim sua desnaturação ou inatividade. O tampão PBS tem sido extensivamente usado como sistema mimético do sangue. O comprimento de Debye calculado segundo a equação (19) para uma solução PBS é ilustrado na Figura 36 em função do tampão PBS. Devido ao tamanho das proteínas fica evidente pela Figura 36 que as interações Ag-Ac só serão detectáveis por imunossensores baseados em FET em soluções de baixa força iônica. Isto implica em etapas de diluição ou dessalinização quando se trata de uma amostra real (soro ou plasma sanguíneo, por exemplo).

Figura 36 – Comprimento de Debye em função do tampão PBS.

A distância teórica da superfície do eletrodo necessária para que o imunossensor SEGFET seja sensível às alterações locais de carga deve ser $x < \kappa^{-1}$, isto é, a reação antígeno-anticorpo deve ocorrer em uma distância menor que o comprimento de Debye. Entretanto, há algumas divergências sobre esse modelo clássico em especial por deturpar as propriedades de adsorção dos anticorpos, sua estrutura e dinâmica. No modelo clássico os anticorpos são considerados corpos rígidos e se ligam a superfície unicamente pela região Fc. Na prática eles adsorvem na superfície quase aleatoriamente e são bastante flexíveis⁸¹. Embora haja esses problemas o modelo clássico ainda continua sendo o mais usado.

O espalhamento de raios-X a baixo ângulo SAXS (do inglês, *Small-Angle X-Ray Scattering*) é uma técnica não destrutiva que possibilita obter informações como a massa molecular, máxima dimensão e o raio de giro (R_G). Além disso, a amostra analisada pode estar em solução e sob várias condições experimentais de pressão e temperatura⁹⁵. O raio de giro é um dos parâmetros mais importantes e fornece a média dos raios da estrutura em relação ao seu centro de massa⁹⁶. Segundo Kilár e Tian o R_G da IgG humana é 6,00 nm⁹⁷ e 4,94 nm⁹⁸, respectivamente. As moléculas utilizadas no processo de imobilização dos anticorpos têm comprimento desprezível e não foram somadas ao valor do raio de giro. Portanto, R_G é menor que o comprimento de Debye sendo $\kappa^{-1} = 7,45$ nm e considerando que os anticorpos se adsorvem na superfície de forma quase aleatória e são flexíveis, conclui-se que há condições para que o sinal da reação antígeno-anticorpo seja detectado pelo dispositivo.

Além disso, o pI da IgG está entre 6 e 8,5⁹⁹ e da proteína cistatina C humana não-glicosilada é 9,3¹⁰⁰, assim no tampão 0,01×PBS ela está carregada positivamente. Dessa forma, espera-se um acúmulo de cargas positivas na superfície do eletrodo, aumentando a corrente de dreno após à interação antígeno-anticorpo. A cistatina C tem 13 kDa e o R_G é 2,25 nm¹⁰¹, observando o R_G da IgG pode-se deduzir que a proteína estará completamente ou boa parte dela dentro do comprimento de Debye, portanto, a carga positiva poderá ser detectada em sua totalidade ou em parte.

Atuando como imunossensor para a detecção de cistatina C, primeiramente avaliou-se na configuração do SEGFET a corrente de dreno empregando-se $V_{GS} = 0$ V e $V_{DS} = 100$ mV até a sua estabilização no tempo. Após a estabilização da corrente, as curvas de saída e transferência foram então obtidas, assim como V_T a partir da derivada segunda da curva de transferência como ilustrado na Figura 37.

Figura 37 - (a) Curva de saída, (b) curva de transferência e (c) derivada segunda (SEGFET).

A corrente a ser medida utilizando $V_{GS} = 0$ V e $V_{DS} = 100$ mV é da ordem de μA na estabilização do sistema como observa-se na curva de saída (Figura 37a). A tensão de limiar foi aproximadamente 30 mV (Figura 37c), embora $V_{GS} = 0$ V a tensão de porta real aplicada é a tensão sentida pelo eletrodo proveniente dos íons da solução e do potencial intrínseco do eletrodo de referência. Essas medidas foram realizadas sem a presença da proteína alvo na célula de medida. Vale ressaltar que optamos por trabalhar em baixas tensões que é vantajoso para sensores, pois tensões muito altas de V_{DS} tendem a demorar mais na estabilização da corrente.

4.4.2. Resposta do imunossensor: para a cistatina C e interferentes

A resposta do imunossensor para a cistatina C pode ser verificada na Figura 38a através da alteração de I_{DS} no tempo. Após a estabilização, primeiramente adicionou-se o

tampão para verificar seu efeito na medida da corrente e observou-se que não houve alteração significativa. A proteína foi diluída no mesmo tampão da medida na concentração de 50 ng.mL^{-1} e foi adicionado o mesmo volume do branco ($10 \text{ }\mu\text{L}$). Após a introdução da proteína cistatina C na célula de medida, verificou-se um aumento da corrente como esperado. Como já exposto anteriormente, o pI da cistatina C é 9,3 e ela está carregada positivamente no tampão que tem pH 7,4.

A resposta dinâmica do imunossensor também foi verificada na presença de interferentes como a glicose ($\text{MM} = 180,16 \text{ g.mol}^{-1}$) e a proteína avidina (66 kDa). A concentração de glicose no sangue é de $1,1 \text{ mg.mL}^{-1}$, considerou-se como no PBS um fator de diluição de 100 vezes, portanto, a concentração final de glicose no sistema foi de $11 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. A avidina é uma proteína encontrada na clara de ovos crus de aves, répteis e anfíbios. Optou-se por utilizá-la devido ao seu pI de $10,5^{102}$, que está próximo ao da cistatina C e também está carregada positivamente no tampão de medida. Utilizou-se para a realização do teste uma concentração final de avidina de $10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. A Figura 38b apresenta a resposta do imunossensor e observa-se que não houve alteração significativa da corrente após a adição dos interferentes. Logo, o imunossensor é específico para a cistatina C e apresenta uma mudança insignificante da corrente para os interferentes.

Figura 38 – Comparação da resposta do imunossensor à adição de (a) cistatina C e de (b) interferentes.

A seguir foi realizada a medida para monitorar a reação imunoquímica com diferentes concentrações finais da proteína no sistema, sempre esperando a estabilização da corrente para posteriormente realizar as curvas de saída e/ou transferência. A Figura 39a

mostra as curvas de saída representativas para diferentes concentrações de cistatina C e a Figura 39b a curva analítica das medidas em triplicata.

Figura 39 - (a) Curva de saída e a (b) curva analítica de ΔI_{DS} % em função de diferentes concentrações da proteína (3, 10, 20 e 30 ng.mL⁻¹).

Pode-se observar o aumento de corrente conforme a concentração da proteína também aumentava. ΔI_{DS} % foi calculado utilizando o último valor de corrente de cada curva, e da seguinte forma:

$$\Delta I_{DS} \% = \frac{I_{DS}(\text{branco}) - I_{DS}(\text{proteína})}{I_{DS}(\text{branco})} \times 100 \quad (23)$$

sendo o branco o último valor de corrente da curva de saída do tampão 0,01×PBS.

As curvas de transferência foram traçadas e construiu-se a curva analítica com os dados das medidas (Figura 40). Nesse caso, os dados obtidos de dois eletrodos diferentes foram utilizados para fazer a curva analítica.

Figura 40 - (a) Curvas de transferência e (b) curva analítica de ΔV_{GS} % em função de diferentes concentrações da proteína (3, 10, 20, 30 e 50 ng.mL⁻¹).

ΔV_{GS} % foi calculado utilizando um valor fixo de corrente e anotando-se a diferença de tensão entre a curva do tampão 0,01xPBS (branco) e a curva de cada concentração. Os valores anotados foram utilizados para obter ΔV_{GS} %:

$$\Delta V_{GS} \% = \frac{V_{GS}(\text{branco}) - V_{GS}(\text{proteína})}{V_{GS}(\text{branco})} \times 100 \quad (24)$$

As curvas analíticas apresentam boa linearidade, e estimou-se também o limite de detecção (L.D.) e o limite de quantificação (L.Q.) da proteína conforme as expressões abaixo^{103,104}:

$$L.D. = \frac{|3,3 \times S_{x,y}|}{b} \quad (25)$$

$$L.Q. = \frac{|10 \times S_{x,y}|}{b} \quad (26)$$

em que $S_{x,y}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração e b é a inclinação da curva analítica. O limite de detecção indica o menor valor que o analito pode ser detectado, no entanto, esse valor pode não ser necessariamente quantificado¹⁰³. O limite de quantificação é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitável¹⁰⁴. A Tabela 5 apresenta os dados obtidos de forma mais clara.

Tabela 5 - Valores estimados de L.D. e L.Q. para o imunossensor.

Curvas	Coeficiente de correlação linear (r)	Limite de Detecção (L.D.)		Limite de Quantificação (L.Q.)	
		ng.mL ⁻¹	pmol.L ⁻¹	ng.mL ⁻¹	pmol.L ⁻¹
$\Delta I_{DS} \% \times [CST3]$	0,98122	0,75	57	2,27	175
$\Delta V_{GS} \% \times [CST3]$	0,99846	0,28	22	0,87	67

* Considerando a massa molar da proteína 13.000 g/mol.

O imunossensor baseado em transistor de efeito de campo também conseguiu detectar a reação imunoquímica, comparativamente, as técnicas eletroquímicas que já são bem consolidadas no meio científico⁷¹. No mesmo sentido, outra vantagem do imunossensor se refere à detecção de forma direta, isto é, a detecção da proteína alvo se dá sem a presença de outras moléculas (como a espécie eletroativa $Fe(CN)_6^{3-/4-}$) ou anticorpo secundários, que podem resultar em sinais perturbativos e não específicos.

As concentrações de cistatina C encontradas no soro sanguíneo estão entre 530 e 920 ng.mL⁻¹ para indivíduos saudáveis com menos de 50 anos e entre 580 e 1020 ng.mL⁻¹ para pessoas acima de 50 anos²³. Na urina as concentrações normais estão entre 33 e 300 ng.mL⁻¹. Como já exposto, a força iônica da solução é um ponto muito importante para que o dispositivo consiga detectar a alteração local de carga. Sendo assim, a diluição da amostra real de sangue ou urina por um fator de 100 vezes poderia ser uma alternativa a partir da utilização de volumes conhecidos da solução de medida. Em caso de diluição por um fator de 100, as concentrações normais de cistatina C encontradas no soro sanguíneo diluído estariam aproximadamente entre

5 e 10 ng.mL⁻¹. Na urina diluída, as concentrações seriam de 0,33 até 3 ng.mL⁻¹. Fica claro que para o imunossensor proposto, seria mais viável trabalhar com amostras diluídas de soro, pois tem uma concentração maior de cistatina C. Dessa forma, apenas uma etapa de diluição seria necessária para contornar as restrições de detecção impostas pelo comprimento de Debye do ponto de vista de aplicação prática do imunossensor proposto. No caso da urina, uma opção seria utilizar colunas de dessalinização já utilizadas pelo grupo, que retêm sais e moléculas pequenas. Dessa forma, não há necessidade de diluição da amostra, também podendo ser utilizadas em amostras de soro sanguíneo.

Conforme sugerido pelo grupo do professor Lieber, que detectaram antígenos biomarcadores de câncer utilizando imunossensores baseados em FETs compostos por nanofios de silício¹⁰⁵, diversos nanomateriais como nanofios de óxidos semicondutores, nanotubos de carbono, grafeno e outras nanoestruturas 2D têm sido utilizados para a fabricação de sensores/biossensores baseados em transistor de efeito de campo, representando o estado da arte dessa linha de pesquisa¹⁰⁶. Contudo, em todos os sistemas supracitados, necessita-se construir o transistor, onde há várias etapas não triviais de micro ou nano processamento. Com essa limitação, a viabilidade/validação de novos receptores para o reconhecimento biomolecular fica, de certa forma, limitada aos grandes centros de pesquisa com equipamentos modernos e uma sala limpa.

Não existem até o momento na literatura imunossensores tipo FET para a detecção de cistatina C. Contudo, uma comparação do imunossensor aqui proposto com a técnica clássica de imunoensaio ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e outras técnicas para a detecção de cistatina C é válida. Jiang et al. detectaram a cistatina C utilizando um kit ELISA com limite de detecção de 0,5 ng.mL⁻¹ na faixa de concentrações de 0,5 a 31,3 ng.mL⁻¹ aproximadamente¹⁰⁷. No entanto, a técnica ELISA, apesar de ser utilizada como técnica de rotina, não é adequada para um teste rápido, uma vez que envolve várias etapas, equipamentos custosos e pessoal treinado para sua implementação.

Gorodkiewicz e Luszczyn¹⁰⁸ utilizaram a técnica de SPRI (do inglês, *Surface Plasmon Resonance Imaging*) para a detecção de cistatina C, usando a enzima papaína (cisteíno protease) ativada com NHS/EDC e imobilizada na superfície do ouro modificada quimicamente com cisteamina. A cistatina C interage especificamente com a papaína inibindo sua atividade. A resposta dinâmica do sensor foi de 0 até 600 ng.mL⁻¹ e o limite de detecção foi de 90 ng.mL⁻¹. No entanto, é importante mencionar que o equipamento da técnica de SPRI tem um custo elevado se comparado com o sistema aqui proposto.

Lin et al.¹⁰⁹ apresentaram um método simples para detecção de cistatina C usando *nanoclusters* de ouro estabilizados na proteína BSA como uma sonda fluorescente. A fluorescência do conjugado é efetivamente extinta pela papaína devido à proteólise da BSA, e na presença de cistatina C a atividade da papaína é inibida e a fluorescência pode ser observada. O método permite a detecção seletiva na faixa de concentração 25 a 2000 ng.mL⁻¹ e limite de detecção de 4,0 ng.mL⁻¹.

Considerando os sistemas supracitados com o imunossensor SEGFET proposto, bem como a escala de operação e os limites de detecção e quantificação estimados, podemos considerar que o nosso sistema é bastante competitivo. Apesar da necessidade de testes em amostras reais e outros pontos que necessitam de aprofundamento, o sistema proposto oferece muitas vantagens como a rapidez na realização das medidas, facilidade na montagem do sistema e a possibilidade de tornar o dispositivo portátil para o uso em laboratórios clínicos.

5. CONCLUSÃO

Os eletrodos foram caracterizados por MEV, AFM e técnicas eletroquímicas. Também foi analisada a sensibilidade do eletrodo de ouro usando soluções com diferentes valores de pH, e obteve-se o valor de 32 mV.pH^{-1} que está de acordo com os resultados empíricos obtidos pelo grupo, confirmando que o ouro é um material não nernstiano e, portanto, ideal para ser aplicado em imunossensores.

Todas as novidades desenvolvidas para o sistema eletroquímico, como a fabricação do conjunto de três eletrodos no mesmo substrato, a utilização de uma pseudorreferência e um adesivo delimitador propiciaram a miniaturização do sistema e os resultados foram bem consistentes. Observou-se que os eletrodos fabricados no LMF exibiram as mesmas características eletroquímicas do sistema clássico, usando uma pseudorreferência de platina.

Nas medidas no SEGFET observou-se um aumento da corrente após a adição da proteína. No entanto, para os interferentes (glicose e avidina) não houve mudança significativa da I_{DS} . Foram realizadas medidas para monitorar a reação imunoquímica com diferentes concentrações da proteína e, posteriormente, as curvas características do sistema foram obtidas e a partir dos dados construiu-se as curvas analíticas. Nas curvas analíticas $\Delta I_{DS} \% \times [CST3]$ e $\Delta V_{GS} \% \times [CST3]$ os coeficientes de correlação linear foram $r = 0,98122$ e $r = 0,99846$, e os limites de detecção foram de $0,75$ e $0,28 \text{ ng.mL}^{-1}$ e quantificação de $2,27$ e $0,87 \text{ ng.mL}^{-1}$, respectivamente, na faixa de concentração de 3 até 50 ng.mL^{-1} . Os valores estimados do L.D. e L.Q. são baixos e próximos aos limites de outras técnicas. Um impasse é a força iônica que está diretamente relacionada com o comprimento de Debye, mas isso pode ser resolvido diluindo por um fator de 100 vezes as amostras de soro e urina, ou ainda nas amostras de urina utilizar colunas de dessalinização. Embora essas limitações estejam presentes, ainda sim o imunossensor oferece muitas vantagens como simplicidade, facilidade de fabricação, rapidez nas medidas e detecção de forma direta. O trabalho é inovador, pois não há relatos na literatura de um imunossensor usando a configuração de SEGFET, para detectar a IRA através da proteína cistatina C. Logo, é promissor e pode contribuir futuramente com o propósito de diagnosticar precocemente a Insuficiência Renal Aguda.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ÉVORA, P. R. B.; GARCIA, L. V. EQUILÍBRIO ÁCIDO-BASE. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 41, n. 3, p. 301–311, 2008.
2. VERONEZ, D. A. DA L.; VIEIRA, M. P. M. M. Disponível em: <http://rle.dainf.ct.utfpr.edu.br/hipermidia/images/documentos/Abordagem_morfofuncional_do_sistema_urinario.pdf>. Acesso em: 14 set. 2016.
3. JUNIOR, H. H. **Visão Geral do Sistema Renal**. Disponível em: <<http://eaulas.usp.br/portal/video.action?idItem=2454>>. Acesso em: 15 set. 2016.
4. PUTNAM, D. F. Composition and concentrative properties of human urine. **Nasa Contractor Report**, Washington, 1971.
5. **Sistema Endócrino**. Disponível em: <<http://www.radier.com.br/downloads/2AulaSistemaEndocrino.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2016.
6. MELDAU, D. C. **Rim**. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/sistema-urinario/rim/>>. Acesso em: 15 set. 2016.
7. COSTA, J. A. C. DA; VIEIRA-NETO, O. M.; MOYSÉS NETO, M. Insuficiência renal aguda. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 36, p. 307–324, 2003.
8. KELLY, K. J. Acute renal failure: Much more than a kidney disease. **Seminars in Nephrology**, v. 26, n. 2, p. 105–113, 2006.
9. DENNEN, P.; DOUGLAS, I. S.; ANDERSON, R. Epidemiology of AKI in the ICU. **Society of Critical Care Medicine**, v. 38, n. 1, p. 261–275, 2010.
10. YU, L.; SANTOS, B. F. C.; BURDMANN, E. A.; SUASSUNA, J. H. R.; BATISTA, P. B. P. **Insuficiência Renal Aguda**. Disponível em: <http://sbn.org.br/app/uploads/Diretrizes_Insuficiencia_Renal_Aguda.pdf>. Acesso em: 23 jul. 2016.
11. KDIGO. **Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury**. Disponível em: <http://www.kdigo.org/clinical_practice_guidelines/pdf/KDIGO-AKI-Suppl-Appendices-A-F_March2012.pdf>. Acesso em: 14 set. 2016.

12. NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. **Frequently asked questions about GFR estimates.** Disponível em: <http://www.kidney.org/sites/default/files/docs/12-10-4004_abe_faqs_aboutgfrrev1b_singleb.pdf>. Acesso em: 17 set. 2016.
13. GABRIEL, I. C.; NISHIDA, S. K.; KIRSZTAJN, G. M. Cistatina C sérica: uma alternativa prática para avaliação de função renal? **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 33, n. 2, p. 261–267, 2011.
14. PERES, L. A. B. et al. Biomarcadores da injúria renal aguda. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 35, n. 3, p. 229–236, 2013.
15. RESENDE, L. M. H.; VIANA, L. DE G.; VIDIGAL, P. G. **Protocolos clínicos dos exames laboratoriais.** Disponível em: <http://www.uberaba.mg.gov.br/portal/acervo/saude/arquivos/oficina_10/protocolos_examenes_laboratoriais.pdf>. Acesso em: 1 dez. 2016.
16. MILLER, W. G. Estimating glomerular filtration rate. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 47, n. 9, p. 1017–1019, 2009.
17. MURTY, M. S. N.; SHARMA, U. K.; PANDEY, V. B.; KANKARE, S. B. Serum cystatin C as a marker of renal function in detection of early acute kidney injury. **Indian Journal of Nephrology**, v. 23, n. 3, p. 180–183, 2013.
18. ABRAHAMSON, M. Cystatins. **Methods in Enzymology**, v. 244, p. 685–700, 1994.
19. NIH-3D-PRINT. **Crystal structure of monomeric human cystatin C stabilized against aggregation.** Disponível em: <<http://3dprint.nih.gov/discover/3dpx-001588>>. Acesso em: 22 jul. 2016.
20. JANOWSKI, R. et al. Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping. **Nature structural biology**, v. 8, n. 4, p. 316–320, 2001.
21. TURK, V.; BODE, W. The cystatins: Protein inhibitors of cysteine proteinases. **FEBS Letters**, v. 285, n. 2, p. 213–219, 1991.
22. EKSTRÖM, U. et al. Internalization of cystatin C in human cell lines. **The FEBS Journal**, v. 275, n. 18, p. 4571–4582, 2008.

23. BLEHER, O.; EHNI, M.; GAUGLITZ, G. Label-free quantification of cystatin C as an improved marker for renal failure. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 1, p. 349–356, 2012.
24. CLARK, C. L.; 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, 1962.
25. MASCINI, M.; PALCHETTI, I. **Biosensor Technology: A Brief History**. Cham: Springer Netherlands, 2010.
26. THEVENOT, D.; TOTH, K.; DURST, R.; WILSON, G. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification (Technical report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, n. 12, p. 2333–2348, 1999.
27. GRAHAM, A. H. D.; ROBBINS, J.; BOWEN, C. R.; TAYLOR, J. Commercialisation of CMOS integrated circuit technology in multi-electrode arrays for neuroscience and cell-based biosensors. **Sensors**, v. 11, n. 5, p. 4943–4971, 2011.
28. GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VÖRÖS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 8, p. 1400–1458, 2008.
29. ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. São Paulo: Artmed Editora S.A., 2010.
30. MAYER, G. **Imunoglobulinas – Estrutura e Função**. Disponível em: <<http://www.microbiologybook.org/Portuguese/immuno-port-chapter4.htm>>. Acesso em: 16 jul. 2016.
31. COICO, R. **Immunology: A Short Course**. 7. ed. Oxford: John Wiley & Sons Ltd, 2015.
32. THERMOFISHER. **Antibody Fragmentation**. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/antibody-fragmentation.html>>. Acesso em: 17 jul. 2016.

33. SCHASFOORT, R. B. M.; BERGVELD, P.; KOOYMAN, R. P. H.; GREVE, J. Possibilities and limitations of direct detection of protein charges by means of an immunological field-effect transistor. **Analytica Chimica Acta**, v. 238, p. 323–329, 1990.
34. HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J. **Fundamentos de Física: óptica e física moderna**. 4 ed. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 1995. 355 p.
35. GRAY, P. E.; SEARLE, C. L. **Princípios de Eletrônica**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S. A, 1974. 444 p.
36. MARTINO, J. A.; PAVANELLO, M. A.; VERDONCK, P. B. **Caracterização Elétrica de Tecnologia e Dispositivos MOS**. São Paulo: Thomsom, 2003. 193 p.
37. LSI/USP. **Curso - Introdução à Eletrônica PSI2223**. Disponível em: <[http://www.lsi.usp.br/~acseabra/grad/2223_files/Aula19 Sedra42021_ch03c versao rede-8.pdf](http://www.lsi.usp.br/~acseabra/grad/2223_files/Aula19%20Sedra42021_ch03c%20versao%20rede-8.pdf)>. Acesso em: 19 jul. 2016.
38. FERNANDES, E. G. R.; VIEIRA, N. C. R.; QUEIROZ, A. A. A.; GUIMARÃES, F. E. G.; ZUCOLOTTI, V. Immobilization of poly(propylene imine) dendrimer/nickel phthalocyanine as nanostructured multilayer films to be used as gate membranes for SEG-FET pH Sensors. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 14, p. 6478–6483, 2010.
39. BERGVELD, P. Development of an Ion-Sensitive Solid-State Device for Neurophysiological Measurements. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. BME-17, n. 1, p. 70–71, 1970.
40. BERGVELD, P. Thirty years of ISFETOLOGY: What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 88, n. 1, p. 1–20, 2003.
41. YUQING, M.; JIANGUO, G.; JIANRONG, C. Ion sensitive field effect transducer-based biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 21, n. 6, p. 527–534, 2003.
42. FERNANDES, J. C. B.; KUBOTA, L. T.; NETO, G. D. O. Eletrodos íon-seletivos: Histórico, mecanismo de resposta, seletividade e revisão dos conceitos. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 120–130, 2001.

43. YUQING, M.; JIANRONG, C.; KEMING, F. New technology for the detection of pH. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 63, n. 1, p. 1–9, 2005.
44. XU, J.-J.; LUO, X.-L.; CHEN, H.-Y. Analytical aspects of fet-based biosensors. **Frontiers in bioscience**, v. 10, p. 420–30, 2005.
45. VAN HAL, R. E. G.; EIJKEL, J. C. T.; BERGVELD, P. A general model to describe the electrostatic potential at electrolyte oxide interfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 69, n. 1-3, p. 31–62, 1996.
46. DEGEN, A.; KOSEC, M. Effect of pH and impurities on the surface charge of zinc oxide in aqueous solution. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 20, n. 6, p. 667–673, 2000.
47. YATES, D. E.; LEVINE, S.; HEALY, T. W. Site-binding Model of the Electrical Double Layer at the Oxide/Water Interface. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases**, v. 70, n. 1, p. 1807–1818, 1974.
48. BERGVELD, P.; VAN HAL, R. E. G.; EIJKEL, J. C. T. The remarkable similarity between the acid-base properties of ISFETs and proteins and the consequences for the design of ISFET biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 10, n. 5, p. 405–414, 1995.
49. PALÁN, B.; SANTOS, F. V.; KARAM, J. M.; COURTOIS, B.; HUSÁK, M. New ISFET sensor interface circuit for biomedical applications. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 57, n. 1-3, p. 63–68, 1999.
50. WINDBACHER, T. **Modeling of Electrolytic Interfaces - Insulator Surface Charge: Site-Binding Model**. Disponível em: <<http://www.iue.tuwien.ac.at/phd/windbacher/node49.html>>. Acesso em: 20 jul. 2016.
51. DAVIES, J. T.; RIDEAL, E. K. **Interfacial Phenomena**. 1. ed. New York: ACADEMIC PRESS INC., 1961. 474 p.
52. SILVA, C. R.; SIMONI, J. DE A. Avaliação da capacidade tamponante - um experimento participativo. **Química Nova**, v. 23, n. 3, p. 405–409, 2000.

53. KARYAKIN, A. A.; PRESNOVA, G. V.; RUBTSOVA, M. Y.; EGOROV, A. M. Oriented Immobilization of Antibodies onto the Gold Surfaces via Their Native Thiol Groups. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 16, p. 3805–3811, 2000.
54. CORTI, C.; HOLLIDAY, R. (EDS.). **Gold: science and applications**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2010. 446 p.
55. SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. **Química Inorgânica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 2003. 816 p.
56. GREENWOOD, N. N.; EARNSHAW, A. **Chemistry of the Elements**. 2. ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1997. 1359 p.
57. SMITH'S-COLLEGE-CHEMISTRY. **Silver, gold and the platinum metals**. Disponível em:
<[http://dspace.wbpublibnet.gov.in:8080/jspui/bitstream/10689/784/6/Chapter_3_448 - 662p.pdf](http://dspace.wbpublibnet.gov.in:8080/jspui/bitstream/10689/784/6/Chapter_3_448-662p.pdf)>.
58. VIEIRA, N. C. S. et al. Label-free electrical recognition of a dengue virus protein using the SEG-FET simplified measurement system. **Analytical Methods**, v. 6, n. 22, p. 8882–8885, 2014.
59. FIGUEIREDO, A. et al. Electrical detection of dengue biomarker using egg yolk immunoglobulin as the biological recognition element. **Scientific reports**, v. 5, n. 7865, p. 1–5, 2015.
60. VIEIRA, N. C. S. **Sensores e biossensores baseados em transistores de efeito de campo utilizando filmes automontados nanoestruturados**. 2012. 120 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.
61. VAN DER SPIEGEL, J.; LAUKS, I.; CHAN, P.; BABIC, D. The extended gate chemically sensitive field effect transistor as multi-species microprobe. **Sensors and Actuators**, v. 4, p. 291–298, 1983.
62. CHI, L. L.; CHOU, J. C.; CHUNG, W. Y.; SUN, T. P.; HSIUNG, S. K. Study on extended gate field effect transistor with tin oxide sensing membrane. **Materials Chemistry and Physics**, v. 63, n. 1, p. 19–23, 2000.

63. FIGUEIREDO, A. **Imunossensores potenciométricos para a detecção da proteína NS1 do vírus da dengue**. 2013. 115 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2013.
64. TICIANELLI, E. A.; GONZALEZ, E. R. **Eletroquímica**. 2. ed. São Paulo: Edusp, 2005. 220 p.
65. HOTZA, D. Artigo revisão: colagem de folhas cerâmicas. **Cerâmica**, v. 43, n. 283-284, p. 157–164, 1997.
66. ISRAELACHVILI, J. N. **Intermolecular and Surface Forces**. 3. ed. Burlington: Elsevier, 2011. 674 p.
67. SOLOMON, T. The Definition and Unit of Ionic Strength. **Journal of Chemical Education**, v. 78, n. 12, p. 1691, 2001.
68. IUPAC. **Gold Book: Ionic Strength**. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org/I03180.html>>. Acesso em: 12 jul. 2016.
69. XU, Q.; DAVIS, J. J. The Diagnostic Utility of Electrochemical Impedance. **Electroanalysis**, v. 26, n. 6, p. 1–11, 2014.
70. BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods Fundamentals and Applications**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001. 833 p.
71. DE CARVALHO, L. A.; DE ANDRADE, A. R.; BUENO, P. R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 796–804, 2006.
72. BRETT, A. M.; BRETT, C. M. **Electrochemistry: Principles, methods and applications**. Oxford: Oxford University Press, 1993. 456 p.
73. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; WEST, D. M.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. Editora Thomson, 2005. 1124 p.
74. SIGMA-ALDRICH. **Phosphate buffered saline**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p4417?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 17 jun. 2016.

75. THERMOFISHER. **Chemistry of Crosslinking**. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemistry-crosslinking.html>>. Acesso em: 18 jul. 2016.
76. THERMOFISHER. **NHS and Sulfo-NHS**. Disponível em: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011309_NHS_SulfoNHS_UG.pdf>. Acesso em: 18 jul. 2016.
77. INZELT, G. Pseudo-reference Electrodes. In: LEWENSTAM, A.; INZELT, G.; SCHOLZ, F. (Eds.). . **Handbook of Reference Electrodes**. Berlim: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 331–332.
78. DA SILVA, A. Í.; ARAÚJO FILHO, H. D. C.; SILVA, R. C. Testes de desempenho de eletrodos: Eletrodos de referência. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 512–517, 2000.
79. FOLEY, J. O.; NELSON, K.; MASHADI-HOSSEIN, A.; FINLAYSON, B. A. Concentration Gradient Immunoassay (CGIA) II. Computational Modeling for Analysis and Optimization. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 10, p. 3549–3553, 2007.
80. LEE, J. O. et al. Aptamers as molecular recognition elements for electrical nanobiosensors. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, n. 4, p. 1023–1032, 2008.
81. CASAL, P. et al. ImmunoFET feasibility in physiological salt environments. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**, v. 370, n. 1967, p. 2474–88, 2012.
82. OUERGHI, O. et al. Investigating antibody-antigen binding with atomic force microscopy. **Sensors and Actuators B Chemical**, v. 84, n. 2-3, p. 167–175, 2002.
83. DONG, Y.; SHANNON, C. Heterogeneous Immunosensing Using Antigen and Antibody Monolayers on Gold Surfaces with Electrochemical and Scanning Probe Detection. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 11, p. 2371–2376, 2000.
84. BERGKVIST, M.; CARLSSON, J.; KARLSSON, T.; OSCARSSON, S. TM-AFM Threshold Analysis of Macromolecular Orientation: A Study of the Orientation of IgG and IgE on Mica Surfaces. **Journal of Colloid Interface Science**, v. 206, n. 2, p. 475–481, 1998.

85. ESTRELA, P. et al. Label-Free Detection of Protein interactions with peptide aptamers by open circuit potential measurement. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 22, p. 6489–6496, 2008.
86. ESTRELA, P.; LI, P.; KEIGHLEY, S. D.; MIGLIORATO, P. Label-Free Electrical Biosensor Arrays : A New Challenge for TFT Technology. **Journal of the Korean Physical Society**, v. 54, n. 1, p. 498–504, 2009.
87. BATISTA, P.; MULATO, M. SnO₂ extended gate field-effect transistor as pH sensor. **Brazilian Journal of Physics**, v. 36, n. 2, p. 478–481, 2006.
88. VIEIRA, N. C. S.; FERNANDES, E. G. R.; QUEIROZ, A. A. A. DE; GUIMARÃES, F. E. G.; ZUCOLOTTI, V. Indium Tin Oxide Synthesized by a Low Cost Route as SEG-FET pH Sensor. **Materials Research**, v. 16, n. 5, p. 1156–1160, 2013.
89. CARVALHAL, R. F. et al. Development of a disposable amperometric biosensor for salicylate based on a plastic electrochemical microcell. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 10, p. 2200–2204, 2010.
90. FERRARIO, A.; SCARAMUZZA, M.; PASQUALOTTO, E.; TONI, A. DE; PACCAGNELLA, A. Development of a disposable gold electrodes-based sensor for electrochemical measurements of cDNA hybridization. **Procedia Chemistry**, v. 6, p. 36–45, 2012.
91. DING, S. J.; CHANG, B. W.; WU, C. C.; LAI, M. F.; CHANG, H. C. Impedance spectral studies of self-assembly of alkanethiols with different chain lengths using different immobilization strategies on Au electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 554, n. 1-2, p. 43–51, 2005.
92. OLIVEIRA, M. D. L.; ABDALLA, D. S. P.; GUILHERME, D. F.; FAULIN, T. E. S.; ANDRADE, C. A. S. Impedimetric immunosensor for electronegative low density lipoprotein (LDL-) based on monoclonal antibody adsorbed on (polyvinyl formal)-gold nanoparticles matrix. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 155, n. 2, p. 775–781, 2011.
93. BADEA, M.; FLOROIAN, L.; RESTANI, P.; COBZAC, S. C. A.; MOGA, M. Ochratoxin A Detection on Antibody-Immobilized on BSA-Functionalized Gold Electrodes. **PLOS ONE**, v. 11, n. 7, p. 1–14, 2016.
94. ADVANCED-LINEAR-DEVICES-INC. **ALD212900A/ALD212900**. Disponível em: <<http://www.aldinc.com/pdf/ALD212900.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2016.

95. KIKHNEY, A. G.; SVERGUN, D. I. A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins. **FEBS Letters**, v. 589, n. 19, p. 2570–2577, 2015.
96. MERTINS, O. **Estudos físico-químicos e estruturais de lipossomas compósitos de fosfatidilcolina e quitosana**. 2008. 186 p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.
97. KILÁR, F. et al. Conformation of human IgG subclasses in solution: Small-angle X-ray scattering and hydrodynamic studies. **European Journal of Biochemistry**, v. 147, p. 17–25, 1985.
98. TIAN, X. et al. In-depth analysis of subclass-specific conformational preferences of IgG antibodies. **IUCrJ**, v. 2, p. 9–18, 2015.
99. KARLSSON, D.; ZACCHI, G.; AXELSSON, A. Electronic speckle pattern interferometry: A tool for determining diffusion and partition coefficients for proteins in gels. **Biotechnology Progress**, v. 18, n. 6, p. 1423–1430, 2002.
100. SARKAR, P. D.; G, R.; T.M., S. Cystatin C as a marker of glomerular filtration rate: a review. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 139–144, 2005.
101. MURAWSKA, M.; GRUBB, A.; KOZAK, M. **Small angle X-ray scattering (SAXS) studies of monomeric human cystatin C in solution**. Disponível em: <https://www.maxlab.lu.se/sites/default/files/I911-4_236_I911-4-AR2011-Lund-hcc_monomer.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2016.
102. THERMOFISHER. **Avidin, NeutrAvidin and Streptavidin Conjugates—Section 7.6**. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/antibodies-avidins-lectins-and-related-products/avidin-streptavidin-neutravidin-and-captavidin-biotin-binding-proteins-and-affinity-matrices.html>>. Acesso em: 14 jul. 2016.
103. PORTAL-ACTION. **Limite de detecção**. Disponível em: <<http://www.portalaction.com.br/aplicacoes-usando-o-action-stat/limite-de-deteccao>>. Acesso em: 9 jul. 2016.
104. PORTAL-ACTION. **Limite de quantificação**. Disponível em: <<http://www.portalaction.com.br/aplicacoes-usando-o-action-stat/limite-de-quantificacao>>. Acesso em: 9 jul. 2016.

105. ZHENG, G.; PATOLSKY, F.; CUI, Y.; WANG, W. U.; LIEBER, C. M. Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 10, p. 1294–1301, 2005.
106. ZHANG, A.; LIEBER, C. M. Nano-Bioelectronics. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 1, p. 215–257, 2016.
107. JIANG, R.; XU, C.; ZHOU, X.; WANG, T.; YAO, G. Detection of Cystatin C biomarker for clinical measurement of renal disease by developed ELISA diagnostic kits. **Journal of Translational Medicine**, v. 12, n. 1, p. 1–8, 2014.
108. GORODKIEWICZ, E.; LUSZCZYN, J. Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRI) Sensor for Cystatin Determination Based on Immobilized Papain. **Protein and Peptide Letters**, v. 18, n. 1, p. 23–29, 2011.
109. LIN, H. et al. Immune-independent and label-free fluorescent assay for Cystatin C detection based on protein-stabilized Au nanoclusters. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, n. 1, p. 256–261, 2013.