UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

LAÍS CANNIATTI BRAZACA

Desenvolvimento de biossensores para auxílio do diagnóstico do mal de Alzheimer,
para quantificação rápida de melatonina e para determinação simples do traço
genético de anemia falciforme,

São Carlos

2019

LAÍS CANNIATTI BRAZACA

Desenvolvimento de biossensores para auxílio do diagnóstico do mal de Alzheimer, para quantificação rápida de melatonina e para determinação simples do traço genético de anemia falciforme.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada

Opção: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Valtencir Zucolotto

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloca o Programa)

São Carlos

2019

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

Brazaca, Laís Canniatti

Desenvolvimento de biossensores para auxílio do diagnóstico do mal de Alzheimer, para quantificação rápida de melatonina e para determinação simples do traço genético de anemia falciforme / Laís Canniatti Brazaca; orientador Valtencir Zucolotto - versão corrigida -- São Carlos, 2019.

185 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2019.

1. Biossensor. 2. Eletroquímica. 3. Doença de Alzheimer. 4. Melatonina. 5. Anemia falciforme. I. Zucolotto, Valtencir, orient. II. Título.

Aos meus pais, Solange e Cezar,
a base de toda minha formação

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Solange e Cezar, por todo o apoio e por sempre acreditarem em mim. Obrigada por fornecerem toda a base da minha formação pessoal e acadêmica.

Ao Prof. Dr. Valtencir Zucolotto, pela orientação e por todo o auxílio na minha formação científica.

Ao Prof. Dr. Joseph Wang, pela orientação e pelas discussões produtivas durante o período de estágio na Universidade da Califórnia, San Diego (UCSD - EUA).

À Prof. Dr. Maria Jesus Lobo Castañón, pela orientação e pela ótima recepção durante o período de estágio na Universidade de Oviedo (UNIOVI – Espanha).

À FAPESP (Processo Nº 2015/02623-0 e 2017/03779-0) e ao CNPq (Processo Nº 140625/2015-1), pelo apoio financeiro.

À Comissão Europeia, pelo financiamento de estágio no exterior através do programa Marie Curie.

À todos os colegas e funcionários do GNano, pela ótima companhia, pelas discussões produtivas e também pelos momentos de descontração.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Nanobioeletrônica (UCSD – EUA) e do Grupo de Eletroanálises (UNIOVI – Espanha), frequentados durante os estágios no exterior.

Em especial, aos colegas Camila Barbosa Bramorski, Adriano Lopes Rodrigues, Juliana Cancino-Bernardi, Bruno Campos Janegitz, Juliane Sempionatto Moreto, Laura García Carmona, José Roberto Moreto, Farshad Tehrani e Aleksandar Karajic pelas ótimas discussões, conselhos e por serem ótimos companheiros de trabalho e amigos ainda melhores.

Aos funcionários do IFSC/USP, que forneceram ótimo auxílio e um ambiente de trabalho adequado para a realização das pesquisas.

Aos meus avós, Theresa, Hélio, Amélia e Antônio, que acreditam completamente em meu potencial, torcem muito por mim e ajudaram a tornar minha formação possível.

À toda a minha família, por estarem sempre ao meu lado.

À todos os meus amigos, que fizeram essa trajetória ser muito especial. Em especial à Carolina, Clara, Paula, Giulia, Ilaiáli, Ana Laura, Thomas e Bruna.

RESUMO

BRAZACA, L. C. **Desenvolvimento de biossensores para auxílio do diagnóstico do mal de Alzheimer, para quantificação rápida de melatonina e para determinação simples do traço genético de anemia falciforme.** 2019. 185 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Nos últimos anos, o desenvolvimento de novas plataformas biossensoras trouxe importantes avanços à área médica, incluindo maior rapidez na detecção de biomarcadores, menor custo de análise e portabilidade. Essa tese traz a descrição do desenvolvimento de três tipos de biossensores que visam à auxiliar o diagnóstico de diferentes doenças. No primeiro capítulo, detalha-se a construção de um dispositivo microfluídico baseado em papel para a quantificação simultânea de dois biomarcadores da doença de Alzheimer: Fetuína B e Clusterina. O dispositivo foi capaz de quantificar as proteínas estudadas de maneira precisa e de baixo custo através do uso de técnicas eletroquímicas e colorimétricas, apresentando limites de detecção na ordem de p-nmol/L. O segundo capítulo trata do desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico para a quantificação de melatonina. O dispositivo foi capaz de detectar a biomolécula em amostras biológicas rapidamente e com boa especificidade, diferenciando a melatonina de componentes com alta semelhança estrutural. Por fim, o terceiro capítulo descreve um genossensor eletroquímico para diagnóstico e determinação do traço da doença genética mais comum no Brasil, a anemia falciforme. O sensor foi capaz de diferenciar sequências normais de mutadas de maneira simples e rápida, sendo adequado para o diagnóstico e a determinação de seu traço. Esperamos que os dispositivos aqui apresentados levem à diagnósticos mais acessíveis fornecendo assim melhores condições de saúde à população.

Palavras-chave: Biossensor. Eletroquímica. Doença de Alzheimer. Melatonina. Anemia falciforme.

ABSTRACT

BRAZACA, L. C. **Development of biosensors for assisting in the diagnosis of Alzheimer's disease, for the rapid quantification of melatonin and for the simple determination of the genetic trait of sickle cell anemia.** 2019. 185 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

The development of new biosensor platforms has brought important advances to the medical field, including faster detection of biomarkers, lower cost of analysis and portability. This thesis provides a description of the development of three biosensors that aim to assist the diagnosis of three different diseases. The first chapter describes the construction of a paper-based microfluidic device for the simultaneous quantification of two Alzheimer's disease biomarkers: Fetuin B and Clusterin. The device was able to quantify the studied proteins in a precise and low cost manner through the use of electrochemical and colorimetric techniques, presenting limits of detection in the order of p-nmol/L. The second chapter details the development of an electrochemical immunosensor for the quantification of melatonin. The device was able to detect the biomolecule in biological samples quickly and with good specificity, differentiating melatonin from components with high structural similarity. Finally, the third chapter describes an electrochemical genosensor for diagnosis and determination of the trait of the most common genetic disease in Brazil, sickle cell anemia. The sensor was able to differentiate normal and mutated sequences in a simple and fast manner, being suitable for the diseases diagnosis and the determination of its trait. Therefore, we expect the devices presented here to lead to more accessible diagnoses, providing better health conditions for the population.

Keywords: Biosensor. Electrochemistry. Alzheimer's disease. Melatonin. Sickle Cell Anemia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1-	Comparação entre o ambiente macrocelular de pacientes saudáveis e com a doença de Alzheimer. À esquerda podemos observar também o mecanismo de formação de emaranhados Tau e placas β -amilóide.	34
Figura 1.2-	Esquema do funcionamento de um biossensor.	39
Figura 1.3-	Esquema de um biossensor <i>lateral flow</i> do tipo sanduíche.	41
Figura 1.4-	Esquema de um biossensor <i>lateral flow</i> do tipo competitivo.	42
Figura 1.5-	Potencial aplicado na DPV e SWV.	45
Figura 1.6-	Esquema exemplificando o método de detecção colorimétrico A) visual, com o uso de legendas e B) realizada por software.	47
Figura 1.7-	Peças cortadas para a montagem do dispositivo microfluídico e sua estrutura final. i) Peça principal, composta pela membrana de liberação. Engloba as zonas de amostra (S) e de conjugado (C). ii) zona de teste (T), composta por NC; iii) Zona absorvente (A), composta por membrana de celulose. iv) Dispositivo montado.	50
Figura 1.8-	Procedimento de montagem do dispositivo. A) membranas NC não modificadas são posicionadas no PET usando fita dupla face; B) as membranas NC são modificadas com Ab específico; C) a peça principal, já carregada com o AuNP-Ab, é colocada em posição; D) a zona absorvente é adicionada para formar o dispositivo final.	51
Figura 1.9-	Parte superior do case impresso em 3D projetado para encaixar no dispositivo desenvolvido. A) vista superior. Os 3 orifícios externos mantêm as zonas de teste visíveis e acessíveis, enquanto o orifício central corresponde à zona de amostra; B) Vista interna do case, mostrando as ranhuras para encaixe do dispositivo; C) Parte principal do dispositivo encaixada na parte interna do case.	52
Figura 1.10-	A) Esquema mostrando as diferentes etapas envolvidas no processo de produção de HSPEs. Primeiramente, um estêncil metálico é posicionado sobre um pedaço de PET. Em	55

seguida, a tinta desejada é despejada sobre uma das extremidades do estêncil e uma espátula de borracha é utilizada para espalhá-la sobre o estêncil. Por fim, obtém-se o substrato com o desenho desejado, o qual é curado por 15 min à 85°C. O mesmo processo é repetido sobre as trilhas de prata para a obtenção dos eletrodos de trabalho e contra-eletrodo, compostos de tinta de carbono. B) Estrutura final dos HSPEs. O isolante é indicado em azul.

- Figura 1.11- Testes lateral flow do tipo sanduíche produzidos no formato de bastão. O destaque em laranja mostra a zona de testes dos dispositivos, que apresentam formatos extremamente variados. Testes realizados com 10, 100 e 1000 nmol/L de Fetuína B. 58
- Figura 1.12- A) Esquema mostrando o novo design do dispositivo microfluídico em papel e suas respectivas zonas. S - zona de amostra, C - zona de conjugados, T - zona de testes e A - zona absorvente. B) Foto do dispositivo microfluídico real. 59
- Figura 1.13- Verificação da conjugação de AuNP-Ab utilizando resina de proteína A. A) AuNP-Ab e B) AuNP controle, sem Ab. 60
- Figura 1.14- Verificação da eficiência da imobilização de proteínas na NC. Da esquerda para a direita: Ab (1mg/mL), teste positivo e negativo; e BSA (10 mg/mL), teste positivo e negativo. 61
- Figura 1.15- Verificação do fluxo nos testes lateral flow. A) Dispositivo antes da aplicação de amostra; B) controle negativo, amostra em branco (Tris-HCl). C) controle positivo, amostra 1000 nM de Fetuína B. As áreas marcadas com T e C correspondem à zona de teste e à zona de conjugados dos dispositivos, respectivamente. Os cortes circulares abaixo das imagens destacam as zonas de teste de cada uma das figuras. As zonas absorventes dos dispositivos foram retiradas para melhor visualização dos resultados. 62
- Figura 1.16- Mecanismo de quantificação de AuNPs pelo método de HCl. 68

Figura 1.17-	Voltamogramas obtidos para diferentes concentrações de AuNP utilizando o método HCl. Concentrações variam de 17,43 a 0,29 µg/mL.	68
Figura 1.18-	Curva de calibração das AuNPs pelo método de HCl utilizando A) a corrente e B) a área dos picos de redução do ouro. Concentrações de AuNP variam de 17,43 a 0,29 µg/mL.	69
Figura 1.19-	Mecanismo da detecção de AuNPs utilizando HBr/Br ₂ e voltametria de redissolução.	70
Figura 1.20-	Voltamogramas obtidos para diferentes concentrações de AuNP utilizando o método HBr/Br ₂ .Concentrações variam de 17,43 a 0,35 µg/mL.	70
Figura 1.21-	Curva analítica linear das AuNPs construída na faixa de concentrações de 3,49 a 0,35 µg/mL.	71
Figura 1.22-	(A) Testes de voltametria de SWV de reprodutibilidade utilizando 3 eletrodos em paralelo, (B) Testes de estabilidade utilizando VC. 50 ciclos, 100 mV/s. (C) Eletrodos utilizados nos testes. (D) Testes de repetibilidade utilizando SWV. Oito medidas consecutivas foram realizadas em um único eletrodo. (E) Variação de corrente e potencial obtida nos testes de repetibilidade.	74
Figura 1.23-	A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos com diferentes concentrações relativas de AuNP, variando de 1 a 0,1. B) Curva de calibração utilizando 3 eletrodos independentes por diluição de AuNP.	75
Figura 1.24-	Voltamogramas de onda quadrada relacionados ao estudo de repetibilidade. Três medidas consecutivas foram realizadas, apresentando uma variação de 15,99% na corrente de oxidação do ouro.	76
Figura 1.25-	Fluxograma indicando cada uma das etapas da análise colorimétrica dos testes.	78
Figura 1.26-	A) Segmentação das zonas de teste em diferentes grupos de cor. B) Distribuição dos grupos de cor no espaço RGB e no C)espaço L*a*b*. Uma solução de 500 nmol/L de Fetuína B	79

foi usada para realizar os testes lateral flow utilizados na análise colorimétrica.

- Figura 1.27- Principais parâmetros otimizados para tirar as fotos utilizadas na detecção colorimétrica. Fundo A) Claro e B) Escuro; Iluminação: ISO A) mais alto e B) mais baixo; Sombras A) Iluminação lateral e B) Iluminação com *flash ring*. 80
- Figura 1.28- A) curva de calibração para cada um dos componentes L^* , a^* e b^* no espaço $L^*a^*b^*$. Para sua construção, foram utilizadas concentrações de AuNPs de até 10,47 $\mu\text{g/mL}$ (diluição de 10x) B) curva de calibração relacionando a distância da coloração do cluster à uma cor padrão e a concentração de AuNPs na amostra. 82
- Figura 1.29- A) Curva de calibração da proteína Fetuína B construída através da técnica eletroquímica. B) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações da proteína. C-F) Calibração colorimétrica do sistema utilizando os componentes L^* (C), a^* (D), b^* (E) e a distância da amostra à cores padrão D (F). G) Fotos da zona de detecção obtidos em diferentes concentrações de Fetuína B. 85
- Figura 1.30- A) Curva de calibração da proteína Clusterina construída através da técnica eletroquímica. B) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações da proteína. C-F) Calibração colorimétrica do sistema utilizando os componentes L^* (C), a^* (D), b^* (E) e a distância da amostra à cores padrão D (F). G) Fotos da zona de detecção obtidos em diferentes concentrações de Clusterina. 87
- Figura 2.1- Mecanismo de biossíntese da melatonina. As áreas modificadas em cada processo enzimático estão destacadas em amarelo. 94
- Figura 2.2- Esquema ilustrando cada uma das etapas para a quantificação de analitos utilizando a técnica ELISA. 101
- Figura 2.3- Esquema ilustrando as diferentes etapas envolvidas na técnica de radioimunoensaio. 102

Figura 2.4-	A) Diagrama de Nyquist tipicamente obtido no monitoramento de interações biomoleculares utilizando EIS. B) Circuito equivalente de Randles, relacionado à curva em questão.	104
Figura 2.5-	Voltamogramas cíclicos típicos obtidos no monitoramento de interações biológicas utilizando o mediador redox ferrocianeto de potássio.	105
Figura 2.6-	Esquema da configuração do biossensor Au-APTES-EDC/NHS-Ab. A) método de crescimento do filme fino. B) Ligações químicas estabelecidas no filme.	108
Figura 2.7-	Esquema mostrando as ligações químicas envolvidas na construção do biossensor proposto.	112
Figura 2.8-	Diagramas de Nyquist mostrando cada etapa da funcionalização dos eletrodos. A) Resposta dos eletrodos de ITO (preto), APTES/ITO (vermelho), Ab/EDC-NHS/APTES/ITO (azul), BSA/Ab/EDC-NHS/APTES/ITO (rosa) e B) do sensor completo após a interação com 1 $\mu\text{mol/L}$ de melatonina (roxo). Medidas realizadas em PB na presença de 4 mmol/L $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.	113
Figura 2.9-	Voltamogramas cíclicos obtidos em cada uma das etapas de montagem do eletrodo. As respostas dos eletrodos de ITO (preto), APTES-ITO (vermelho), Ab/EDC-NHS/APTES/ITO (azul), BSA/ab/EDC-NHS/ITO (rosa) e do sensor completo após a interação com 1 $\mu\text{mol/L}$ de melatonina (roxo) são mostradas. Medidas realizadas em PB na presença de 4 mmol/L $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.	114
Figura 2.10-	Relação da R_{tc} e da i_{ox} com cada uma das etapas de montagem do biossensor estudado. Concentração de melatonina: 1 $\mu\text{mol/L}$.	114
Figura 2.11-	Otimização do processo de montagem do biossensor. A) Estudo do tempo de imersão dos eletrodos de ITO em uma solução de APTES (2% v/v). B) Estudo da concentração ideal de Ab, mantendo a quantidade de EDC-NHS constante (8 mmol/L, 5 mmol/L respectivamente) e o tempo de interação	116

de 2h; C) Avaliação do tempo de interação da plataforma de ITO com a solução de Ab/EDC-NHS (4 ng/ μ L, 8 mmol/L e 5 mmol/L, respectivamente); D) Tempo de interação do sensor e de melatonina. Todas as medidas foram realizadas em PB na presença de 4 mmol/L $K_4[Fe(CN)_6]$.

Figura 2.12- Curva analítica para concentrações de melatonina entre 0,75 e 7,50 μ mol/L utilizando a técnica de EIS. A) Diagramas de Nyquist; B) Regressão linear mostrando o aumento na R_{tc} em maiores concentrações do hormônio. Medidas realizadas em PB na presença de 4mM $K_4[Fe(CN)_6]$. 117

Figura 2.13- Curva analítica para concentrações de melatonina entre 0,75 e 7,50 μ mol/L utilizando a técnica de VC. A) Voltamogramas cíclicos. B) Regressão linear. Neste caso, i_{ox} diminui com o aumento na concentração do hormônio. Medidas realizadas em PB na presença de 4 mmol/L $K_4[Fe(CN)_6]$. 118

Figura 2.14- A) A estabilidade do biossensor foi avaliada através da realização de 100 ciclos de VC; B) Estabilidade no tempo para os sensores desenvolvidos. Os dispositivos contendo Ab/EDC-NHS/APTES/ITO foram congelados em $-10^{\circ}C$ por 15, 30 e 60 dias. O biossensor apresentou respostas adequadas à 2,5 μ mol/L de melatonina até 30 dias após o congelamento; C) Diversas medidas foram realizadas de maneira subsequente para avaliar a repetibilidade dos dispositivos. Bons valores foram obtidos para os dispositivos baseados em EIS (23,6% em 12 medidas) D) e em VC (1,81% em 18 medidas). Todas as medidas foram realizadas em PB na presença de 4 mmol/L $K_4[Fe(CN)_6]$. 119

Figura 2.15- Estrutura das moléculas estudadas no teste de reatividade cruzada. A) Melatonina; B) NAS; C) Complexo C5-HT. 120

Figura 2.16- Estudos de interferentes foram realizados utilizando NAS e C5-HT (2,5 μ mol/L). NAS, C5-HT e PBS apresentaram R_{tc} mais baixa quando comparados à melatonina na mesma 121

concentração. Medidas realizadas em PB na presença de 4 mmol/L $K_4[Fe(CN)_6]$.

- Figura 2.17- Curva analítica da melatonina em extrato de fígado de rato construídas utilizando EIS e concentrações do hormônio entre 0,0 e 7,0 $\mu\text{mol/L}$. A) Diagramas de Nyquist; B) Regressão linear mostrando o aumento na R_{tc} com o aumento na concentração de melatonina. Experimentos realizados em PB contendo 4 mmol/L $K_4[Fe(CN)_6]$. 122
- Figura 3.1- Esquema mostrando o processo de vaso-oclusão ocorrido na anemia falciforme. 133
- Figura 3.2- Esquema da montagem do biossensor para detecção do traço de anemia falciforme. 142
- Figura 3.3- Ilustração da imobilização das sequências de captura do eletrodo A) sem a presença de 2-mercaptoetanol e B) na presença do composto. Observa-se que no segundo caso as sequências de captura estão organizadas de maneira adequada para a interação com a amostra. 144
- Figura 3.4- Estudo da eficiência da modificação dos eletrodos por A) EIS e B) VC. 145
- Figura 3.5- Otimização do A) Tempo de imersão do eletrodo na solução contendo sequência de captura/2-mercaptoetanol e B) Tempo de hibridização. 146
- Figura 3.6- Curva de calibração para concentrações de 0,01 a 7,50 $\mu\text{mol/L}$ da sequência alvo. A) Diagramas de Nyquist e B) Regressão linear. 147
- Figura 3.7- Diagrama de Nyquist relacionado ao estudo da especificidade do sensor. Observa-se que a sequência normal (preto) fornece um sinal muito semelhante à sequência de captura (azul), enquanto a sequência alvo (vermelho) apresenta uma R_{ct} significativamente maior. 148
- Figura 3.8- Caracterização eletroquímica do sensor desenvolvido. A) Diagrama de Nyquist mostrando estudos de reprodutibilidade utilizando 1 $\mu\text{mol/L}$ da sequência alvo. B) Repetibilidade das 149

medidas de EIS. Um único eletrodo foi medido diversas vezes, sequencialmente. C) Voltamograma cíclico relacionado ao estudo de estabilidade do sensor. 30 ciclos são mostrados na figura.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1-	Resumo dos resultados obtidos na otimização do protocolo lateral flow para a quantificação do biomarcador da doença de Alzheimer Fetuína B.	64
Tabela 1.2-	Curva de calibração utilizando concentrações de 5 a 500 nmol/L de Fetuína B. Teste realizado no formato sanduíche.	65
Tabela 1.3-	Reprodutibilidade (3 eletrodos em paralelo), estabilidade (50 ciclos) e repetibilidade (8 medidas) obtidas para os 3 diferentes designs de SPEs caseiros testados. Medidas realizadas em solução de hexacianoferrato de potássio (II) e hexacianoferrato de potássio (III) (4 mmol/L, PBS).	74
Tabela 1.4-	Valores de R^2 obtidos na otimização dos parâmetros cutoff radius e N para cada um dos componentes do espaço $L^*a^*b^*$ e para D. A soma de todos os valores de R^2 para cada condição testada é também apresentada.	81
Tabela 1.5-	Soma dos R^2 obtidos para as curvas de calibração em relação à variação do cutoff radius.	81
Tabela 1.6-	Soma dos R^2 obtidos para as curvas de calibração em relação à variação do N.	81
Tabela 1.7-	Parâmetros relacionados a cada uma das curvas de calibração colorimétricas padrão	82
Tabela 1.8-	Sensibilidade, reprodutibilidade e LD calculados para cada um dos parâmetros colorimétricos estudados.	83
Tabela 1.9-	Parâmetros relacionados às curvas de calibração eletroquímica e colorimétrica da proteína Fetuína B.	84
Tabela 1.10-	Valores de sensibilidade, LD e reprodutibilidade para a detecção de Fetuína B a partir das técnicas eletroquímica e colorimétrica.	84
Tabela 1.11-	Parâmetros relacionados às curvas de calibração eletroquímica e colorimétrica da proteína Clusterina.	88

Tabela 1.12-	Valores de sensibilidade, LD e reprodutibilidade para a detecção de Clusterina a partir das técnicas eletroquímica e colorimétrica.	89
Tabela 1.13-	Composição das misturas de biomarcadores utilizadas nos testes e concentrações obtidas pelos sensores para cada um dos biomarcadores.	90
Tabela 2.1-	Sumário do resultado da quantificação de melatonina utilizando o sensor Ab/EDC-NHS/APTES/ITO em extrato de fígado.	123
Tabela 2.2-	Resumo dos resultados da quantificação dos extratos de fígado usando a técnica ELISA. Erros foram calculados usando os máximos desvios nas porcentagens de recuperação apresentadas no manual do kit pelo fabricante (25%). ²¹³	124
Tabela 2.3-	Estimativa de preços para a construção dos sensores.	126
Tabela 2.4-	Revisão da literatura de sensores de melatonina e comparação com o sensor Ab/EDC-NHS/APTES/ITO desenvolvido neste trabalho.	127
Tabela 3.1-	Sequências de DNA de captura, alvo e saudável utilizadas no desenvolvimento do sensor.	141

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AADC – L-aminoácido aromático carboxilase

AANAT – N-acetiltransferase

Ab – Anticorpo

Ap - Aptâmero

APTES – (3-Aminopropil)triethoxisilano

ASMT – hidroxindol-O-metiltransferase

AS – Indivíduo heterozigoto para anemia falciforme

AuNP – Nanopartículas de ouro

BCA – Ensaio do ácido bicinconínico

BSA – Albumina de soro bovino

C5-HT – Complexo 5-Hidroxitriptamina creatinina sulfato

C_{wt} – Concentração em massa

D – Distância da cor do grupo à coloração padrão

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPV – Voltametria de pulso diferencial

EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

EIS – Espectroscopia de impedância eletroquímica

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)

HbA – Hemoglobina A

HbF – Hemoglobina fetal

HbS – Hemoglobina S

HPLC – Cromatografia líquida de alta pressão

HRP – Peroxidase de rábano (*Horseradish peroxidase*)

HSPE – Eletrodos *screen-printed* de carbono caseiros (*Homemade screen-printed carbon electrodes*)

HU – Hidroxiureia

Δi – Variação na magnitude da corrente

IgG – Imunoglobulina G

IL-1 β – Interleucina 1 β

i_{ox} - magnitude da corrente do pico de oxidação

ITO – Óxido de índio dopado com estanho

LCR - Líquido cefalorraquidiano

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

LSPR - Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada

MT – Receptor transmembrana de melatonina

N – Número de AuNPs por mL

n – Número de amostras utilizadas para análise

NAS – N-acetilserotonina

NC - Nitrocelulose

NHS – N-hidroxisuccinimida

PAH - Poli (alilamina hidrociorada)

PB – Tampão fosfato

PBS – Tampão fosfato salino

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PET – Polietileno tereftalato

PPY – Precursor do hormônio pancreático

R² – Coeficiente de linearidade

RIA – Radioimunoensaio

R_{tc} – Resistência de transferência de carga

SAM – Monocamadas auto-organizadas

SD – Desvio padrão

SPE – Eletrodos *screen-printed* (*Screen-printed electrodes*)

SS – Indivíduo homozigoto para anemia falciforme

ssDNA – DNA fita simples

SWV – Voltametria de onda quadrada

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

TPOH – Triptofano hidroxilase

VC – Voltametria cíclica

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	
1	CAPÍTULO I: DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO BASEADO EM PAPEL PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	29
1.1	INTRODUÇÃO.....	33
1.1.1	Doença de Alzheimer.....	33
1.1.2	Diagnóstico da doença de Alzheimer.....	36
1.1.3	Relação de biomarcadores sanguíneos com a doença de Alzheimer.....	37
1.1.4	Biossensores.....	39
1.1.5	Biossensores baseados em papel.....	40
1.1.6	Dispositivos microfluídicos baseados em papel.....	42
1.1.7	Detecção eletroquímica.....	43
1.1.8	Voltametria de redissolução.....	44
1.1.9	Eletrodos impressos.....	45
1.1.10	Detecção colorimétrica.....	46
1.2	OBJETIVO.....	47
1.2.1	Objetivos específicos.....	47
1.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
1.3.1	Construção de dispositivos microfluídicos em papel.....	48
1.3.2	Validação das etapas envolvidas no teste <i>lateral flow</i>	52
1.3.3	Síntese de nanopartículas de ouro.....	53
1.3.4	Medidas eletroquímicas – otimização da quantificação de AuNPs...	54
1.3.5	Fabricação de HSPEs.....	55
1.3.6	Medidas eletroquímicas utilizando HSPEs.....	56
1.3.7	Quantificação colorimétrica.....	57
1.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
1.4.1	Desenvolvimento da plataforma microfluídica em papel.....	57
1.4.2	Verificação da conjugação AuNP-Ab.....	60
1.4.3	Verificação da imobilização de proteínas em NC.....	60
1.1.4	Verificação do fluxo no dispositivo em papel.....	61
1.4.5	Otimização do protocolo de montagem do sensor <i>lateral flow</i>	62

1.4.6	Calibração visual do sistema <i>lateral flow</i>	62
1.4.7	Quantificação de AuNPs utilizando amostras padrão.....	66
1.4.8	Quantificação dos biomarcadores utilizando plataformas <i>lateral flow</i>	83
1.5	CONCLUSÕES.....	90
2	CAPÍTULO II: IMUNOSENSOR ELETROQUÍMICO <i>LABEL-FREE</i> PARA A QUANTIFICAÇÃO DO HORMÔNIO MELATONINA.....	93
2.1.1	Melatonina.....	93
2.1.2	A pluralidade de funções da melatonina.....	95
2.1.3	Doenças relacionadas à concentrações alteradas de melatonina....	97
2.1.4	A administração de melatonina.....	98
2.1.5	Métodos atualmente utilizados para detecção de melatonina.....	100
2.1.6	Imunossensores eletroquímicos.....	102
2.1.7	Sensores para melatonina descritos na literatura.....	105
2.2	OBJETIVOS.....	106
2.2.1	Objetivos específicos.....	106
2.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	107
2.3.1	Materiais.....	107
2.3.2	Montagem dos biossensores.....	107
2.3.3	Medidas eletroquímicas.....	109
2.3.4	Amostras biológicas.....	110
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	111
2.4.1	Estratégia de modificação dos eletrodos.....	111
2.4.2	Avaliação eletroquímica da montagem do biossensor.....	112
2.4.3	Otimização da montagem do biossensor.....	115
2.4.4	Detecção de melatonina em amostras padrão.....	117
2.4.5	Caracterização eletroquímica do sensor.....	118
2.4.6	Reatividade cruzada.....	120
2.4.7	Curva de calibração em amostras biológicas.....	121
2.4.8	Comparação da performance do sensor para quantificação de melatonina em amostras biológicas utilizando a técnica ELISA.....	122
2.4.9	Comparação entre o sensor desenvolvido e plataformas da literatura.....	126

2.5	CONCLUSÕES.....	129
2.6	PUBLICAÇÕES RELACIONADAS.....	129
3	CAPÍTULO III: GENOSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA O DIAGNÓSTICO E A DETERMINAÇÃO DO TRAÇO DE ANEMIA FALCIFORME.....	131
3.1	INTRODUÇÃO.....	131
3.1.1	A anemia falciforme.....	131
3.1.2	O traço genético da anemia falciforme.....	135
3.1.3	Diagnóstico e determinação do traço.....	136
3.1.4	Genossensores.....	138
3.1.5	Biossensores para anemia falciforme descritos na literatura.....	139
3.2	OBJETIVOS.....	140
3.2.1	Objetivos específicos.....	140
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	141
3.3.1	Materiais.....	141
3.3.2	Sequências de DNA.....	141
3.3.3	Modificação dos eletrodos.....	141
3.3.4	Medidas eletroquímicas.....	142
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	143
3.4.1	Montagem do biossensor.....	143
3.4.2	Avaliação eletroquímica da modificação dos eletrodos.....	144
3.4.3	Otimização do processo de montagem do biossensor.....	145
3.4.4	Curva de calibração.....	147
3.4.5	Determinação do traço de anemia falciforme.....	148
3.4.6	Caracterização eletroquímica.....	148
3.5	CONCLUSÕES.....	149
3.6	PUBLICAÇÕES RELACIONADAS.....	150
4	CONCLUSÕES GERAIS.....	151
5	INFORMAÇÕES ADICIONAIS.....	153
5.1	Projetos realizados em paralelo.....	153
5.1.1	SABio – um sensor baseado em aptâmeros para a detecção de bactérias.....	153

5.1.2	Sensor baseado em nanoflores de ouro para a detecção sensível de dopamina.....	154
5.1.3	Plataformas sem fio integradas aos óculos para determinação de analitos em lágrimas.....	155
5.1.4	Desenvolvimento de biossensores baseados em nanopartículas magnéticas para a identificação de OGMs.....	156
5.1.5	Rubberbye: Degradação de borracha natural.....	157
5.2	Prêmios recebidos.....	158
5.3	Experiências no exterior.....	158
5.3.1	Oviedo – Espanha.....	158
5.3.2	San Diego – Estados Unidos.....	159
5.4	Participação em eventos.....	159
5.5	Participação em minicursos.....	162
5.6	Matérias encaminhadas para publicação.....	163
5.7	Atuação como revisora de periódicos.....	164
5.8	Projetos de extensão.....	165
5.8.1	Fastibular: plataforma voltada à melhorar a administração de tempo de prova.....	165
	REFERÊNCIAS.....	167
	ANEXOS.....	185
	Anexo I – Aprovação do Comitê de Ética para a realização dos experimentos com animais.....	185

INTRODUÇÃO

O diagnóstico e o monitoramento de diversas doenças vem sendo auxiliado, há décadas, pelo uso de biomarcadores. Estes consistem em moléculas capazes de indicar processos fisiologicamente normais ou patológicos, incluindo também indicadores de intervenções terapêuticas.¹ Um dos primeiros biomarcadores complexos a ser identificado na literatura foi a glicose, sendo que seus altos níveis foram relacionados à diabetes ainda no século XVIII.² Atualmente, centenas de milhares de biomarcadores já se encontram documentados, apresentando o potencial de facilitar o diagnóstico e acompanhamento de uma grande diversidade de males. Importantes exemplos incluem doenças cardiovasculares,³ neurodegenerativas⁴ e câncer.⁵

Atualmente, estas moléculas são comumente detectadas através de imunoenaios, como o ELISA (do inglês *Enzyme-linked immunosorbent assay*). Porém, apesar de estes testes serem sensíveis e apresentarem baixos limites de detecção, são de alto custo e requerem equipamentos e pessoal especializado. Sendo assim, o desenvolvimento de técnicas que sejam capazes de realizar a quantificação de biomarcadores de maneira simples e de baixo custo é de grande interesse aos sistemas de saúde e à população. Neste contexto, biossensores se apresentam como uma ótima ferramenta, sendo capazes de detectar analitos *in situ* rapidamente, auxiliando nas ações médicas necessárias ao tratamento adequado do paciente.

Esta tese traz o desenvolvimento de três biossensores inéditos para a detecção de biomarcadores relacionados à diferentes doenças. Para a quantificação simples e precisa de cada uma das moléculas estudadas foram utilizadas técnicas eletroquímicas e/ou colorimétricas. O principal objetivo no desenvolvimento destes é a quantificação dos biomarcadores de maneira simples e de baixo custo, auxiliando o diagnóstico médico.

O primeiro capítulo trata do desenvolvimento de biossensores microfluídicos em papel para o auxílio no diagnóstico do mal de Alzheimer, a doença neurodegenerativa mais comum do mundo. Atualmente, o diagnóstico preciso ainda é uma tarefa complexa, sendo de difícil acesso à grande parte da população devido ao seu alto custo e à necessidade de equipamentos e pessoal especializados.

Propomos o desenvolvimento de um biossensor baseado em papel para quantificação simultânea de 2 biomarcadores sanguíneos da doença de Alzheimer - Fetuína B e Clusterina. Para isso, foram utilizados anticorpos específicos para cada uma das proteínas marcados com nanopartículas de ouro (AuNPs). As AuNPs são posteriormente quantificadas através de técnicas eletroquímicas e colorimétricas. Os dispositivos se mostraram capazes de quantificar as proteínas simultaneamente com boa precisão e reprodutibilidade. Espera-se que o desenvolvimento destes biossensores auxilie no aumento da precisão e do número de diagnósticos da doença de Alzheimer, especialmente em casos precoces.

O segundo capítulo trata do desenvolvimento de imunossensores *label-free* para a quantificação de melatonina, indolamina que é responsável pela regulação de ritmos biológicos e possui papel vital em diferentes processos fisiológicos, incluindo a resposta imune. A indolamina apresenta concentrações alteradas em uma série de doenças, incluindo diabetes tipo 2, doença de Alzheimer e diversos tipos de câncer. Atualmente a molécula é quantificada por ELISA ou radioimunoensaios – os quais, apesar de apresentarem alta sensibilidade e baixos limites de detecção, são de alto custo e requerem pessoal e equipamento especializado. Propomos um biossensor eletroquímico baseado na imobilização de anticorpos anti-melatonina em eletrodos de ITO (óxido de índio dopado com estanho). A interação da plataforma com o hormônio foi então avaliada através das técnicas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS – *Electrochemical Impedance Spectroscopy*) e voltametria cíclica (VC). O biossensor foi testado com amostras biológicas, apresentando resultados semelhantes à técnica ELISA - com a vantagem de ser mais rápido, barato e simples.

O terceiro e último capítulo trata do desenvolvimento de um dispositivo que auxilia o diagnóstico e a determinação do traço de anemia falciforme. Esta é uma doença genética, de caráter recessivo, e mais de 7,2 milhões de brasileiros apresentam seu traço. Atualmente, o diagnóstico da doença e a determinação de seu traço são realizados por técnicas como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a eletroforese. Apesar de serem sensíveis e bem estabelecidos, estes métodos são de alto custo e requerem equipamento especializado. Sendo assim, desenvolvemos um biossensor baseado na imobilização de uma sequência de ssDNA fita simples contendo a mutação relacionada à anemia falciforme em eletrodos de ouro. A determinação da taxa de hibridização destas com a amostra foi, em seguida, avaliada

por EIS e VC. O genossensor foi capaz de diferenciar entre sequências que apresentavam ou não a mutação, apresentando-se como uma ferramenta simples e de baixo custo para a determinação do traço falciforme e para a realização de seu diagnóstico.

É importante mencionar que os sensores desenvolvidos possuem caráter inovador, sendo que não há descritos na literatura dispositivos para a detecção das biomoléculas estudadas na mesma configuração proposta por nós.

1 CAPÍTULO I: DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO BASEADO EM PAPEL PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA DOENÇA DE ALZHEIMER

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer é uma forma de demência devastadora que ocorre principalmente entre idosos – sendo, atualmente, a doença neurodegenerativa mais comum no mundo.⁶ Estima-se que esta doença afete 36 milhões de pessoas⁷ e que gastos relacionados ao Alzheimer alcançaram 604 bilhões de dólares somente no ano de 2010.⁸ Devido ao envelhecimento da população, previsões indicam que o número de casos irá triplicar até 2050,⁸ correspondendo a um sério problema para os sistemas de saúde do mundo todo. No Brasil mais de 1,2 milhões de pessoas têm a doença de Alzheimer⁷ e esta se encontra entre as 20 principais causas de morte no país.⁹

Primeiramente descrito pelo neurologista alemão Alois Alzheimer, a doença de Alzheimer é caracterizada por um progressivo e irreversível declínio em certas funções intelectuais. Estas incluem: memória, orientação no tempo e no espaço, pensamento abstrato, aprendizado, incapacidade de realizar cálculos simples, distúrbios da linguagem, da comunicação e na capacidade de realizar as tarefas cotidianas. Outros sintomas incluem mudança da personalidade e na capacidade de julgamento.⁷

Em escala molecular, durante o desenvolvimento da doença, duas estruturas anormais podem ser claramente observadas no cérebro do paciente: 1) placas protéicas compostas de fragmentos de β -amilóide e 2) emaranhados de proteína Tau.¹⁰ (Figura 1.1) A β -amilóide compõe parte da proteína precursora de amiloide, ancorada na membrana celular das células nervosas. Em indivíduos saudáveis, esta proteína é liberada da membrana através da atuação de duas enzimas distintas: α e γ secretases. Dessa maneira, são criados dois fragmentos protéicos que são saudáveis para os neurônios. Já em indivíduos doentes, ocorre uma clivagem pela enzima β -secretase seguido da γ -secretase, liberando diferentes fragmentos da proteína β -amilóide no meio extracelular.¹¹ Estes fragmentos se juntam formando

placas que podem interromper a sinalização dos neurônios nas sinapses ou se ligarem a eles ativando uma resposta imune que acaba destruindo as células nervosas.¹² A proteína Tau, por sua vez, está envolvida na estabilização dos microtúbulos. Em indivíduos doentes, essa proteína forma aglomerados, desestruturando os filamentos. Consequentemente, nutrientes e outros suprimentos essenciais não são transportados eficientemente pelas células, causando sua morte.¹² Devido à morte das células nervosas, pacientes com Alzheimer sofrem uma grande perda de peso e volume no cérebro.¹³ Pacientes que sofrem da doença também apresentam baixos níveis do neurotransmissor acetilcolina e da enzima colina acetiltransferase, envolvida em sua síntese - dificultando a transmissão de sinais entre os neurônios.

Figura 1.1 - Comparação entre o ambiente macrocelular de pacientes saudáveis e com a doença de Alzheimer. À esquerda podemos observar também o mecanismo de formação de emaranhados Tau e placas β -amilóide.

Fonte: NATIONAL INSTITUTE OF AGING.¹¹

As placas β -amilóide e os emaranhados Tau se espalham lentamente e progressivamente pelo cérebro, levando usualmente de 3 a 4 anos entre o tempo de diagnóstico e a morte do paciente.¹⁰ Seu avanço caracteriza a doença em três principais fases:

- 1) Fase pré-clínica: Pacientes não apresentam sintomas, porém a formação de placas e emaranhados protéicos já está ocorrendo; neurônios saudáveis começam a atuar de forma menos eficiente. Embora o mecanismo de início da doença ainda não seja bem elucidado, é provável que os danos ao cérebro comecem cerca de uma década ou mais antes que se tornem evidentes.
- 2) Fase Intermediária: É caracterizada por um comprometimento cognitivo leve. Nesse estágio, o dano já atingiu o hipocampo, essencial na formação de memórias; ocorre a diminuição da massa cerebral.
- 3) Fase final de demência: Danos generalizados, tecido cerebral diminuído significativamente. Paciente apresenta dificuldades para realizar atividades diárias, alterações repentinas no humor e irritação, por exemplo. Tipicamente, intervalos de uma década ou mais se passam antes da doença ter se desenvolvido completamente, levando à morte do paciente.¹⁰

Apesar do fator mais relevante no desenvolvimento da doença de Alzheimer ser a idade, afetando aproximadamente 1 em cada 14 indivíduos com mais de 65 anos e 1 em cada 4 com mais de 85 anos,¹⁴ este não é exclusivo. Também influenciam no aparecimento da doença a herança genética, fatores ambientais, estilo de vida e outros, como o hábito de fumar, pressão alta, diabetes e colesterol alto.¹⁵ Segundo um estudo publicado pela Universidade de Cambridge, um em cada três casos de Alzheimer poderia ser evitado através de mudanças comportamentais, sendo o sedentarismo o fator mais relevante.¹⁶ Assim, o diagnóstico de pacientes propensos a desenvolver Alzheimer pode ser uma importante ferramenta na diminuição do número de casos da doença: o pré-diagnóstico ou o diagnóstico precoce combinado com aconselhamento dos pacientes pode retardar ou evitar o seu aparecimento.

É importante ressaltar que, atualmente, não há cura para a doença de Alzheimer. No entanto, alguns medicamentos são capazes de controlar alguns dos sintomas por um período limitado – tipicamente de 6 a 12 meses. Estes medicamentos comumente agem através da manutenção de fontes existentes do neurotransmissor acetilcolina, que, como já citado anteriormente, apresenta baixos níveis em indivíduos com Alzheimer.¹⁵

1.1.2 Diagnóstico da doença de Alzheimer

Atualmente não existe um exame simples para o diagnóstico da doença de Alzheimer ou de qualquer outra causa de demência. Inicialmente é realizada uma exclusão de outros males que apresentam sintomas semelhantes, como infecções ou depressão. Em seguida, a memória e o raciocínio lógico do paciente são avaliados em detalhe por um psicólogo. Estes resultados podem ser complementados com o uso de técnicas de neuroimagens ou a avaliação de biomarcadores presentes no líquido cefalorraquidiano (LCR), que possuem alta acurácia.¹⁵

Técnicas de neuroimagens, como ressonância magnética e a tomografia de emissão de pósitrons, são muito úteis para o diagnóstico pela observação da estrutura cerebral do paciente. Estes métodos, porém, não são acessíveis para grande parcela da população. Sua execução é complexa e exige equipamentos e profissionais especializados, apresentando assim dificuldades para serem aplicados em uma grande quantidade de pacientes para a realização de ensaios clínicos, por exemplo.¹⁷ Além disso, a execução dos exames de neuroimagens pode trazer incômodos devido à utilização de contrastes e à demora na realização.

Diversos biomarcadores bem estabelecidos e caracterizados de Alzheimer podem ser encontrados no LCR, como o Peptídeo β -amilóide 42, a proteína Tau e a Tau hiperfosforilada.^{18,19} Estas moléculas podem servir como marcadores de diagnóstico com sensibilidade e especificidade.^{19,20} Além disso, estes biomarcadores mostraram potencial para separar indivíduos com leve comprometimentos cognitivos que progrediram para Alzheimer daqueles que não.^{20,21} Porém, a punção lombar requerida para coletar amostras de LCR é considerada uma prática invasiva e apresenta uma percepção negativa do público,^{22,23} limitando assim sua utilização. Além disso, a amostragem sucessiva, utilizada para monitorar a eficácia de tratamento, o início da doença ou seu risco é limitada e pode impactar nos níveis dos marcadores.²⁴

Consequentemente, o esforço em encontrar biomarcadores sanguíneos para a doença de Alzheimer tem crescido muito durante a década passada. Seus principais atrativos são baseados principalmente em 4 pontos: Primeiro – a doença de Alzheimer atinge um número significativo de indivíduos, que continua crescendo ano a ano, gerando altíssimos gastos relacionados à recursos laboratoriais. A coleta de sangue

é um método simples e de baixo custo, se comparado com técnicas de neuroimagem ou à amostragem de LCR.²⁵ Além disso, a identificação de biomarcadores sanguíneos auxiliaria na redução de custos em seleções iniciais para testes clínicos relacionados à doença. Uma grande vantagem disso é que um número maior de pacientes seria selecionado, diagnosticado e tratado – beneficiando tanto os pacientes quanto os pesquisadores. Segundo: a maior parte dos métodos aplicados no diagnóstico de Alzheimer são adequados em situações controladas, porém não é determinado se estes possuem o mesmo desempenho quando aplicados em comunidades. A aplicação de testes sanguíneos padronizados poderia ajudar na resolução deste problema. Terceiro: ferramentas de diagnóstico de baixo custo podem ser usadas para monitorar a eficácia do tratamento com uma frequência mais alta. Quarto: A identificação de biomarcadores sanguíneos combinada com outras técnicas já estabelecidas pode tornar o diagnóstico mais preciso.

Existe, porém, grande dificuldade na determinação destes marcadores, principalmente devido à presença da barreira hematoencefálica. Esta tem a função de proteger o cérebro da entrada de substâncias tóxicas, restringindo o trânsito de proteínas grandes. Isso faz com que seja dificultada também a saída de componentes do cérebro. Somente moléculas muito pequenas são capazes de atravessar a barreira, algumas vezes sofrendo perda estrutural. Os componentes que atingem a corrente sanguínea frequentemente são encontrados em concentrações baixas, dificultando sua quantificação e estudo. Além disso, a doença de Alzheimer é frequentemente acompanhada de outras doenças, dificultando assim a identificação dos biomarcadores em pequenos grupos amostrais.¹⁷

1.1.3 Relação de biomarcadores sanguíneos com a doença de Alzheimer

Recentemente um potencial conjunto de biomarcadores sanguíneos para o diagnóstico precoce da doença de Alzheimer foi identificado e divulgado.²⁶ Apesar de não existir somente uma molécula que consiga realizar o diagnóstico com fidelidade, o conjunto de algumas destas se mostra mais eficiente. Dois biomarcadores sanguíneos de alta relevância são utilizados em conjunto no projeto desenvolvido. São os seguintes:

1) Fetuína B: Fetuínas são proteínas plasmáticas com diversas funções – incluindo a regulação da osteogênese e inibição de mineralizações indevidas.²⁷ O estudo demonstra que existe alta correlação de sua concentração com os volumes direito e esquerdo do córtex entorrinal. Todos os pacientes com atrofia cerebral envolvidos no estudo possuíam níveis reduzidos de Fetuína B. Um segundo grupo de pesquisadores indentificou também baixas taxas de Fetuína A,²⁸ indicando possivelmente que ambas as proteínas atuam por mecanismos semelhantes. Concentrações típicas em plasma de Fetuína B são da ordem de 10^{-2} g/L ou 0,2 $\mu\text{mol/L}$.^{29,30}

2) Clusterina (Alipoproteína J): Chaperona molecular do complexo de Golgi que auxilia o dobramento de proteínas secretadas, sendo abundante em lipoproteínas de densidade muito baixa.³¹ Foi a proteína avaliada mais correlacionada com a taxa de declínio cognitivo. Pacientes com decaimento mais acentuado apresentaram níveis mais altos de Clusterina do que os pacientes com decaimento lento. Esta correlação foi confirmada por diversos outros estudos.^{32–34} Concentrações típicas em plasma de Clusterina são da ordem de 10^{-3} g/L ou 10 nmol/L.³⁵

Atualmente, a detecção da maior parte dos marcadores é realizada pelo método ELISA. Este é um teste imunoenzimático que permite a detecção e quantificação de proteínas, peptídeos, anticorpos e hormônios. Os testes são realizados em placas de plástico com 96 poços, e são baseados na interação altamente específica entre antígenos e anticorpos. Em um ensaio do tipo sanduíche, utilizado devido a sua alta sensibilidade, o anticorpo específico para o antígeno de interesse é imobilizado nas placas. O antígeno, ao entrar em contato com o anticorpo imobilizado, se liga. A detecção desta interação é, então, feita através de anticorpos complexados com enzimas – as quais reagem com seus substratos, gerando um sinal que pode ser quantificado, tal como o valor de absorbância da amostra em um comprimento de onda determinado.³⁶ Devido ao alto custo dos kits disponíveis comercialmente (cerca de R\$ 2.000)³⁷ e a demanda de tempo e de material para a realização dos testes, é de grande interesse o desenvolvimento de uma nova técnica para detecção dos biomarcadores.

A combinação de biomarcadores sanguíneos e biossensores possui grande potencial para desenvolvimento de dispositivos simples, portáteis e de baixo custo que facilitem o diagnóstico da doença de Alzheimer principalmente em fases pré-clínicas.

Dessa maneira, os pacientes identificados podem ser tratados e aconselhados com antecedência, retardando o desenvolvimento da doença. Além disso, a identificação de um maior número de portadores em estágios pré-clínicos pode auxiliar no estudo do mecanismo de desenvolvimento da doença de Alzheimer, ajudando na busca por novos tratamentos e pela cura.

1.1.4 Biossensores

Chamamos de biossensor um dispositivo analítico capaz de transduzir interações biomoleculares à sinais mensuráveis. Estes são capazes de quantificar de maneira simples, rápida e integrada uma grande diversidade de analitos, incluindo proteínas, sequências de DNA ou RNA, células inteiras ou pequenas moléculas.

Seu princípio de funcionamento é baseado em 2 partes fundamentais: a camada de biorreconhecimento e o processo de transdução (Figura 1.2). A camada de biorreconhecimento corresponde à um filme biológico composto por um elemento que interage de maneira específica com o analito desejado, sendo que exemplos típicos incluem anticorpos, enzimas ou sequências de DNA. O processo de transdução, por sua vez, possui o papel de converter a interação biológica em um sinal mensurável, segundo certo princípio físico-químico.^{38,39} Neste caso podemos citar como exemplo as técnicas eletroquímicas, colorimétricas ou piezoelétricas.

Figura 1.2 – Esquema do funcionamento de um biossensor.

Fonte: Elaborada pela autora. A estrutura do aptâmero: SUN et al.⁴⁰; A estrutura da célula: SCITABLE⁴¹; a estrutura do DNA: TODA MATÉRIA⁴²; a estrutura do anticorpo; ESCOLA KIDS⁴³; a estrutura da enzima: PHYS.ORG.⁴⁴

Cada biossensor pode ser classificado em duas categorias fundamentais, sendo que a primeira se refere à composição de sua camada de biorreconhecimento. Estes podem ser, por exemplo: imunossensores (baseados em anticorpos), genossensores (baseados em material genético), sensores enzimáticos (baseados em enzimas) ou imunoenzimáticos (baseados em anticorpos marcados com enzimas). A segunda categoria em que um biossensor se enquadra diz respeito ao processo de transdução utilizado em sua construção. Este pode ser colorimétrico (baseado em alterações de cor), eletroquímico (baseado em alterações de corrente ou impedância, por exemplo), ou piezoelétrico (baseado em alterações de massa).

A utilização de nanoestruturas na fabricação de biossensores abre um vasto campo de pesquisas em nanotecnologia e biotecnologia. Devido à suas propriedades únicas, como alta área superficial específica, ótima condutividade elétrica, boa estabilidade e tamanho reduzido – adequado para interação com biomoléculas – estes materiais vêm sendo amplamente utilizados no desenvolvimento de biossensores. Dentre as nanoestruturas de interesse, podemos citar a utilização de nanopartículas metálicas,^{45,46} nanotubos de carbono,^{47,48} grafeno,^{49,50} e nanofibras poliméricas.⁵¹

Em especial, AuNPs têm chamado a atenção devido à sua excelente condutividade, boa atividade catalítica e facilidade de síntese.⁵² Diversos trabalhos utilizando AuNPs no desenvolvimento de sensores podem ser encontrados na literatura, sendo estes materiais utilizados principalmente para revestir superfícies de eletrodo, ou complexados à agentes biológicos. As aplicações de AuNPs em sensores visam o aumento da atividade catalítica,⁵³ amplificação do sinal,⁵⁴ aumento de área para imobilização de biomateriais⁵⁵ ou mesmo como marcadores.^{56,57}

1.1.5 Biossensores baseados em papel

Uma vertente atual, simples e de baixo custo em biossensores consiste em dispositivos construídos em papel, que se baseiam em plataformas contendo diversas zonas delimitadas com funções específicas. Para aumentar a sensibilidade destes dispositivos, biorreceptores podem ser marcados com nanomateriais, que por sua vez, podem ser quantificados através de técnicas eletroquímicas ou colorimétricas. Um

ensaio comum é o do tipo sanduíche, exemplificado na Figura 1.3. Neste caso, temos as seguintes regiões:

- 1) Zona de Aplicação da Amostra: Geralmente composta de fibra de celulose,⁵⁸ é onde a amostra líquida contendo o analito é gotejada. Se localiza em um dos extremos do sensor. A amostra migra, por efeitos de capilaridade, em direção ao outro extremo do dispositivo.
- 2) Zona de Conjugados: Usualmente composta de fibra de vidro.⁵⁸ Contém biorreceptores específicos para o analito de interesse (como anticorpos, enzimas ou receptores) marcados com elementos como nanopartículas ou *quantum dots*. Os biorreceptores são ligados fracamente ao suporte e, sendo assim, interagem com o analito presente na amostra e migram junto à esta em direção à zona de teste.
- 3) Zona de Teste: Usualmente composta de membrana de nitrocelulose (NC).⁵⁸ Nesta área, biorreceptores específicos para o analito se encontram fortemente imobilizados no substrato. Com a passagem da amostra, o conjunto analito-biorreceptor interage com o biorreceptor imobilizado e fica retido na zona de teste. Os marcadores presos aos biorreceptores podem ser, desta maneira, quantificados através do uso de técnicas eletroquímicas tais como a voltametria de redissolução em conjunto com SPEs (*Screen-Printed Electrodes*) ou através do uso de técnicas colorimétricas.
- 4) Zona Absorvente: Retém o excesso de amostra. Geralmente é composta de fibra de celulose.⁵⁸

Figura 1.3 - Esquema de um biossensor *lateral flow* do tipo sanduíche.
Fonte: Adaptada de LIU et al.⁵⁹

Além do ensaio do tipo sanduíche pode-se aplicar outros formatos que funcionam de maneira análoga, como o competitivo (Figura 1.4). Neste caso, a biomolécula imobilizada na zona de testes é a própria proteína de interesse. Quando a amostra é aplicada, o analito interage primeiramente com as AuNP-Ab. Conjugados que não interagiram com as proteínas presentes na amostra, então, se ligam à zona de teste. Sendo assim, neste formato, quanto menor a concentração do analito na amostra, maior o sinal obtido pelo sensor.

Independente do formato utilizado, dispositivos do tipo *lateral flow* têm mostrado grande potencial para detecção e quantificação de uma série de compostos biológicos de maneira simples e de baixo custo.^{60–64} A combinação de técnicas para construção de dispositivos microfluídicos com substratos de papel tem aprimorado ainda mais os sensores, levando à estruturas que realizam análises com volumes extremamente baixos de amostra e que apresentam altíssima portabilidade.

Figura 1.4 : Esquema de um biossensor *lateral flow* do tipo competitivo.
Fonte: Adaptada de Liu et. al.⁵⁹

1.1.6 Dispositivos microfluídicos baseados em papel

Embora os dispositivos microfluídicos estejam presentes em laboratórios de pesquisa há mais de 20 anos, apenas recentemente, com a integração destes sistemas à larga escala, seu uso aumentou drasticamente.⁶⁵ Circuitos microfluídicos são compostos por canais e câmaras que têm dimensões da ordem de dezenas a centenas de micrômetros. O uso de tais medidas tem o potencial de produzir dispositivos muito pequenos, com alta portabilidade e que requerem quantidades extremamente baixas de amostra (que variam da ordem de pL a μ L). Além disso, a

utilização dos dispositivos é extremamente simples e seu custo de produção é baixo, sendo ideais para aplicações de saúde em países de baixa renda.⁶⁵ Por fim, os métodos utilizados em sua construção e a possibilidade de automatização permitem alta eficiência na manipulação de fluidos e boa reprodutibilidade dos resultados.⁶⁵

Dispositivos microfluídicos podem ser contruídos utilizando diversos substratos, incluindo vidro, polímeros e papel. O uso de papel, em especial, apresenta diversas vantagens. Primeiramente, suas fibras tem a capacidade de armazenar reagentes em sua forma ativa, o que é essencial para aplicações biológicas.⁶⁶ Além disso, a amostra é transportada sem a necessidade da existência de fontes externas de energia devido à capilaridade.⁶⁶ O material também apresenta uma alta relação superfície/volume, permitindo um aumento de sensibilidade especialmente para dispositivos colorimétricos.⁶⁶

Várias técnicas podem ser utilizadas para a construção de dispositivos microfluídicos baseados em papel. A abordagem mais comum consiste na construção de canais hidrofílicos pela padronização de reagentes hidrofóbicos, como fotoresiste e cera. Diversas técnicas podem ser usadas para padronizar esses agentes, sendo que as principais são a impressão *ink jet*, a impressão flexográfica e a fotolitografia.⁶⁶ Outras técnicas também podem ser aplicadas para a construção de dispositivos microfluídicos em papel, como o corte a laser, que aplica luz focada para desenhar um padrão. Neste caso, o dispositivo é composto apenas pelo caminho que deve ser seguido pelo líquido, com o excesso de substrato sendo eliminado. As principais vantagens desta técnica incluem a produção rápida de dispositivos de baixo custo em grandes lotes.

1.1.7 Detecção eletroquímica

Dentre as diversas técnicas de transdução atuais, a eletroquímica é a mais comum,⁶⁷ se destacando devido ao seu baixo custo, alta precisão, potencial de portabilidade e baixa necessidade de pré-tratamento de amostra. Neste caso, a alteração de diversas propriedades – como condutividade, corrente e impedância, por exemplo – podem ser utilizadas para o monitoramento preciso das interações entre biomoléculas de interesse.⁶⁸

Seu uso em conjunto com dispositivos *lateral flow* tem se tornado cada vez mais comum devido à usualmente apresentar maior sensibilidade, faixa de trabalho mais ampla e limites de detecção mais baixos do que a técnica colorimétrica.⁶⁹ Além disso, o aperfeiçoamento recente de diversas técnicas de produção de eletrodos tem permitido com que estes sejam customizados e incorporados aos dispositivos *lateral flow*, tornando-os ainda mais versáteis.⁶⁹

Exemplos da aplicação de técnicas eletroquímicas em dispositivos *lateral flow* podem ser encontrados na literatura em diversas abordagens. Por exemplo, Sinawang e colaboradores desenvolveram um imunossensor eletroquímico *lateral flow* para a detecção e quantificação da proteína NS1 da Dengue.⁷⁰ Para isso, SPEs comerciais foram biofuncionalizadas e integradas às plataformas de papel, atuando como zona de testes. Outro exemplo é o estudo publicado por Du e colaboradores.⁷¹ Neste caso, o teste *lateral flow* foi realizado da maneira convencional, em papel. Em seguida, a zona de testes foi cortada e adicionada à célula eletroquímica para a quantificação do analito – colinesterase fosforilada.

1.1.8 Voltametria de redissolução

Entre a grande diversidade de métodos de quantificação eletroquímicos, a voltametria de redissolução tem se destacado por apresentar altíssima sensibilidade, sendo capaz de detectar espécies eletroativas em concentrações de ppm com preparações de amostra mínimas.⁷² A técnica se divide em duas etapas principais: 1) Pré-concentração – consiste na deposição de espécies eletroativas na superfície do eletrodo através da aplicação de um potencial constante por poucos minutos. Nesta etapa, comumente é formado um filme insolúvel sobre o eletrodo; 2) Medida – consiste na aplicação de uma janela de potenciais que leva à reações redox e consequente redissolução das espécies do filme em potenciais específicos. A quantificação dos compostos é então realizada através da análise da altura ou da área dos picos gerados no voltamograma. A altíssima sensibilidade da técnica se deve principalmente ao passo de pré-concentração da amostra.⁷²

Duas das técnicas de pulso mais utilizadas para a quantificação das amostras – que podem ser utilizadas em conjunto com a voltametria de redissolução - são a

voltametria de onda quadrada (*Square wave voltammetry* - SWV) e a voltametria de pulso diferencial (*Differential pulse voltammetry* - DPV). Estas técnicas possuem altíssima sensibilidade principalmente devido ao fato de que as correntes-respostas obtidas possuem baixa contribuição capacitiva. Isso ocorre porque, após a aplicação de pulsos de potencial, a corrente capacitiva se extingue mais rapidamente do que a corrente faradaica. Além disso, neste caso, o sinal analítico medido é comumente uma diferença de duas correntes: uma obtida antes da aplicação do pulso e outra obtida em seu final – o que também auxilia na minimização da contribuição da corrente capacitiva no valor medido. Na DPV, pulsos de amplitudes fixas são sobrepostos a uma rampa de potencial crescente. Já na SWV são sobrepostos à rampa de potencial pulsos simétricos: o pulso direto tem a mesma duração do pulso reverso (Figura 1.5).^{73,74}

Figura 1.5 - Potencial aplicado na DPV e SWV.
Fonte: Elaborada pela autora.

1.1.9 Eletrodos impressos

Outra tendência recente no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos consiste na utilização de eletrodos impressos. O interesse por este tipo de sistema vêm ocorrendo principalmente devido ao seu baixo custo e facilidade de fabricação, além de apresentarem boa estabilidade e reprodutibilidade.^{75–77} Esta abordagem nos fornece a oportunidade de criar biossensores nos quais as medidas eletroquímicas

não são dependentes de eletrodos comerciais – os quais são usualmente de alto custo – aumentando a aplicabilidade dos sistemas desenvolvidos em locais de baixa renda.

Atualmente, a técnica mais utilizada para a produção de eletrodos impressos é o *screen-printing*, que usa um molde vazado para padronizar os eletrodos no substrato desejado. Além de ser de fácil execução, essa técnica exige poucos recursos, sendo capaz de criar eletrodos de bom desempenho a baixo custo. Neste caso, uma desvantagem inclui a necessidade de produzir um molde diferente para cada um dos padrões desejados. Outra técnica promissora usada para esse fim é a impressão *ink jet*. Nesse caso, os eletrodos são impressos diretamente no substrato, seguindo um comando de *software*. Portanto, o *design* dos eletrodos pode ser alterado facilmente, e estes são produzidos com boa reprodutibilidade. Uma desvantagem desta técnica é o número limitado de produção de eletrodos, quando comparada com a técnica de *screen-printing*, por exemplo. Ambos os métodos permitem que os eletrodos sejam impressos em uma diversidade de substratos, como polímeros, vidros e papel.⁷⁸

1.1.10 Detecção colorimétrica

Apesar da técnica eletroquímica ser a mais utilizada em biossensores, o método colorimétrico apresenta grande destaque como técnica de transdução em dispositivos *lateral flow*.^{64,69,79–81} Este consiste na análise da mudança de coloração para determinação da presença ou para a quantificação de um analito. A técnica é comumente utilizada em conjunto com dispositivos *lateral flow* devido à facilidade de utilização de marcadores coloridos. Entre estes, AuNPs são os mais utilizados devido à sua estabilidade, facilidade de síntese e manipulação e coloração intensa.⁶⁹ Porém, recentemente, outros marcadores vêm sendo estudados visando principalmente a melhora na sensibilidade e no limite de detecção (LD). Estes incluem nanopartículas⁸² e nanotubos de carbono,⁸³ selênio coloidal⁸⁴ e nanopartículas de platina,⁸⁵ entre outros.

Além disso, a técnica colorimétrica apresenta diversas outras vantagens, incluindo simplicidade, boa sensibilidade e baixo custo - sendo que as mudanças de coloração podem, muitas vezes, serem avaliadas à olho nu ou com o auxílio de uma legenda (Figura 1.6A).^{69,81} Em casos de mudanças de cores mais sutis, a análise de fotos dos testes por *softwares* podem ser utilizados (Figura 1.6B).^{64,69,79,80} Sendo assim, a

abordagem colorimétrica é ideal para o desenvolvimento de dispositivos que atendam regiões com poucos recursos, não necessitando de equipamentos especializados para geração de resultados.

Figura 1.6 - Esquema exemplificando o método de detecção colorimétrico A) visual, com o uso de legendas e B) realizada por software.

Fonte: Elaborada pela autora.

1.2 OBJETIVO

Desenvolvimento de um dispositivo microfluídico baseado em papel para a detecção e quantificação simultânea dos marcadores sanguíneos da doença de Alzheimer Fetuína B e Clusterina. Para isso, são utilizados eletrodos *screen-printed* de carbono caseiros (HSPEs) e Ab específicos para cada uma das proteínas marcados com AuNPs, as quais posteriormente são quantificadas através do uso de técnicas de voltametria de redissolução e colorimetria.

1.2.1 Objetivos específicos

- Construir uma plataforma microfluídica em papel que permita a quantificação reprodutível e simples dos analitos;

- Construir HSPEs através da técnica de *screen-printing* para a quantificação precisa dos analitos;
- Desenvolver um software próprio para a realização da quantificação colorimétrica dos analitos de maneira automatizada;
- Realizar medidas colorimétricas e eletroquímicas em amostras padrão para a quantificação de cada um dos biomarcadores estudados utilizando as plataformas desenvolvidas;
- Otimizar a performance do dispositivo através do estudo dos parâmetros utilizados para a construção e modificação das membranas, *design* da construção dos eletrodos e condições eletroquímicas e colorimétricas utilizadas nas análises;
- Construir curvas de calibração para cada um dos biomarcadores em amostra padrão utilizando técnicas colorimétricas e eletroquímicas;
- Caracterizar os sensores em relação sua à estabilidade, reprodutibilidade, repetibilidade e LD.
- Estudar a especificidade do dispositivo com o uso de amostras mistas;

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 Construção de dispositivos microfluídicos em papel

Os métodos utilizados para a construção dos dispositivos microfluídicos baseados em papel e para sua modificação foram desenvolvidos durante estágio na Universidade da Califórnia San Diego (UCSD - USA), sob supervisão do Prof. Dr. Joseph Wang.

Corte das membranas

Cada dispositivo microfluídico é composto por três partes, cortadas separadamente (Figura 1.7). A primeira e a principal parte (i), composta pela membrana de liberação (*Standard 14 Conjugate release pad*, GE Healthcare - EUA),

compreende as áreas de amostra (S) e de conjugado (C) do sensor. Esta parte tem cerca de 2 cm de largura e foi cortada por um laser CO₂ da marca Orion Motor com um tubo de 40 W e velocidade de digitalização de 0-400 mm/s. A segunda parte (ii), que corresponde à zona de teste, é composta por NC (FF120HP PLUS, GE Healthcare, EUA) e tem um formato circular, com 3 mm de diâmetro. Um cortador de pressão manual foi usado para fabricá-la com precisão (3EG, EDA - Brasil), garantindo reprodutibilidade entre as peças. A terceira e última parte (iii) corresponde à zona absorvente, composta por uma membrana de celulose espessa (CFSP173000, Merck Millipore - EUA). A reprodutibilidade no corte dessas estruturas não é tão importante quanto para as outras peças, pois sua função - que é absorver todo o excesso de amostra e reagentes - é minimamente afetado por sua forma. A principal característica a ser mantida é a largura na parte superior da peça, que determinará a velocidade de fluxo da amostra para a zona absorvente. Como essa distância pode ser facilmente controlada sem o uso de técnicas específicas, essas estruturas foram cortadas com o uso de uma tesoura.

Modificação das plataformas de papel

Três áreas diferentes do dispositivo devem ser modificadas para assegurar seu funcionamento adequado: 1) A área de teste, que deve possuir Ab ou proteínas específicos imobilizados à sua superfície, dependendo do formato do teste a ser utilizado; 2) a área de conjugados, que deve conter complexos AuNP-Ab que sejam capazes de se mover com o fluxo de amostra e 3) a zona da amostra, que deve ser modificada com Tween-20 para assegurar um fluxo de líquido uniforme. Além disso, os braços do dispositivo tem função específica sendo, um deles, para detecção de Clusterina, o segundo para detecção de Fetuína B e o terceiro um controle de fluxo de amostra.

A área de teste, composta por membranas de NC, foi modificada pela adição de 1 µL de solução de Ab específico (1 mg/mL, PBS 1x) por 15 min, no caso do ensaio sanduíche aplicado para a Fetuína B, ou pela modificação com 3 µL de proteína (0,25 mg/mL, PBS 1x) por 45 min, no caso do ensaio competitivo utilizado para Clusterina. Em seguida, a membrana foi lavada 3x usando PBS, para remover qualquer excesso

da biomolécula, e seca usando ar comprimido. Após, 10 μ L de uma solução de BSA 1% (Albumina de soro bovino) (PBS 1x, Sigma Aldrich - EUA) foram incubados por 5 min a fim de bloquear quaisquer sítios de interação disponíveis na membrana. A NC foi então lavada com PBS 3x para remover o excesso de reagente. Por fim, a membrana foi seca com ar comprimido e armazenada na geladeira para uso posterior. Anticorpos policlonais anti-Fetúina B (11834-RP01) e anti-Clusterina (11297-RP01) foram adquiridos da empresa Sino Biological (China), assim como seus respectivos antígenos - Fetúina B (11834-H08H) e Clusterina (11297-H08H). Soluções estoque de proteína foram quantificadas utilizando o equipamento Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Brasil).

Figura 1.7 - Peças cortadas para a montagem do dispositivo microfluídico e sua estrutura final. i) Peça principal, composta pela membrana de liberação. Engloba as zonas de amostra (S) e de conjugado (C). ii) zona de teste (T), composta por NC; iii) Zona absorvente (A), composta por membrana de celulose. iv) Dispositivo montado.

Fonte: Elaborada pela autora.

A zona de conjugados, por sua vez, deve ser carregada com AuNP-Ab específicos para os analitos. Os conjugados foram fabricados utilizando o kit InnovaCoat® Gold 20 nm, seguindo precisamente as instruções do fabricante (Expedeon – Inglaterra). Para o carregamento da zona conjugada, foram adicionados 2,5 μ L de AuNP-Ab e aguardou-se 30 min para secagem, em temperatura ambiente (24 °C). O processo foi repetido 3 vezes, totalizando a adição de 10 μ L de conjugado em cada zona. Depois que o dispositivo estava completamente seco, foi armazenado em geladeira (4 °C) para uso posterior.

A terceira e última modificação foi realizada na zona de amostra. Para assegurar um fluxo de líquido uniforme através do dispositivo, uma gota de 10 μ L de

uma solução 0,1% de Tween-20 (água ultrapura, Sigma Aldrich - EUA) foi adicionada à área que receberá a amostra e seca ao ar, em temperatura ambiente (24 °C).

Montagem e uso do dispositivo

Uma plataforma de PET (Polietileno tereftalato) foi utilizada como suporte para montagem do dispositivo (Figura 1.8). Inicialmente, uma área de PET de 3,0 x 3,0 cm foi coberta com fita dupla face. Em seguida, três membranas de NC não modificadas foram coladas, utilizando um molde (A). As membranas de NC foram modificadas na plataforma PET (B) e, em seguida, a parte principal (com as zonas conjugadas já carregadas com AuNP-Ab e a zona de amostra modificada com Tween-20) (C) e a zona absorvente (D) foram adicionadas para formar o dispositivo final. As estruturas foram coladas com uma pequena sobreposição (~ 0,5 mm), garantindo um fluxo uniforme de amostra entre cada peça. Finalmente, o excesso de PET é cortado. Para a realização da análise, 50 µL de amostra foram adicionados ao centro do dispositivo. Para os testes padrão, as proteínas foram preparadas em Tris-HCl (50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM).

Figura 1.8 - Procedimento de montagem do dispositivo. A) membranas NC não modificadas são posicionadas no PET usando fita dupla face; B) as membranas NC são modificadas com Ab específico; C) a peça principal, já carregada com o AuNP-Ab, é colocada em posição; D) a zona absorvente é adicionada para formar o dispositivo final.

Fonte: Elaborada pela autora.

Um estojo 3D portátil foi projetado para encaixar nas plataformas de papel, mantendo apenas as zonas de amostra e de teste visíveis. Este foi construído utilizando a impressora 3D Prusa i3 MK2. O estojo é composto por 2 partes: uma superior, que possui aberturas para as zonas de teste e amostra e ranhuras para

encaixar a peça principal do sensor; e uma inferior, que corresponde à uma tampa para fechar o dispositivo. A peça superior pode ser vista em detalhes na Figura 1.9. O estojo deve facilitar o uso dos dispositivos para pessoal não especializado, que só será capaz de visualizar as áreas necessárias.

Figura 1.9 - Parte superior do case impresso em 3D projetado para encaixar no dispositivo desenvolvido. A) vista superior. Os 3 orifícios externos mantêm as zonas de teste visíveis e acessíveis, enquanto o orifício central corresponde à zona de amostra; B) Vista interna do case, mostrando as ranhuras para encaixe do dispositivo; C) Parte principal do dispositivo encaixada na parte interna do case.

Fonte: Elaborada pela autora.

1.3.2 Validação das etapas envolvidas no teste *lateral flow*

Teste de conjugação AuNP-Ab

Para verificar se as AuNPs estavam de fato sendo conjugadas aos Ab, utilizou-se uma resina de proteína A, que possui grande afinidade por imunoglobulinas. Primeiramente, 500 μ L da resina (em tampão de ligação – Tris HCl 50 mM, pH 7,0) foram adicionados à um microtubo. Em seguida, adicionou-se 30 μ L de AuNP-Ab, misturou-se bem e aguardou-se cerca de 5 min para que o sistema decantasse. Por fim, observou-se a coloração do sistema. Caso haja a conjugação AuNP-Ab, a porção decantada deve apresentar coloração rosa, devido à presença de AuNPs na resina. Caso contrário, a coloração deverá ser branca, que corresponde à cor original. O teste foi também realizado com AuNPs não conjugadas, para atuar como controle negativo.

Teste de ligação entre proteínas e NC

Para gerar as zonas de teste do dispositivo, biomoléculas receptoras e BSA devem ser imobilizados na membrana de NC. A fim de verificar se este processo ocorria de forma adequada, realizamos o seguinte procedimento: primeiramente, adicionou-se 1 μL de Ab (1 mg/mL, PBS) ou 10 μL de BSA (1% ou 10 mg/mL, PBS) ao centro de uma membrana de NC e aguardou-se 15 min. No caso dos controles negativos, aplicou-se tampão PBS puro (1x, pH 7,4). Após este período, a membrana foi lavada 3x com PBS e seca com jato de N_2 .

Em seguida, foi realizado o teste BCA (Ensaio do ácido bicinconínico, *Bicinchoninic acid assay*) sobre as membranas, que tem a função de detectar proteínas, alterando a cor da solução para tons de roxo na presença destas. Para isso, utilizou-se o kit BCA (1001508550) produzido pela Sigma Aldrich (Brasil). Aproximadamente 10 μL da solução de trabalho foram adicionados à membrana contendo Ab e 50 μL foram adicionados à NC que havia sido tratada com BSA. Após alguns minutos, a coloração presente nas membranas foi analisada.

1.3.3 Síntese de nanopartículas de ouro

Nanopartículas de ouro esféricas monodispersas (de aproximadamente 15 nm) foram sintetizadas através do método de Turkevich⁸⁶. Para isso, uma solução de ácido cloroáurico ($4,4 \times 10^{-4}$ mol/L, 13 mL, água ultrapura) (Sigma Aldrich – Brasil) foi aquecida até aproximadamente 80 °C, sob agitação vigorosa. Em seguida, 1 mL de uma solução de 1 m/v% de citrato de sódio dihidratado (água ultrapura) (Sigma Aldrich – Brasil) foi adicionada. O aquecimento e a agitação foram mantidos até que a solução completasse sua mudança de coloração, de amarelo claro para vermelho intenso, o que leva cerca de 10 min. Em seguida, o aquecimento é desligado e a solução continua sob agitação vigorosa por mais 15 min. A suspensão de AuNPs é então mantida sob temperatura ambiente por, pelo menos, 4h, e após este período é armazenada em geladeira (4 °C), sendo estável por até 60 dias.

A partir da banda LSPR (ressonância de plasmon de superfície localizada) relacionada às AuNPs e de equações desenvolvidas por Haiss e colaboradores⁸⁷ estimou-se o número de partículas e a massa média da suspensão. Estima-se que a solução sintetizada contenha originalmente $(3,9 \pm 0,2) \times 10^{12}$ AuNPs, enquanto os

conjugados comerciais $(1,6 \pm 0,2) \times 10^{11}$ AuNPs-Ab. Obteve-se uma média de C_{wt} de $87 \pm 16 \mu\text{g/mL}$ para a síntese original e $104 \pm 11 \mu\text{g/mL}$ para os conjugados – sendo que somente a massa das AuNPs está sendo considerada.

1.3.4 Medidas eletroquímicas – otimização da quantificação de AuNPs

Medidas eletroquímicas para a otimização da quantificação de AuNPs foram realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato (PGStat 12, Metrohm Autolab) e SPEs (*Screen-printed electrodes*) (C110, Dropsens). Estes eletrodos são compostos de um substrato cerâmico com um eletrodo de trabalho de carbono (diâmetro de 4 mm), contra-eletrodo de carbono e eletrodo de referência de prata. Para a realização das medidas utiliza-se 80 μL de solução. Para determinar a melhor técnica a ser utilizada, dois métodos foram comparados, descritos nos próximos tópicos. Todas as medidas foram realizadas em triplicata, à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

Método HCl

Primeiramente, 100 μL da suspensão de AuNPs foram colocados em contato com o eletrodo por 5 min. Em seguida, 200 μL de HCl (0,1 mol/L, água ultrapura) (Sigma Aldrich – Brasil) foram adicionados à suspensão. Realizou-se uma medida de DPV, com a aplicação prévia de +1,25 V por 2 min. A medida foi executada na janela de potenciais de +1,25 a 0,00 V, com *step* de 10 mV, amplitude de 50 mV e velocidade de varredura de 33,5 mV/s.

Método HBr/Br₂

Neste caso, 100 μL da suspensão de AuNPs foram adicionados à 200 μL de uma solução de HBr-Br₂ (1,0 mol/L – 0,1 mmol/L, água ultrapura) (Sigma Aldrich – Brasil) e aguardou-se 15 min. Então 10 μL de ácido fenoxiacético (1,0 mmol/L, água ultrapura) (Sigma Aldrich – Brasil) foram adicionados à solução. Uma medida de SWV

foi realizada, com tempo de acumulação de 150 s à -1,4 V, tempo de equilíbrio de 15 s, janela de potencial de 0,00 a 0,75 V, *step* 4 mV, amplitude 25 mV e frequência de 15 Hz.

1.3.5 Fabricação de HSPEs

HSPEs foram construídos utilizando uma impressora semiautomática MMP-SPM (Speedline Technologies - EUA) e estênceis personalizados. Os estênceis foram desenvolvidos usando o software AutoCAD (Autodesk - EUA) e produzidos pela Metal Etch Services (EUA) em placas de aço inoxidável com dimensões de 30,5 x 30,5 cm. Os eletrodos foram impressos em PET em duas etapas separadas (Figura 1.10A). Primeiramente, tinta de Ag/AgCl (E2414, Gwent Inc. – Reino Unido) foi utilizada para imprimir o eletrodo de referência e três trilhas condutoras, usadas para as conexões elétricas. A impressão foi curada a 85°C durante 15 min. Em seguida, foi utilizada tinta de carbono (C2070424P2, Gwent Inc. – Reino Unido) para imprimir o contra-eletrodo e o eletrodo de trabalho, e a camada foi curada a 85°C durante 15 min. Por fim, um isolante transparente (Dupont 5036 - EUA) foi usado para definir a área do eletrodo. O dispositivo final pode ser visto na Figura 1.10B.

Os eletrodos foram construídos durante a realização de estágio na Universidade da Califórnia San Diego (UCSD - USA), sob supervisão do Prof. Dr. Joseph Wang.

Figura 1.10 - A) Esquema mostrando as diferentes etapas envolvidas no processo de produção de HSPEs. Primeiramente, um estêncil metálico é posicionado sobre um pedaço de PET. Em seguida, a tinta desejada é despejada sobre uma das extremidades do estêncil e uma espátula de borracha é utilizada para espalhá-la sobre o estêncil. Por fim, obtém-se o substrato com o desenho desejado, o qual é curado por 15 min à 85°C. O mesmo processo é repetido sobre as trilhas de prata para a obtenção dos eletrodos de trabalho e contra-eletrodo, compostos de tinta de carbono. B) Estrutura final dos HSPEs. O isolante é indicado em azul.

Fonte: Elaborada pela autora.

1.3.6 Medidas eletroquímicas utilizando HSPEs

Todas as medidas eletroquímicas que não compreendem a otimização do método de quantificação de AuNPs foram realizadas utilizando um potenciostato (μ Stat 200, Dropsens, Espanha) e HSPEs, que são compostos de PET, com um eletrodo de trabalho de carbono, contra-eletrodo de carbono e eletrodo de referência de Ag/AgCl, tendo cada um uma área de 3 mm². Para a realização das medidas utiliza-se aproximadamente 6 μ L de solução.

Caracterização eletroquímica dos HSPEs

Diferentes *designs* de HSPEs foram comparados usando medidas eletroquímicas. Testes de estabilidade, reprodutibilidade, repetibilidade e de velocidade de varredura foram realizados. Todos os experimentos foram realizados com uma solução de hexacianoferrato de potássio (II) e hexacianoferrato de potássio (III) (4 mmol/L cada, 1x PBS pH 7,4, Sigma Aldrich - EUA) utilizando os seguintes procedimentos:

Testes de estabilidade foram executados aplicando 50 ciclos em voltametria cíclica (VC). Velocidade de varredura: 100 mV/s, janela de potencial: -0,8 a 0,8 V. Testes de reprodutibilidade foram realizados usando SWV e 3 eletrodos independentes. Parâmetros: tempo de equilíbrio de 15 seg, *step* de 10 mV, amplitude de 0,1 V, frequência de 15 Hz, janela de potencial: de 0,75 a 0,0 V. Testes de repetibilidade foram realizadas pela aplicação de SWV a um único eletrodo 8 vezes consecutivas. Parâmetros: tempo de equilíbrio de 15 seg, *step* de 10 mV, amplitude de 0,1 V, frequência 15 Hz, janela de potencial: de 0,75 a 0,0 V. Finalmente, os testes de velocidade de varredura foram realizados pela aplicação de VC em velocidades de varredura variando de 5 a 500 mV/s. Parâmetros: 2 ciclos, janela de potencial: -0,8 a 0,8 V.

Quantificação Eletroquímica de AuNPs em testes *lateral flow*

Para quantificar as AuNPs após os testes *lateral flow*, utilizou-se a técnica que faz uso de HBr/Br₂ – já que esta se mostrou mais adequada nos testes de otimização realizados com eletrodos comerciais. Para isso, 6 µL de uma mistura de HBr-Br₂ (1,0 mol/L – 0,1 mmol/L, água ultrapura) (Sigma Aldrich – Brasil) são adicionados à zona de testes 15 min após a aplicação da amostra. Após 15 min, adiciona-se 0,5 µL de ácido fenoxiacético (1,0 mmol/L, água ultrapura) (Sigma Aldrich – Brasil). A solução é então transferida para HSPE e uma medida de SWV é realizada, com tempo de acumulação de 150 s à -1,4 V, tempo de equilíbrio de 15 s, janela de potencial de 0,0 a 0,75 V, *step* 4 mV, amplitude 25 mV e frequência de 15 Hz. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C).

1.3.7 Quantificação colorimétrica

A análise colorimétrica dos testes foi realizada através de imagens obtidas com uma câmera digital profissional Canon EOS 600D, sendo que fotos dos dispositivos foram tiradas 15 min após a adição da amostra. A câmera foi equipada com lentes Canon EFS 18-55 mm e um *flash ring* foi usado para garantir iluminação padronizada e uniforme. O protocolo final consiste no uso dos seguintes parâmetros: a) distância plano focal-amostra: 28 cm; b) ISO: 3200 c) F-stop: f/5.6; d) Tempo de exposição: 1/100 s. Para análise de imagens, um software automatizado baseado em MATLAB (MathWorks) foi desenvolvido pelo colaborador José Roberto Moreto. Os parâmetros utilizados para a análise das imagens foram *cutoff radius* de 0,3 e N=3.

1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.4.1 Desenvolvimento da plataforma microfluídica em papel

Inicialmente os testes em papel foram desenvolvidos no formato de bastão, semelhante ao esquema retratado na Figura 1.3. No entanto, neste formato, é

extremamente difícil assegurar boa reprodutibilidade na modificação das membranas sem o uso de equipamentos específicos para distribuir as soluções. Volumes diferentes de biorreceptores eram frequentemente encontrados em cada um dos lados da zona de testes, e a solução era espalhada de maneira diferente em cada um dos dispositivos construídos (Figura 1.11). Este é um problema sério para a avaliação dos resultados especialmente quando são utilizadas técnicas colorimétricas, já que a cor do teste varia muito com a densidade de biorreceptores presentes na membrana. Além disso, a delimitação da área a ser analisada pelo *software* colorimétrico pode conter porções de NC não modificada, como no caso do teste central apresentado na Figura 1.11.

Figura 1.11 - Testes *lateral flow* do tipo sanduíche produzidos no formato de bastão. O destaque em laranja mostra a zona de testes dos dispositivos, que apresentam formatos extremamente variados. Testes realizados com 10, 100 e 1000 nmol/L de Fetuína B.

Fonte: Elaborada pela autora.

Sendo assim, um *design* adequado para a modificação manual da plataforma microfluídica em papel foi desenhado e construído (Figura 1.12). O sistema consiste em um círculo central, correspondente à zona de aplicação de amostras, de onde ramificam 3 braços independentes. Cada um dos braços possui 2 outros círculos: um correspondente à zona de conjugados e outro à zona de teste. Em seguida, existe um grande retângulo, composto de uma membrana de celulose espessa, a qual age como zona absorvente. Todas as zonas a ser modificadas (amostra, conjugado e de testes) tem um formato circular, assegurando uma maior reprodutibilidade nos processos realizados manualmente, e, portanto, maior confiabilidade no resultado final. Cada um dos braços foi modificado com conjugados AuNP-Ab diferentes, realizando a quantificação de um biomarcador específico.

A plataforma foi desenhada visando à inexistência de zonas ‘mortas’ (ou seja, áreas que não contribuem ativamente para o funcionamento do sensor) e um fluxo de solução contínuo e homogêneo. Sendo assim, foi construída com canais estreitos e curvas suaves. Além disso, o *design* circular oferece fácil acesso dos eletrodos às zonas de teste. Outras vantagens do sistema desenvolvido são a utilização de um volume 3x menor de amostra em comparação com o formato em bastão, a facilidade de montagem e o baixo custo de produção. A plataforma desenvolvida, portanto, atende à diversos dos principais objetivos do projeto: baixo custo, alta reprodutibilidade na construção e na modificação e grande potencial para a quantificação precisa dos biomarcadores estudados.

Figura 1.12 - A) Esquema mostrando o novo *design* do dispositivo microfluídico em papel e suas respectivas zonas. S - zona de amostra, C - zona de conjugados, T - zona de testes e A - zona aborvente. B) Foto do dispositivo microfluídico real.

Fonte: Elaborada pela autora.

É importante mencionar que diferentes *designs* e estratégias de montagem foram avaliadas antes de chegarmos ao dispositivo final. Fotolitografia, construção de canais com *sprays* hidrofóbicos e impressoras de corte foram alguns dos métodos testados, que foram descartados devido ao alto custo e a limitação do número de dispositivos construídos - no caso da fotolitografia - e devido à falta de detalhamento das microestruturas - no caso do *spray* hidrofóbico e das impressoras de corte.

1.4.2 Verificação da conjugação AuNP-Ab

Após a otimização do *design* e da estratégia para construção do dispositivo de papel, seguiu-se para a verificação da eficiência dos protocolos envolvidos na preparação do teste *lateral flow*. O primeiro processo a ser verificado foi a conjugação entre AuNPs e Ab. Para isso, misturou-se uma porção de resina de Proteína A, a qual possui grande afinidade de ligação com a região F_c de imunoglobulinas,⁸⁸ aos conjugados AuNP-Ab. Como controle, a resina foi também misturada à AuNPs sem conjugação. Após alguns minutos, a resina é decantada e, caso haja a interação com a proteína A, sua coloração é alterada para rosa. Caso contrário, a resina permanece branca. Os resultados deste procedimento podem ser visualizados na Figura 1.13. Observa-se que as nanopartículas conjugadas com Ab interagiram com a resina, deixando sua coloração rosada. Já no caso controle, onde as AuNPs não estão conjugadas com o material biológico, a resina permanece branca. Portanto, a conjugação AuNP-Ab está ocorrendo de forma adequada para a realização dos testes *lateral flow*.

Figura 1.13 - Verificação da conjugação de AuNP-Ab utilizando resina de proteína A. A) AuNP-Ab e B) AuNP controle, sem Ab.

Fonte: Elaborada pela autora.

1.4.3 Verificação da imobilização de proteínas em NC

Outro procedimento fundamental para o bom funcionamento dos dispositivos *lateral flow* é a imobilização dos biorreceptores em NC para a construção da linha de teste. Apesar do mecanismo exato de interação entre a membrana e as proteínas

ainda não ser completamente elucidado, sugere-se que interações eletrostáticas e hidrofóbicas apresentam um papel fundamental.⁸⁹

A fim de verificar se o procedimento utilizado era capaz de imobilizar as biomoléculas de forma eficiente na membrana, adicionou-se ao centro de um pedaço de NC uma solução de Ab (1 mg/mL, PBS) e de BSA (1% ou 10 mg/mL, PBS). Como controle negativo, em uma segunda membrana adicionou-se a mesma quantidade de PBS. Após 15 min, ambas as membranas foram lavadas com PBS e secas com N₂. Em seguida, realizou-se o teste BCA nas membranas para a verificação da existência de proteínas. Caso hajam biomoléculas imobilizadas, a coloração do reagente é alterada para roxo.

A Figura 1.14 mostra os resultados dos experimentos realizados. Observa-se a mudança de coloração dos reagentes do teste BCA somente nos controles positivos, onde a intensidade da coloração é proporcional à concentração da proteína. Sendo assim, verifica-se que a imobilização tanto dos Ab quanto do agente de bloqueio (BSA) foi realizada de maneira eficiente na NC.

Figura 1.14 - Verificação da eficiência da imobilização de proteínas na NC. Da esquerda para a direita: Ab (1mg/mL), teste positivo e negativo; e BSA (10 mg/mL), teste positivo e negativo.
Fonte: Elaborada pela autora.

1.4.4 Verificação do fluxo no dispositivo em papel

Outra importante característica a ser verificada é o fluxo de solução no dispositivo. Deve-se garantir que a amostra seja distribuída de maneira homogênea nas três ramificações do sensor, e que os conjugados AuNP-Ab sejam “arrastados” com a aplicação da amostra, evitando acúmulo de solução nas bordas da zona de teste, o que poderia gerar resultados falsos. Por fim, a velocidade de fluxo deve ser adequada à interação do analito com os biorreceptores.

Para verificar se a plataforma desenhada atendia aos requisitos citados, dois dispositivos *lateral flow* foram montados utilizando a estratégia sanduíche e Ab anti-Fetúina B. Em um deles, aplicou-se uma amostra em branco (tampão Tris-HCl), enquanto o segundo recebeu uma solução contendo 1000 nmol/L de Fetúina B (Tris-HCl). Os resultados podem ser visualizados na Figura 1.15. Verificou-se que o fluxo de amostra era homogêneo, com boa distribuição entre os três braços do dispositivo. Além disso, as AuNP-Ab presentes na zona de conjugados foram quase completamente arrastadas pelo fluxo de solução, fazendo com que esta retornasse à sua cor original após a finalização dos testes. Não foi observado acúmulo de AuNP-Ab nas bordas da zona de teste, sendo que estes continuaram completamente brancos após a aplicação de tampão. Por fim, a zona de testes se tornou rosa na presença da proteína Fetúina B, como esperado.

Figura 1.15 - Verificação do fluxo nos testes *lateral flow*. A) Dispositivo antes da aplicação de amostra; B) controle negativo, amostra em branco (Tris-HCl). C) controle positivo, amostra 1000 nM de Fetúina B. As áreas marcadas com T e C correspondem à zona de teste e à zona de conjugados dos dispositivos, respectivamente. Os cortes circulares abaixo das imagens destacam as zonas de teste de cada uma das figuras. As zonas absorventes dos dispositivos foram retiradas para melhor visualização dos resultados.

Fonte: Elaborada pela autora.

1.4.5 Otimização do protocolo de montagem do sensor *lateral flow*

Em seguida, o protocolo de montagem dos testes *lateral flow* foi otimizado utilizando o biomarcador da doença de Alzheimer Fetúina B e o ensaio do tipo

sanduíche. O volume, a concentração e o tempo de incubação de cada um dos reagentes utilizados na modificação da plataforma foram estudados. A mudança de coloração das zonas de teste com os diferentes parâmetros foi visível a olho nu, e os correspondentes aos tons de rosa (ou de branco) mais intensos foram escolhidos como ideais para a continuação da construção do dispositivo. Somente 3 parâmetros puderam ser testados para cada uma das otimizações, devido à quantidade limitada de reagentes. Apesar disso, os resultados são coerentes e nos forneceram um protocolo adequado para a quantificação do biomarcador. O resumo dos resultados pode ser observado na Tabela 1.1.

Primeiramente, o volume do conjugado AuNP-Ab carregado na zona de testes foi variado entre valores de 5-10 μ L. Observamos que, para uma mesma concentração de proteína (1000 nmol/L), quanto mais AuNP-Ab aplicado, mais escura a coloração rosa obtida na zona de testes (Tabela 1.1, 1ª linha). Provavelmente, se um maior volume de AuNP-Ab fosse utilizado tons ainda mais escuros seriam obtidos. Porém, a quantidade de material utilizada em cada teste não seria praticável. Portanto, 10 μ L foi escolhido como volume ideal e foi o valor utilizado para os próximos testes.

Em seguida, a concentração de Ab utilizada para imobilização na NC foi variada de 0,1 a 1,0 mg/mL (Tabela 1.1, 2ª linha). Os resultados mostram que, para uma mesma concentração de proteína (1000 nmol/L), Ab mais concentrados geram colorações mais fortes. Novamente, provavelmente soluções de Ab ainda mais concentradas gerariam tons mais escuros. Porém, a quantidade de proteínas utilizada em cada teste iria torná-los impraticável. Portanto, a concentração de 1 mg/mL foi escolhida como ideal para a modificação da NC e foi utilizada nos testes subsequentes.

Em seguida, o tempo de incubação dos Ab na membrana de NC foi avaliado, variando de 15 a 45 min (Tabela 1.1, 3ª linha). Os resultados mostram que os tempos de incubação testados geram tons muito similares para uma amostra de 1000 nmol/L de Fetuína B. Portanto, o período mais curto (15 min) foi escolhido como ideal para os próximos testes.

A concentração ideal do agente de bloqueio, BSA, também foi estudada. Membranas de NC foram tratadas com soluções que variaram de 0,5 a 2,0% da proteína, e uma amostra branca foi usada para avaliar sua eficiência de bloqueio

(Tabela 1.1, 4ª linha). Podemos observar que as soluções de 1,0 e 2,0% realizam o bloqueio de maneira eficiente, mantendo a zona de testes completamente branca, enquanto a solução de 0,5% mostra um tom de rosa bem claro, indicando que há interação da NC com as AuNP-Ab. Portanto, 1,0% foi escolhido como a concentração ideal de BSA para os próximos testes.

Por fim, o tempo de incubação de BSA foi testado, variando de 5 a 45 min (Tabela 1.1, 5ª linha), usando uma solução em branco. Todos os tempos de incubação apresentaram resultados similares, com a NC permanecendo branca e não interagindo com os complexos AuNP-Ab na ausência de proteína. Portanto, 5 min foi escolhido como o tempo ideal de bloqueio da superfície.

Tabela 1.1 - Resumo dos resultados obtidos na otimização do protocolo *lateral flow* para a quantificação do biomarcador da doença de Alzheimer Fetuína B.

Parâmetro	Amostra	Variação 1	Variação 2	Variação 3	Ideal
Volume de AuNP-Ab	1000 nmol/L	5 µL	7,5 µL	10 µL	10 µL
Concentração de Ab	1000 nmol/L	0,1 mg/mL	0,5 mg/mL	1,0 mg/mL	1,0 mg/mL
Tempo de incubação – Ab	1000 nmol/L	15 min	30 min	45 min	15 min
Concentração BSA	Branco	0,5%	1,0%	2,0%	1,0 %
Tempo de incubação BSA	Branco	5 min	30 min	45 min	5 min

Fonte: Elaborada pela autora.

O protocolo utilizado nos testes do tipo competitivo foi derivado da otimização apresentada para os ensaios sanduíche. Neste caso, 0,75 µg de proteína são

imobilizados na membrana de NC (ao invés de 1,0 μg como no caso dos Ab) devido à limitação na quantidade de reagentes. Devido à concentração das biomoléculas, o volume utilizado para a imobilização das proteínas é 3x maior se comparado aos Ab. Sendo assim, o tempo de imobilização também foi aumentado em 3x, passando de 15 para 45 min. Todas as outras etapas do protocolo foram seguidas como estabelecido na otimização.

1.4.6 Calibração visual do sistema *lateral flow*

Após a otimização do protocolo para o ensaio *lateral flow*, construiu-se uma curva de calibração com concentrações de Fetuína B variando de 5 a 500 nmol/L (Tabela 1.2), faixa que inclui suas concentrações típicas em plasma humano. Verifica-se que a coloração da zona de testes apresenta tons de rosa cada vez mais escuros com o aumento da concentração de proteína. Este comportamento é esperado visto que o teste foi montado em formato sanduíche. Sendo assim, os resultados mostram que o protocolo para construção do dispositivo é adequado para a quantificação da proteína na faixa desejada.

Tabela 1.2 - Curva de calibração utilizando concentrações de 5 a 500 nmol/L de Fetuína B. Teste realizado no formato sanduíche.

Concentração	Zona de teste 1	Zona de teste 2	Zona de teste 3
5 nmol/L
10 nmol/L
50 nmol/L
100 nmol/L
500 nmol/L

Fonte: Elaborada pela autora.

1.4.7 Quantificação de AuNPs utilizando amostras padrão

Após o estabelecimento do protocolo para a construção e montagem dos testes *lateral flow* diferentes métodos para a quantificação precisa das AuNPs nas zonas de teste foram estudados. Duas técnicas foram investigadas: a eletroquímica e a colorimétrica. Enquanto a técnica eletroquímica promete uma quantificação mais precisa do metal, a técnica colorimétrica apresenta simplicidade e versatilidade. Sendo assim, ambas foram estudadas e comparadas para determinar o método ideal a ser aplicado.

Eletroquímica

Comparação entre diferentes métodos de quantificação de AuNPs utilizando eletrodos comerciais

Um dos principais mecanismos de quantificação eletroquímica de AuNPs consiste em realizar a dissolução oxidativa dessas em íons metálicos (Au^{3+}), e posteriormente detectá-los. Diversos trabalhos encontrados na literatura utilizam, para isso, soluções ácidas de HBr/Br_2 ou HCl .^{60,90-93} Após a dissolução das AuNPs é realizada a acumulação de íons ou de ouro metálico sobre o eletrodo, seguida de medidas de voltametria para sua detecção e quantificação.

Para determinar o método mais adequado para quantificar AuNPs, dois protocolos foram avaliados. O primeiro deles faz uso de uma solução de HCl , enquanto o segundo utiliza HBr/Br_2 a fim de dissolver as nanopartículas. Os métodos foram avaliados a partir da construção de curvas de calibração com a suspensão de AuNPs variando de concentração entre 17,43 e 0,29 $\mu\text{g/mL}$, correspondentes à diluições de 5 a 300 vezes da suspensão sintetizada (87,13 $\mu\text{g/mL}$).

Método utilizando HCl

Nesse método, o HCl é o agente responsável pela dissolução das AuNPs à ions. O mecanismo elaborado para a detecção das partículas é detalhado a seguir e pode ser visualizado na Figura 1.16.

Primeiramente, o eletrodo é colocado em contato com a solução de AuNPs por 5 min, em circuito aberto (1). Esse passo permite a adsorção das AuNPs sobre a superfície do eletrodo de trabalho. Em seguida, é adicionada a solução de HCl e aplica-se +1,25 V por 120 s, que promove a oxidação das AuNPs à AuCl_4^- (2). Logo depois é realizada uma medida de DPV, a fim de reduzir eletroquimicamente os íons de ouro sobre a superfície do eletrodo (Au^0) e, assim, realizar sua quantificação (3). Por fim, caso deseje-se utilizar o eletrodo novamente, esse pode ser limpo através da aplicação de +1,25 V por 5 min (4).^{90,94} Verificou-se, porém, que a etapa de limpeza é inadequada para os eletrodos descartáveis utilizados neste trabalho, que sofrem grande dano durante a aplicação do procedimento.

Os voltamogramas da detecção de AuNPs em diferentes concentrações podem ser visualizados na Figura 1.17. É possível observar o pico de redução do ouro em 350 mV.⁹⁴ Para determinar a faixa linear e a reprodutibilidade do método foram construídas curvas de calibração a partir da altura e da área dos picos de redução do Au^{3+} à Au^0 (Figura 1.18). O erro associado à cada uma das medidas corresponde ao desvio padrão de três eletrodos independentes, sendo este método utilizado para todos os experimentos subsequentes. Observa-se que somente para concentrações de AuNP entre 0,87 e 8,71 $\mu\text{g/mL}$ são encontradas diferenças significativas na corrente e área dos picos que permita a quantificação precisa das partículas. Como é possível que sejam encontradas concentrações mais baixas de AuNP no sensor em papel, o método testado não possui um LD adequado para sua finalidade.

Figura 1.16 - Mecanismo de quantificação de AuNPs pelo método de HCl.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 1.17 - Voltamogramas obtidos para diferentes concentrações de AuNP utilizando o método HCl.
Concentrações variam de 17,43 a 0,29 $\mu\text{g/mL}$.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 1.18 - Curva de calibração das AuNPs pelo método de HCl utilizando A) a corrente e B) a área dos picos de redução do ouro. Concentrações de AuNP variam de 17,43 a 0,29 µg/mL. Fonte: Elaborada pela autora.

Método utilizando HBr/Br₂

Neste caso, uma solução de HBr/Br₂ é utilizada para dissolver as AuNPs. Enquanto o bromo converte Au⁰ em Au³⁺, o ânion brometo auxilia na dissolução através da coordenação do Au³⁺ com a formação de um complexo forte.⁶⁰ Apesar da presença de Br₂ ser necessária para a dissolução das AuNPs em HBr, essa molécula diminui a eficiência da eletrodeposição do ouro devido à sua reoxidação a 0,7 V.⁶⁰ Sendo assim, é necessário utilizar um agente que remova o excesso de Br₂ antes das análises, como o ácido fenoxiacético e outros derivados fenólicos. Esses interagem espontaneamente com o bromo, inibindo sua ação.

Um esquema do mecanismo de detecção é encontrado na Figura 1.19. Inicialmente, as AuNPs são oxidadas à Au³⁺ através do uso de HBr/Br₂ (1). Em seguida, a solução é colocada em contato com o eletrodo e, a partir da aplicação de um potencial constante por poucos minutos, é realizada a redução e deposição do ouro sobre o eletrodo (Au³⁺ → Au⁰) (2). Por fim, é realizada uma voltametria de redissolução, que oxida, dissolve e quantifica o ouro na forma de Au³⁺ (3). A reutilização do eletrodo pode ser feita pela aplicação de um potencial constante para limpar sua superfície (4). Como no protocolo anterior, os eletrodos descartáveis utilizados no projeto não podem ser submetidos ao protocolo de limpeza devido à danificação ocorrida no processo.

Figura 1.19 - Mecanismo da detecção de AuNPs utilizando HBr/Br₂ e voltametria de redissolução.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 1.20 - Voltamogramas obtidos para diferentes concentrações de AuNP utilizando o método HBr/Br₂. Concentrações variam de 17,43 a 0,35 µg/mL.
Fonte: Elaborada pela autora.

Os voltamogramas de detecção de AuNPs em diversas concentrações podem ser visualizados na Figura 1.20. Nesse caso, podemos observar um único pico, entre 450 e 650 mV, correspondente à oxidação do ouro ($\text{Au}^0 \rightarrow \text{Au}^{3+}$).^{60,95}

A construção da curva analítica a partir da intensidade de corrente e da área do pico de oxidação do ouro mostraram boa linearidade em concentrações entre 3,49 a 0,35 $\mu\text{g/mL}$ de AuNPs (Figura 1.21). A curva relacionada à intensidade de corrente apresentou coeficiente de linearidade (R^2) de 0,985 e sensibilidade de 38,18 $\text{nA mL}/\mu\text{g mm}^2$, enquanto a curva analítica utilizando a área teve $R^2 = 0,996$ e sensibilidade de 5,53 $\text{nA}^2 \text{ mL}/\mu\text{g mm}^2$. O comportamento da curva construída através da intensidade do pico de oxidação do ouro segue a equação $I_p = (1,967 \pm 0,136) \times 10^{-6} + (1,919 \pm 0,107) \times 10^{-6} [\text{AuNP}] (\mu\text{g/mL})$, enquanto a curva construída pela área do pico $A_p = (2,075 \pm 0,116) \times 10^{-7} + (2,780 \pm 0,082) \times 10^{-7} [\text{AuNP}] (\mu\text{g/mL})$. Os limites de detecção, obtidos através da fórmula abaixo, foram de 0,02 e 0,03 $\mu\text{g/mL}$ de AuNPs para a corrente e a área, respectivamente.

$$LD = \frac{3 * SD}{slope_{cc}}$$

Sendo SD o desvio padrão de três medidas de branco e $slope_{cc}$ a inclinação da curva analítica. Os LD apresentados em experimentos posteriores foram obtidos a partir da aplicação da mesma fórmula.

Figura 1.21 - Curva analítica linear das AuNPs construída na faixa de concentrações de 3,49 a 0,35 $\mu\text{g/mL}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Dessa forma, ambos os parâmetros, corrente e área, podem ser aplicados para a quantificação de AuNPs na faixa de concentrações requeridas no projeto. Devido ao maior coeficiente de linearidade, maior faixa de concentrações detectáveis e menor erro associado, o método HBr/Br₂ foi o método escolhido para experimentos posteriores.

Otimização da detecção de AuNPs utilizando HBr/Br₂

Visando o melhor desempenho possível do método de quantificação de AuNPs HBr/Br₂, foi realizada a otimização de todas as concentrações e tempos envolvidos no protocolo. Primeiramente, a concentração de HBr foi variada entre 0,1 e 1,8 mol/L (0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 1,4 e 1,8 mol/L), mantendo a concentração de Br₂ constante em 0,1 mmol/L. Em seguida, a concentração de Br₂ foi variada de 400 a 5 µmol/L (5, 25, 50, 100, 200 e 400 µmol/L) enquanto HBr foi mantido constante em 1,0 mol/L. O tempo de contato entre a solução de HBr/Br₂ e a suspensão de AuNPs foi variado de 0 a 30 min (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min). Após esse processo foram otimizados parâmetros eletroquímicos, como o potencial e o tempo de deposição do ouro sobre os eletrodos. Enquanto o potencial de deposição foi variado de 0,0 a -2,5 V (0, -1,0, -1,4, -2,0 e -2,5 V) sendo aplicado por 150 s, o tempo de deposição foi estudado na faixa de 0 a 250 s (0, 50, 150 e 250 s) (aplicando -1,4V). Todos os experimentos utilizaram uma concentração de AuNPs de 0,44 µg/mL (diluição de 200 vezes) e a otimização foi realizada para a obtenção da maior área de pico possível. O protocolo final pode ser encontrado na sessão de materiais e métodos.

Caracterização Eletroquímica da Detecção de AuNPs utilizando eletrodos comerciais

Para caracterizar o método de detecção de AuNPs baseado em HBr/Br₂ foram estudados parâmetros como estabilidade, reprodutibilidade e repetibilidade utilizando eletrodos comerciais. Em todos os experimentos dessa sessão uma suspensão de 0,44 µg/mL de AuNPs foi detectada (diluição de 200 x da suspensão sintetizada).

Primeiramente, para determinar a reprodutibilidade do sensor, medidas de SWV foram realizadas em 3 eletrodos descartáveis em paralelo. Nesse caso, observou-se uma variação na intensidade da corrente de oxidação do ouro de 17,4%, enquanto valores de área variaram cerca de 25,4%. Diferenças na produção de cada um dos eletrodos pode ter contribuído para o valor de reprodutibilidade obtido.

Em seguida foi determinada a repetibilidade do sensor através de medidas sequenciais de SWV com o mesmo eletrodo descartável. Após 3 medidas, foi observada uma variação de 26,5% na intensidade da corrente de oxidação do ouro e 15,1% de variação em relação a sua área.

Por fim, medidas de VC foram aplicadas para determinar a estabilidade do sensor. Para isso, 50 ciclos sequenciais foram aplicados e a variação de intensidade da corrente de oxidação do ouro foram observados. O sensor estudado mostrou ótima estabilidade, apresentando um decaimento de 9,7% na intensidade da corrente de oxidação do ouro quando comparado o primeiro ciclo ao ciclo de número 50.

Construção de HSPEs

É de grande interesse neste trabalho o desenvolvimento de HSPEs. A introdução destes diminui consideravelmente o preço dos testes, aumentando a sua abrangência à regiões de baixa renda. Além disso, os eletrodos desenvolvidos são capazes de atuar com volumes extremamente baixos de solução (4 – 6 μL), sendo que 80 μL eram utilizados para os eletrodos comerciais. Além da utilização de menos reagentes, a utilização de menores volumes permite que as AuNPs presentes na zona de teste sejam menos diluídas, gerando potencialmente um maior sinal eletroquímico.

Para determinar qual a geometria ideal para obter a melhor performance possível para o projeto, 3 diferentes eletrodos foram testados em relação a sua estabilidade, repetibilidade e reprodutibilidade (Figura 1.22). Os três conjuntos de eletrodos possuíam a mesma configuração: eletrodo de trabalho e contra-eletrodo compostos de carbono, com eletrodo de referência composto de tinta de Ag/AgCl. As áreas do eletrodo de trabalho são de 3,00, 3,14 e 0,79 mm^2 para os eletrodos das linhas i, ii e iii da Figura 1.22, respectivamente.

Figura 1.22 - (A) Testes de voltametria de SWV de reprodutibilidade utilizando 3 eletrodos em paralelo, (B) Testes de estabilidade utilizando VC. 50 ciclos, 100 mV/s. (C) Eletrodos utilizados nos testes. (D) Testes de repetibilidade utilizando SWV. Oito medidas consecutivas foram realizadas em um único eletrodo. (E) Variação de corrente e potencial obtida nos testes de repetibilidade.

Fonte: Elaborada pela autora.

O resumo dos resultados dos testes podem ser verificados na Tabela 1.3:

Tabela 1.3 - Reprodutibilidade (3 eletrodos em paralelo), estabilidade (50 ciclos) e repetibilidade (8 medidas) obtidas para os 3 diferentes *designs* de SPEs caseiros testados. Medidas realizadas em solução de hexacianoferrato de potássio (II) e hexacianoferrato de potássio (III) (4 mmol/L, PBS).

Eletrodo	Reprodutibilidade (%)		Estabilidade (%)		Repetibilidade (%)	
	Δi	ΔE	Δi	ΔE	Δi	ΔE
i	5,35	5,46	19,58	1,90	6,92	5,47
ii	1,62	8,85	15,07	12,80	23,21	19,51
iii	6,45	6,17	25,43	3,06	10,89	5,76

Fonte: Elaborada pela autora.

Verificou-se que o eletrodo da linha i mostrou boa reprodutibilidade ($\Delta i = 5,35\%$ em 3 montagens paralelas), estabilidade ($\Delta i = 19,58\%$ em 50 ciclos) e repetibilidade ($\Delta i = 6,92\%$ em 8 medidas consecutivas), apresentando a melhor performance, em geral. Este mesmo eletrodo também apresentou as maiores intensidades de corrente anódica e catódica, e foi, portanto, escolhido como eletrodo ideal para dar continuidade à nossos estudos.

Quantificação de AuNPs utilizando HSPEs

Em seguida, avaliou-se a performance dos HSPEs quando aplicados ao método HBr/Br₂. Para a execução dos experimentos, zonas de teste compostas de círculos de NC foram bloqueadas com BSA e, após serem lavadas, receberam suspensões de AuNPs de diferentes concentrações. Após a secagem dos complexos sobre a membrana, adicionaram-se os reagentes para quantificação eletroquímica. Esse procedimento visa mimetizar o que ocorre nos testes *lateral flow* e nos auxilia a avaliar a viabilidade da utilização do método HBr/Br₂ nas membranas de NC.

Aplicando concentrações dos complexos AuNP-Ab de até 10,48 µg/mL (diluição de 10x), obteve-se uma curva de calibração linear, com a intensidade da corrente do pico de oxidação do ouro aumentando com a concentração do metal (Figura 1.23). A curva apresentou um bom coeficiente de linearidade ($R^2=0,998$), e a regressão mostra que os dados obtidos seguem a equação $I (\mu A) = (-1,3 \pm 0,4) + (0,428 \pm 0,009) \times [AuNP] (\mu g/mL)$. Além disso, o sensor apresentou boa sensibilidade ($0,143 \mu A mL/\mu g mm^2$), e seu LD foi calculado em 0,32 ng/mL.

Figura 1.23 - A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos com diferentes concentrações relativas de AuNP, variando de 1 a 0,1. B) Curva de calibração utilizando 3 eletrodos independentes por diluição de AuNP.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os eletrodos desenvolvidos mostraram também boa reprodutibilidade no protocolo estudado, com três medidas independentes de 52,39 µg/mL de AuNP-Ab

(diluição de 2x) apresentando uma variação de 10,89% na intensidade da corrente do pico de oxidação do ouro. Esta variação é mais baixa do que a obtida por eletrodos comerciais, apresentada na seção anterior, de 17,4%.

A repetibilidade dos HSPEs foi também investigada. Em 3 medidas consecutivas, observa-se uma variação de 16% na corrente de oxidação do ouro para uma concentração de 52,39 $\mu\text{g/mL}$ de AuNP-Ab (diluição de 2x) (Figura 1.24). Esta variação também é mais baixa do que a obtida para eletrodos comerciais, de 26,50%, apresentada anteriormente.

Foi estudada também a estabilidade dos eletrodos. Aplicando 50 ciclos de VC, observou-se uma variação de 27,48% na corrente de oxidação do ouro. Em experimentos anteriores, obteve-se uma variação de 9,7% para os eletrodos comerciais. Apesar da variação na corrente para os HSPEs ser maior do que a observada em eletrodos comerciais, o valor ainda se encontra dentro do esperado. Além disso, a medida é uma extrapolação da realidade e não deve influenciar nos experimentos realizados regularmente.

Sendo assim, os sensores apresentaram um ótimo desempenho para a quantificação de AuNPs em concentrações semelhantes às obtidas nos testes com proteínas, com boa reprodutibilidade, sensibilidade e baixo LD, apresentando bom potencial para a quantificação precisa dos biomarcadores estudados.

Figura 1.24 - Voltamogramas de onda quadrada relacionados ao estudo de repetibilidade. Três medidas consecutivas foram realizadas, apresentando uma variação de 16% na corrente de oxidação do ouro.

Fonte: Elaborada pela autora.

Método colorimétrico

A técnica colorimétrica vem sendo amplamente utilizada em conjunto à testes *lateral flow* devido à sua simplicidade e versatilidade.^{80,96,97} Esta técnica se baseia na análise da coloração do teste através do uso de *softwares* ou de legendas. Tecnologias atuais permitem que fotos tiradas com *smartphones* sejam utilizadas para o processamento e análise de resultados, fazendo com que os testes sejam portáteis e de baixo custo.

Desenvolvimento de software para a análise colorimétrica

Desenvolveu-se um *software* com base em MATLAB para a quantificação colorimétrica dos biomarcadores utilizando o tom de rosa fornecido pelas AuNPs na zona de teste. Após 15 min da adição da amostra no dispositivo *lateral flow*, é tirada uma foto. As áreas de teste são então segmentadas manualmente e fornecidas ao *software* desenvolvido, que realiza uma série de procedimentos automatizados e quantifica os biomarcadores presentes na amostra.

Resumidamente, o software funciona da seguinte maneira (Figura 1.25): primeiro, as cores da imagem são tratadas para destacar os diferentes tons de rosa gerados pelas AuNPs. Em seguida, o programa reconhece as áreas a serem analisadas e corta a imagem de maneira precisa. Então, os tons presentes na área são divididos em grupos (ou *clusters*), de acordo com suas similaridades de coloração. O valor de cada um dos componentes das cores dos grupos no espaço $L^*a^*b^*$ é então investigado, bem como a distância da cor principal do *cluster* à algumas cores padrão (D). A partir deste ponto, o programa pode seguir dois caminhos distintos. Caso as concentrações das amostras sejam conhecidas, a relação entre cada um dos parâmetros avaliados é mostrada em função da quantidade de proteínas. Caso as concentrações sejam desconhecidas, o *software* calcula a concentração da amostra utilizando curvas de calibração pré-carregadas.

Figura 1.25 - Fluxograma indicando cada uma das etapas da análise colorimétrica dos testes.
Fonte: Elaborada pela autora.

Otimização do software para quantificação de AuNPs

Para obter o protocolo final, a rotina realizada pelo *software* e o processo para tirar fotos foram otimizados. Para isso, os testes *lateral flow* foram realizados utilizando concentrações de Fetuína B de 500 nmol/L. Quinze min após a adição das amostras, fotos dos dispositivos foram tiradas. Em seguida, cada uma das zonas de teste foi segmentada e dividida em grupos de acordo com suas similaridades de cor (Figura 1.26A). A distribuição das cores nos grupos foi estudada utilizando tanto o RGB (Figura 1.26B) quanto o espaço $L^*a^*b^*$ (Figura 1.26C).

Enquanto o espaço RGB é baseado na composição das cores vermelho (R), verde (G) e azul (B) e é amplamente utilizado por dispositivos eletrônicos, o espaço $L^*a^*b^*$ foi desenvolvido de maneira a determinar cores de maneira semelhante à visão humana. Este é definido pelo parâmetro L, que indica a intensidade da cor, pelo parâmetro a^* , que indica as cores verde (valores negativos) e vermelho (valores positivos) e pelo parâmetro b^* , que é relacionado às cores azul (valores negativos) e amarelo (valores positivos). O espaço $L^*a^*b^*$ forneceu maior diferenciação entre os *clusters* e, portanto, foi o escolhido para prosseguir com o desenvolvimento do *software*.

Figura 1.26 - A) Segmentação das zonas de teste em diferentes grupos de cor. B) Distribuição dos grupos de cor no espaço RGB e no C) espaço $L^*a^*b^*$. Uma solução de 500 nmol/L de Fetuina B foi usada para realizar os testes *lateral flow* utilizados na análise colorimétrica. Fonte: Elaborada pela autora.

Em seguida, foi realizada a otimização de diversos parâmetros utilizados para tirar as fotos, visando uma quantificação mais precisa dos biomarcadores (Figura 1.27). O primeiro parâmetro a ser otimizado foi o fundo utilizado (Figura 1.27, 1ª linha), sendo testados um escuro e um claro. O fundo mais escuro fornece melhor contraste com o teste *lateral flow*, permitindo um melhor reconhecimento das áreas a serem analisadas e tornando as diferenças de coloração mais visíveis. Sendo assim, este foi escolhido para o uso em análises subsequentes. Em seguida, a iluminação foi estudada (Figura 1.27, 2ª linha) através da alteração do ISO. Como os tons de rosa são muito claros, imagens claras saturam e perdem os detalhes da cor. Portanto, fotos mais escuras foram escolhidas para as análises subsequentes. Por fim, o posicionamento da iluminação foi investigado (Figura 1.27, 3ª linha). Quando eram usadas luminárias, sombras apareciam abaixo do dispositivo, atrapalhando a análise do *software*. Além disso, diferentes iluminações em cada zona de teste também fornecem diferentes tons, fazendo com que a quantificação dos biomarcadores seja menos precisa. O uso de um *flash ring* fornece iluminação homogênea à amostra, sem a presença de sombras. Portanto, este foi o método escolhido para análises subsequentes.

Por fim, realizou-se a otimização simultânea dos parâmetros de análise existentes no *software*. O primeiro destes é o *cutoff radius*, relacionado ao raio da zona de testes a ser analisado – sendo que quanto maior, menor a área. O segundo

parâmetro a ser variado é o N, que indica o número de grupos de cores a serem divididas cada zona de testes. Para a realização dos experimentos, adicionou-se diferentes concentrações de AuNP-Ab (variadas entre 104,70 até 10,47 $\mu\text{g/mL}$) à membranas de NC. Após 15 min foram tiradas fotos utilizando-se os parâmetros anteriormente otimizados. Em seguida, foram construídas, através do *software* desenvolvido, curvas de calibração variando ambos os parâmetros estudados, sendo que o *cutoff radius* foi variado de 0,1 a 0,3 e N de 3 a 5. As curvas de calibração foram construídas para cada um dos componentes do espaço $L^*a^*b^*$, assim como para D.

Figura 1.27 - Principais parâmetros otimizados para tirar as fotos utilizadas na detecção colorimétrica. Fundo A) Claro e B) Escuro; Iluminação: ISO A) mais alto e B) mais baixo; Sombras A) Iluminação lateral e B) Iluminação com *flash ring*.

Fonte: Elaborada pela autora.

A fim de determinar o melhor conjunto de parâmetros, o R^2 de cada uma das curvas de calibração foi estudado (Tabela 1.4). Observa-se que, em geral, a componente “ L^* ” não apresenta boa correlação com a concentração de AuNP-Ab ($R^2 < 0,7$). A componente “ a^* ”, por outro lado, apresentou a maior linearidade entre as variáveis testadas (usualmente $R^2 > 0,9$). Quanto aos valores de *cutoff radius*, observa-se que, em geral, os valores de R^2 aumentam com seu incremento (Tabela

1.5). Quanto ao valor de N, observa-se os maiores valores na soma de R^2 ao utilizarmos N=3 ou 4 (Tabela 1.6). Observando a soma dos R^2 para cada um dos conjuntos de parâmetros e seus valores individuais, temos que a combinação de *cutoff radius* = 0,3 e N = 3 fornece os melhores resultados. Sendo assim, esta foi utilizada para estudos subsequentes.

Tabela 1.4 - Valores de R^2 obtidos na otimização dos parâmetros *cutoff radius* e N para cada um dos componentes do espaço $L^*a^*b^*$ e para D. A soma de todos os valores de R^2 para cada condição testada é também apresentada.

Cutoff Radius	N	L*	a*	b*	D	Soma
0,1	3	0,160	0,981	0,445	0,972	2,558
0,1	4	0,395	0,806	0,835	0,743	2,780
0,1	5	0,536	0,949	0,902	-0,101	2,285
0,2	3	0,670	0,963	0,979	0,777	3,390
0,2	4	0,733	0,906	0,860	0,851	3,351
0,2	5	0,657	0,931	0,715	0,577	2,882
0,3	3	0,689	0,953	0,992	0,786	3,419
0,3	4	0,649	0,942	0,831	0,941	3,362
0,3	5	0,640	0,986	0,749	0,905	3,281

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 1.5 - Soma dos R^2 obtidos para as curvas de calibração em relação à variação do *cutoff radius*.

Cutoff radius	Soma dos R^2
0,1	7,623
0,2	9,623
0,3	10,062

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 1.6 - Soma dos R^2 obtidos para as curvas de calibração em relação à variação do N.

N	Soma dos R^2
3	9,367
4	9,493
5	8,448

Fonte: Elaborada pela autora.

Calibração padrão utilizando o software desenvolvido

A calibração padrão foi realizada também através do método colorimétrico, utilizando o *software* desenvolvido para a análise automatizada dos testes. Utilizando os parâmetros otimizados e concentrações de AuNP-Ab variando de 104,70 até 10,47 $\mu\text{g/mL}$ (diluição de 10x), obteve-se as curvas de calibração observadas na Figura 1.28. Ao lado esquerdo, observa-se a dependência do valor de cada um dos componentes do espaço $L^*a^*b^*$ em relação à concentração das AuNPs. Ao lado direito observa-se a distância da coloração do cluster à cores padrão (D) e sua dependência em relação à concentração relativa de AuNPs. Os coeficientes de linearidade, assim como os valores para a inclinação e intersecção de cada uma das retas pode ser visualizado na Tabela 1.7. Valores de sensibilidade, reprodutibilidade (para 3 montagens paralelas e uma concentração de 83,82 $\mu\text{g/mL}$ das AuNP-Ab – diluição de 1,25x) e LD de cada uma das curvas podem, por sua vez, ser visualizados na Tabela 1.8.

Figura 1.28 - A) curva de calibração para cada um dos componentes L^* , a^* e b^* no espaço $L^*a^*b^*$. Para sua construção, foram utilizadas concentrações de AuNPs de até 10,47 $\mu\text{g/mL}$ (diluição de 10x) B) curva de calibração relacionando a distância da coloração do *cluster* à uma cor padrão e a concentração de AuNPs na amostra.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 1.7 - Parâmetros relacionados a cada uma das curvas de calibração colorimétricas padrão.

Curva	R ²	Intercepto	Inclinação
L [*]	0,689	78,5 ± 0,6	-0,07 ± 0,02
a [*]	0,953	0,0 ± 0,3	0,075 ± 0,005
b [*]	0,992	4,52 ± 0,06	-0,0277 ± 0,0008
D	0,993	0,040 ± 0,001	(7,4 ± 0,2) × 10 ⁻⁴

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 1.8 - Sensibilidade, reprodutibilidade e LD calculados para cada um dos parâmetros colorimétricos estudados.

Curva	Sensibilidade (mL/μg mm ²)	Reprodutibilidade (%)	LD (μg/mL)
L*	-0,0246	1,59	0,49
a*	0,0249	5,50	0,08
b*	-0,0092	3,86	0,74
D	0,0002	3,71	0,20

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se que o componente “L*” não apresenta correlação relevante com a concentração de AuNPs, apresentando um coeficiente de linearidade extremamente baixo, de 0,689. Os componentes “a*” e “b*”, por outro lado, apresentam correlação com a concentração do metal, com coeficientes de linearidade de 0,953 e 0,992, respectivamente. A componente “b*”, porém, apresentou um LD cerca de 10x maior do que “a*”. Sendo assim, a componente “a*” apresentou a melhor performance para a detecção de AuNPs, apresentando altos valores de R^2 , de sensibilidade e de reprodutibilidade, além de apresentar um baixo LD. Por fim, D também apresenta bom potencial para quantificação precisa dos biomarcadores, com o mais alto coeficiente de linearidade (0,993), boa reprodutibilidade e baixo LD. Sendo assim, tanto o valor das componentes “a*” do espaço L*a*b* quanto a distância da coloração do *cluster* à colorações (D) se mostraram as mais adequadas para a quantificação das AuNPs em amostras padrão.

1.4.8 Quantificação dos biomarcadores utilizando plataformas *lateral flow*

Em seguida, realizou-se a quantificação dos biomarcadores estudados utilizando as plataformas *lateral flow* desenvolvidas e os métodos de quantificação de AuNPs otimizados.

Amostras individuais

Primeiramente foram construídas curvas de calibração para cada um dos biomarcadores individualmente. Para isso, estudamos a resposta dos biossensores utilizando as técnicas eletroquímica e colorimétrica em uma ampla faixa de concentração – tipicamente de 0,0 a 1000 nmol/L.

A primeira proteína a ser testada foi a Fetuína B, que teve seus ensaios baseados no formato sanduíche. As curvas de calibração obtidas para concentrações de 0,0 – 500 nmol/L podem ser observadas na Figura 1.29 (A,C-F), assim como os voltamogramas de onda quadrada (B) e as fotos da zona de teste (G).

Parâmetros relacionados às curvas de calibração, como equações obtidas por regressão linear, coeficientes de linearidade e faixa linear podem ser visualizados na Tabela 1.9. Valores de sensibilidade, LD e reprodutibilidade, por sua vez, estão indicados na Tabela 1.10.

Tabela 1.9 - Parâmetros relacionados às curvas de calibração eletroquímica e colorimétrica da proteína Fetuína B.

Técnica/Parâmetro	Intercepto	Inclinação	R²	Faixa linear (nmol/L)
Eletroquímica	1,8 ± 0,2	0,052 ± 0,006	0,960	0,1 - 50
Colorimétrica – L*	67,7 ± 0,5	-0,144 ± 0,009	0,988	1,0 - 100
Colorimétrica – a*	2,0 ± 0,1	0,066 ± 0,003	0,992	0,0 - 100
Colorimétrica – b*	1,23 ± 0,05	-0,012 ± 0,002	0,948	0,0 - 50
Colorimétrica – D	0,033 ± 0,002	0,00163 ± 0,00004	0,997	0,1 - 100

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 1.10 - Valores de sensibilidade, LD e reprodutibilidade para a detecção de Fetuína B a partir das técnicas eletroquímica e colorimétrica.

Técnica/Parâmetro	Sensibilidade	LD (nmol/L)	Reprodutibilidade (%)
Eletroquímica	0,0172 µA L/nmol mm ²	0,003	17,27
Colorimétrica – L*	-0,0203 L/nmol mm ²	0,24	2,79
Colorimétrica – a*	0,0094 L/nmol mm ²	0,09	20,26
Colorimétrica – b*	-0,0016 L/nmol mm ²	1,77	17,83
Colorimétrica – D	0,000231 L/nmol mm ²	0,09	21,67

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 1.29 - A) Curva de calibração da proteína Fetuina B construída através da técnica eletroquímica. B) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações da proteína. C-F) Calibração colorimétrica do sistema utilizando os componentes L^* (C), a^* (D), b^* (E) e a distância da amostra às cores padrão D (F). G) Fotos da zona de detecção obtidos em diferentes concentrações de Fetuina B.

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se, em todas as curvas de calibração, uma tendência linear seguida de saturação. Além disso, é visto o aumento da quantidade de AuNPs na zona de teste com o aumento da concentração de proteína. Este comportamento é esperado, visto que o sensor de Fetuína B é baseado na estratégia sanduíche. A saturação, por sua vez, ocorre provavelmente devido à limitação no número de sítios de interação disponíveis na zona de teste, mantendo constante o sinal obtido acima de determinada concentração – neste caso, 100 nmol/L.

A faixa linear obtida a partir dos diferentes métodos de detecção não apresentou variações significativas, e as concentrações típicas apresentadas são de 0,1 – 100 nmol/L. Porém, parâmetros adicionais revelaram vantagens e desvantagens de ambas as técnicas estudadas. Observa-se que a técnica colorimétrica gerou coeficientes de linearidade maiores do que a eletroquímica (0,997 para “D”, 0,992 para “a*” e 0,960 para a técnica eletroquímica), enquanto a técnica eletroquímica apresentou limites de detecção significativamente menores (0,003 nmol/L para eletroquímica e 0,09 para os parâmetros colorimétricos “a*” e “D”). Por fim, a reprodutibilidade do parâmetro colorimétrico “L*” se destacou por ser cerca de 10x maior do que a de todas as outras técnicas testadas (variação do sinal em 3 medidas em paralelo).

Ambas as técnicas colorimétrica e eletroquímica atingiram resultados satisfatórios, sendo capazes de quantificar a Fetuína B com boa reprodutibilidade e sensibilidade em uma ampla faixa de concentrações. O parâmetro colorimétrico “L*” mostrou o melhor desempenho geral entre os testados, apresentando um bom coeficiente de linearidade (0,988), boa reprodutibilidade (2,79%) e LD (0,24 nmol/L) adequado à detecção da proteína em sangue humano (tipicamente da ordem de $\mu\text{mol/L}^{29,30}$).

Em seguida, realizou-se a calibração do sistema utilizando a proteína Clusterina. Neste caso, utilizou-se a estratégia competitiva visto que o método sanduíche apresentou somente resultados falso negativo. Isso provavelmente ocorreu devido à não existir dois sítios de interação simultaneamente disponíveis para ligação com os Ab.

As curvas de calibração para Clusterina em concentrações de 0,0 à 1000 nmol/L, assim como os voltamogramas de onda quadrada e as fotos da zona de testes

podem ser visualizadas na Figura 1.30. Parâmetros relacionados às curvas de calibração e à quantificação da proteína podem ser visualizados na Tabela 1.11 e na Tabela 1.12.

Figura 1.30 - A) Curva de calibração da proteína Clusterina construída através da técnica eletroquímica. B) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações da proteína. C-F) Calibração colorimétrica do sistema utilizando os componentes L^* (C), a^* (D), b^* (E) e a distância da amostra às cores padrão D (F). G) Fotos da zona de detecção obtidos em diferentes concentrações de Clusterina.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como observado para Fetuína B, as curvas de calibração apresentam uma tendência linear seguida de saturação. Neste caso, porém, o aumento de proteína leva à uma diminuição na concentração de marcadores na zona de testes, o que ocorre devido ao teste ser baseado no formato competitivo. A saturação neste tipo de sistema pode ser justificada pela interação da amostra com todos os sítios disponíveis nos Ab conjugados com AuNP.

Observa-se novamente que ambas as técnicas de detecção apresentaram faixas lineares semelhantes, que variaram tipicamente de 0,1 – 10 nmol/L. Além disso, assim como anteriormente, os coeficientes lineares apresentados pela técnica colorimétrica (0,998 para “L*” e 0,962 para “b*”) foram maiores do que os obtidos através da técnica eletroquímica (0,945) e os limites de detecção apresentados utilizando a técnica eletroquímica (0,0008 nmol/L) foram menores do que os obtidos pela técnica colorimétrica (0,12 nmol/L para “L*” e 0,7 nmol/L para “b*”). Observamos também novamente uma reprodutibilidade cerca de 10x maior para o parâmetro “L*”, se comparado às demais técnicas (variação média de 20% em 3 medidas paralelas).

Tabela 1.11 - Parâmetros relacionados às curvas de calibração eletroquímica e colorimétrica da proteína Clusterina.

Técnica/Parâmetro	Intercepto	Inclinação	R²	Faixa linear (nmol/L)
Eletroquímica	6,19372 ± 0,41399	-0,17945 ± 0,03073	0,945	0,1 - 25
Colorimétrica – L*	58,43 ± 0,05	0,285 ± 0,008	0,998	0,0 - 10
Colorimétrica – a*	4,2 ± 0,1	-0,23 ± 0,04	0,940	0,0 - 5,0
Colorimétrica – b*	0,53 ± 0,06	0,029 ± 0,004	0,962	1,0 - 25
Colorimétrica – D	0,082 ± 0,005	-0,005 ± 0,002	0,815	0,0 - 5,0

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 1.12 - Valores de sensibilidade, LD e reprodutibilidade para a detecção de Clusterina a partir das técnicas eletroquímica e colorimétrica.

Técnica/Parâmetro	Sensibilidade	LD (nmol/L)	Reprodutibilidade (%)
Eletroquímica	-0,0598 $\mu\text{A L/nmol mm}^2$	0,0008	25,76
Colorimétrica – L*	0,0403 L/nmol mm ²	0,12	1,82
Colorimétrica – a*	-0,0327 L/nmol mm ²	0,03	21,07
Colorimétrica – b*	0,00416 L/nmol mm ²	0,70	25,43
Colorimétrica – D	-0,00077 L/nmol mm ²	0,03	20,39

Fonte: Elaborada pela autora.

Em conclusão, o parâmetro “L*” mostrou o melhor desempenho para a quantificação de ambos biomarcadores, apresentando altos coeficientes de linearidade e boa reprodutibilidade. Este resultado é distinto do obtido na calibração padrão, realizada na ausência de proteínas. Neste caso, os parâmetros “a*” e D se mostraram mais adequados para a quantificação das AuNPs. Isso pode ser justificado pelo fato de AuNPs alterarem sua coloração com a presença de biomoléculas em sua superfície.⁹⁸

Amostras mistas

Após a calibração de cada uma das proteínas individualmente, seguiu-se para testes utilizando amostras mistas. Neste caso, foram aplicadas aos dispositivos três misturas distintas contendo os dois biomarcadores estudados acrescidos de PPY (Precursor do hormônio pancreático). Este consiste em uma proteína secretada pelas células das ilhotas de Langerhans após refeições, sendo também um biomarcador da doença de Alzheimer relacionado principalmente à alterações no volume cerebral.^{26,99,100}

A análise da composição de cada uma das misturas foi realizada a partir de curvas de calibração construídas em amostras mistas e utilizando o parâmetro colorimétrico L*, que apresentou o melhor desempenho entre os testados. A

composição de cada uma das misturas e as concentrações dos biomarcadores obtidas através do sensor pode ser visualizada na Tabela 1.13.

Tabela 1.13 : Composição das misturas de biomarcadores utilizadas nos testes e concentrações obtidas pelos sensores para cada um dos biomarcadores.

Mistura	[Fetuína B] adicionada (nmol/L)	[Fetuína B] obtida (nmol/L)	[Clusterina] adicionada (nmol/L)	[Clusterina] obtida (nmol/L)	[PPY] adicionada (nmol/L)
1	1	-4 ± 4	10	9 ± 4	10
2	10	16 ± 7	5	7 ± 3	25
3	50	49 ± 12	1	2 ± 2	1

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se que mesmo na presença de diversas proteínas a quantificação de cada um dos biomarcadores foi específica. Todas as concentrações testadas para ambos os analitos se encontram de acordo com o esperado. Portanto, o dispositivo foi capaz de realizar a detecção simultânea das proteínas e apresenta bom potencial para ser aplicado em amostras complexas.

1.5 CONCLUSÕES

Nosso objetivo foi desenvolver um biossensor do tipo *lateral flow* para a quantificação simultânea de 2 biomarcadores sanguíneos relacionados à doença de Alzheimer: Fetuína B e Clusterina. Para isso, foram utilizados Ab marcados com AuNP, as quais foram posteriormente quantificadas e relacionadas à concentração de proteínas na amostra. Um novo dispositivo microfluídico *lateral flow* de baixo custo foi desenvolvido e otimizado para a modificação manual das membranas com boa reprodutibilidade e para a quantificação precisa dos biomarcadores. Duas técnicas foram avaliadas para a quantificação de AuNPs: colorimétrica e eletroquímica. O parâmetro colorimétrico “L*” apresentou o melhor potencial para a quantificação dos biomarcadores, apresentando altos coeficientes de linearidade ($R^2 = 0,988$ e $0,998$ para Fetuína B e Clusterina, respectivamente), boa reprodutibilidade (variações de 2,79% para Fetuína B e 1,82% para Clusterina) e baixos limites de detecção (0,24 e 0,12 nmol/L para Fetuína B e Clusterina, respectivamente). Por fim, a realização de

medidas em amostras contendo misturas dos analitos mostrou que o dispositivo apresenta bom desempenho na detecção simultânea de ambos os marcadores, sofrendo baixa interferência das outras proteínas testadas. Portanto, os objetivos propostos foram alcançados, permitindo o desenvolvimento de dispositivos simples e de baixo custo para auxiliar no diagnóstico precoce da doença de Alzheimer. Esperamos que estes aumentem o número de diagnósticos precoces e sua precisão, levando a uma maior sobrevida do paciente, bem como uma melhor compreensão do mecanismo da doença e possivelmente novos tratamentos.

2 CAPÍTULO II: IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO *LABEL-FREE* PARA A QUANTIFICAÇÃO DO HORMÔNIO MELATONINA

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 Melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxipriptamina), também conhecida como hormônio do escuro, é uma indolamina presente em uma grande diversidade de organismos, incluindo plantas, bactérias e animais.¹⁰¹ Acredita-se que sua sinalização seja uma das mais antigas na natureza,¹⁰² atuando na regulação de diversos processos biológicos, incluindo o relógio biológico e ações sazonais.¹⁰¹ Nos seres humanos, a biossíntese da melatonina é realizada de maneira rítmica pela glândula pineal, sendo esta molécula a principal fonte de controle dos ciclos circadianos.¹⁰³ Devido à regulação deste processo depender de níveis extremamente baixos da indolamina, o hormônio produzido pela glândula circula em concentrações da ordem de pmol/L.¹⁰⁴ A melatonina pode também ser produzida de maneira constitutiva pela retina e pelo trato gastrointestinal¹⁰⁵ e sob requisição por macrófagos, linfócitos e pela microglia, quando ativados por patógenos ou por lesões abióticas.^{105–107} Nestes casos, o hormônio pode atingir concentrações locais da ordem de mmol/L.¹⁰⁴ Além do composto ser encontrado no plasma em concentrações rítmicas, a melatonina está também presente na saliva humana em concentrações dez vezes mais baixas¹⁰⁸ e sua forma metabolizada, 6-sulfatoximelatonina, pode ser encontrada na urina seguindo ritmos circadianos.¹⁰⁹

A melatonina é chamada de hormônio do escuro pelo fato da sua produção pela glândula pineal ser significativamente aumentada na ausência de iluminação, sendo que a concentração da molécula em plasma humano é de 50 a 200 pg/mL (0,22 a 0,86 nmol/L) durante a noite, e menor do que 2,0 pg/mL (8,6 pmol/L) durante o dia.^{109–}

¹¹¹ Para entender como isso ocorre, devemos estudar seu mecanismo de biossíntese:

Primeiramente, o aminoácido triptofano, proveniente da dieta, é hidroxilado pela enzima triptofano hidroxilase (TPOH), gerando o 5-hidroxitriptofano. Este, por sua vez, é decarboxilado pela enzima L-aminoácido aromático descarboxilase (AADC), gerando a serotonina (5-hidroxitriptamina). Em seguida, a enzima N-acetiltransferase (AANAT) age sobre o composto, transferindo à este um grupo acetil e construindo a N-acetilserotonina (NAS). Por fim, a enzima hidroxí-indol-O-metiltransferase (ASMT) transfere um grupo metil à molécula, gerando a melatonina.¹¹² Um esquema mostrando a estrutura das principais moléculas envolvidas pode ser visto na Figura 2.1.

A principal via de catabolismo da molécula, por sua vez, é iniciada por monooxigenases hepáticas (CYP1A2, CYP1A1, PYP1B1), que hidroxilam a melatonina à 6-hidroximelatonina. Em seguida, sulfotransferases adicionam um grupamento sulfato à molécula, gerando o metabólito 6-sulfatoximelatonina, o qual é facilmente excretado pela urina.¹⁰¹

Figura 2.1 - Mecanismo de biossíntese da melatonina. As áreas modificadas em cada processo enzimático estão destacadas em amarelo.

Fonte: Adaptada de SRINIVASAN; GECHTMAN; BAYER.¹¹³

O processo que leva à produção rítmica de melatonina pela glândula pineal se inicia com a transmissão de informações sobre a luminosidade ambiente pela retina ao núcleo supraquiasmático, um conjunto de neurônios presente no hipotálamo. Este

recebe, interpreta e envia os sinais de luminosidade ao gânglio cervical superior, que os redireciona para a glândula pineal.¹⁰³ Caso esteja escuro, a ativação de receptores adrenérgicos β pela noradrenalina gera um aumento na transcrição do gene e na atividade da enzima AANAT,^{114–116} que corresponde à etapa limitante no ciclo de produção de melatonina.¹¹⁷ Dessa maneira, a glândula pineal secreta a indolamina nas concentrações adequadas ao período em que o organismo se encontra.

2.1.2 A pluralidade de funções da melatonina

Diversas evidências apontam que a regulação do relógio biológico não é a única função da melatonina. Primeiramente, como já mencionado, diversas células e órgãos são capazes de produzir a indolamina localmente. Como, neste caso, a molécula não atinge a corrente sanguínea (ou atinge por períodos extremamente curtos), sabe-se que não há influência destas na regulação dos ritmos circadianos. Atualmente é conhecido que esta produção local do hormônio possui o papel de proteger os tecidos através de ações antioxidantes e anti-inflamatórias.^{118–121}

Outras evidências da pluralidade funcional da melatonina vêm da presença de seus principais receptores de membrana, MT₁ e MT₂, em uma imensa variedade de tecidos e órgãos. Exemplos incluem apêndice, pele, placenta, aorta, artérias cerebrais, tecido adiposo e diversas células do sistema imune.¹²² A maior densidade dos receptores MT, porém, são encontrados no núcleo supraquiasmático, estrutura responsável pelos efeitos cronobióticos e importante para a iniciação do sono.¹²² É interessante mencionar que apesar dos receptores MT poderem se substituir mutuamente, estes também podem agir de maneiras opostas. Por exemplo, enquanto a ativação dos receptores MT₁ leva à vasoconstrição, a ativação dos receptores MT₂ leva à vasodilatação.¹²³

Além dos seus principais receptores, diversos outros sítios de ligação para a molécula foram descritos. Estes incluem o MT₃,^{124–126} fatores de transcrição relacionados à superfamília do receptor de ácido retinóico,^{127–130} as proteínas calmodulina e calreticulina e o complexo mitocondrial I.¹³¹

O profundo entendimento das múltiplas funções e efeitos da melatonina tem se mostrado cada vez mais importante devido à sua crescente administração não controlada e de drogas baseadas nesta molécula para o tratamento de distúrbios de sono e a atenuação de sintomas depressivos.¹²² Sendo assim, nas últimas décadas, esforços intensos tem sido realizados para entender e descrever as diversas influências da melatonina em outras ações e sistemas fisiológicos.^{106,132–134}

Um dos principais estudos indica que o hormônio possui papel essencial na organização da resposta imune.¹³⁵ Quando produzida em níveis normais pela glândula pineal, a melatonina tem o papel de evitar respostas desnecessárias, inibindo o rolamento e a aderência de leucócitos ao endotélio e reduzindo sua permeabilidade vascular.^{135–137} Quando é necessário que uma ação imune seja desenvolvida, a síntese de melatonina noturna pela glândula pineal é suprimida, permitindo que o sistema atue de maneira eficiente.^{104,135,138,139} Além disso, como mencionado previamente, a melatonina é produzida localmente pelas células de defesa, agindo como um anti-inflamatório.^{104,119,121,135,140} É interessante mencionar que, apesar da interrupção da produção rítmica de melatonina pela glândula pineal seja essencial para que a resposta imune seja montada de maneira eficiente, caso este efeito dure por períodos prolongados, existe a chance de desenvolvimento de diversas doenças.¹³⁵

Evidências também mostram que outras funções do hormônio auxiliam na melhora da atuação do sistema imune. Por exemplo, a melatonina atua no aumento da produção de interleucinas,^{141,142} e possui ação antiapoptótica e antioxidante.¹⁴³ Sendo assim, diversos de seus efeitos podem ser indesejados à pacientes com doenças autoimunes. Estudos apontam que a molécula agrava sintomas de artrite reumatóide pela estimulação da produção de citocinas proinflamatórias,^{144–146} além de apresentar níveis de concentração plasmáticos mais elevados nestes pacientes.¹⁴⁵

Por fim, devemos citar um outro efeito comumente associado à melatonina: o seu potencial de inibir radicais livres.^{147–149} Para que isso ocorra em humanos, a molécula deve se apresentar em doses farmacológicas.¹²² Porém, outros processos mediados pela melatonina em concentrações fisiológicas auxiliam na proteção antioxidativa através do aumento na expressão de enzimas antioxidantes ou pela redução da formação de radicais livres.¹⁵⁰

O hormônio tem se mostrado associado à inúmeros outros processos biológicos, como a regulação da massa corporal, a reprodução, a maturação sexual e a calcificação de ossos.¹⁵¹ Sendo assim, a melatonina apresenta uma extrema versatilidade biológica, atuando ativamente em uma grande diversidade de processos. Portanto, a comum administração independente da molécula principalmente voltada à regulação do sono pode trazer diversos efeitos benéficos, mas estes não serão necessariamente exclusivos. Por outro lado, a administração controlada da molécula tem se mostrado como uma oportunidade para tratar uma grande diversidade de distúrbios.

2.1.3 Doenças relacionadas à concentrações alteradas de melatonina

Devido à imensa variedade de funções da melatonina, alterações em sua concentração podem indicar ou ser o fator de desenvolvimento dos mais diversos tipos de doença. Enquanto algumas destas apresentam uma clara correlação com alterações nos níveis do hormônio, como a degradação de conexões neuronais ou da glândula pineal, outras apresentam mecanismos mais complexos. Por exemplo, doenças como transtornos de sono,¹⁵² depressão,^{153,154} hipertensão,¹⁵⁵ doença de Alzheimer,^{156,157} doenças cardiovasculares,¹⁵⁸ diabetes tipo 2¹⁵⁹ e certos tipos de câncer, especialmente câncer de mama,¹⁶⁰ são relacionados à níveis anormais de melatonina em plasma.

Uma importante questão que surge destes resultados é se a alteração nas concentrações da indolamina são a causa ou a consequência do desenvolvimento de cada uma destas situações. Em diversos casos, acredita-se que uma diminuição nos níveis do hormônio são causadas pelos próprios eventos. Exemplos incluem a dor aguda, o estresse e doenças que estão associadas ao estresse oxidativo, quando a melatonina é destruída por sua interação com radicais livres.¹²² É importante mencionar que, nestes casos, a diminuição da concentração de melatonina pode favorecer o futuro desenvolvimento de outras doenças.¹²²

Por outro lado, a contribuição de baixos níveis de melatonina para o desenvolvimento ou a progressão de doenças pode ser deduzida pela associação destas com polimorfismos genéticos relacionados à molécula. Alterações em genes

que controlam a secreção de melatonina (enzimas como AANAT) ou em seus receptores de membrana (MT₁ e MT₂) se mostraram capazes de levar às mesmas consequências que uma diminuição induzida do hormônio em diversos casos.¹²² Exemplos de doenças incluem depressão,¹⁶¹ artrite reumatóide,¹⁶² diabetes tipo 2^{163,164} e doença arterial coronariana,¹⁶⁵ entre outras.

A relação da molécula com o desenvolvimento de câncer também tem sido alvo de extensos estudos. Diversas publicações tem apontado que a secreção de melatonina restringe a iniciação e a progressão de tumores.¹⁶⁶ Além disso, experimentos *in vitro* indicam que a melatonina pode inibir o crescimento de células de câncer de mama positivos para receptores de estrogênio. Isso ocorre devido ao aumento nos níveis de glutathione,¹⁶⁶ como também pela modulação de mecanismos de sinalização relacionados ao estrogênio.¹⁶⁷ Foi também demonstrado que os receptores MT₁ e MT₂ podem inibir a absorção de ácido graxo, evitando a formação do metabólito mitogênico ácido 13-hidroxioctadecanoico.¹⁶⁶ Por fim, estudos recentes apontam que a concentração de melatonina em um tumor está diretamente associada ao seu grau de malignidade, podendo possivelmente ser utilizada para seu diagnóstico.¹⁶⁸

Sendo a causa ou consequência, a melatonina tem sido apontada como um possível biomarcador para a grande diversidade de males aqui citados. Dessa maneira, a quantificação simples, rápida e de baixo custo do composto pode auxiliar no diagnóstico e acompanhamento de pacientes.

2.1.4 A administração de melatonina

Devido às doenças serem usualmente causadas pela diminuição dos níveis de concentração de melatonina, uma possibilidade consiste na administração da molécula para o tratamento ou para evitar o surgimento destas. Isso, porém, deve ser feito com extrema cautela. Como citado anteriormente, é possível que a administração do hormônio gere não somente os efeitos desejados devido à pluralidade de funções exercidas pela molécula.

A literatura mostra que a estratégia tem apresentados bons resultados para o tratamento e prevenção de sintomas relacionados à doença de Alzheimer. Já é conhecido que pacientes com a doença apresentam uma diminuição acentuada nas concentrações de melatonina quando comparados à controles de mesma idade.^{143,169,170} O declínio, neste caso, é explicado principalmente devido à degeneração de estruturas cerebrais responsáveis pelo controle e excreção do hormônio.¹²² A administração de melatonina tem se mostrado útil para reduzir o dano oxidativo e o acúmulo da proteína amilóide relacionados à doença.¹⁷¹ Os estudos também apresentam um aumento na taxa de sobrevivência¹⁷¹ de pacientes tratados com a molécula e a redução da apoptose neuronal.¹⁷² É interessante mencionar que nenhum benefício substancial foi observado quando a administração era iniciada tardiamente.¹⁷³

A administração de melatonina tem sido também extensivamente estudada para o controle e prevenção de doenças cardiovasculares, sendo capaz de reduzir a pressão sanguínea. Isso ocorre principalmente devido às suas propriedades antioxidantes, como também pela diminuição dos níveis de catecolamina e a relaxação do músculo liso vascular, entre outros.¹⁷⁴ Outro exemplo inclui a administração da indolamina para a manutenção de danos ocorridos devido à interrupção temporária do bombeamento sanguíneo à certos órgãos ou regiões do corpo. A molécula tem mostrado bons resultados na recuperação de funções cardíacas que se tornaram anormais e de tecidos do coração danificados por estes eventos. Além disso, a produção de $O_2^{\cdot-}$ foi reduzida de maneira expressiva, assim como a atividade da proteína mieloperoxidase.^{175,176}

A administração externa de melatonina e seus derivados vêm também sendo estudada para doenças como o mal de Parkinson,^{177,178} insônia,¹⁷⁹ câncer,^{180,181} distúrbios de ritmos circadianos,¹⁸² depressão¹⁸³ e para diminuir o estresse oxidativo.¹⁸⁴

É importante mencionar que a produção de melatonina depende da idade, gênero, e varia significativamente entre indivíduos,^{185,186} o que faz com que a administração de dosagem subjetiva não seja recomendada. Neste cenário, a quantificação e melatonina traz grande potencial para melhorar a dosagem exógena do composto.

2.1.5 Métodos atualmente utilizados para detecção de melatonina

Atualmente, os métodos mais usados para a quantificação de melatonina em fluidos biológicos são o ELISA e radioimunoensaios (RIA),¹⁰⁸ sendo detalhados a seguir:

ELISA

A técnica ELISA é atualmente o método imunoenzimático mais utilizado para a quantificação de biomarcadores, sendo aplicada para a detecção de uma grande diversidade de proteínas, anticorpos ou até mesmo células inteiras. O ensaio pode ser realizado em diversos formatos, com o tipo sanduíche sendo o mais comum.

O método se baseia no uso de microplacas contendo Ab específicos para o analito desejado imobilizados, denominados Ab de captura. Para a realização do ensaio, primeiramente, incubam-se nas placas as amostras, seguida de lavagem com tampão. Em seguida, adiciona-se aos poços o anticorpo de detecção para que este se ligue à extremidade livre do antígeno. Após, repete-se a lavagem da placa. Como próximo passo, adiciona-se um conjugado enzima-anticorpo (tipicamente HRP – peroxidase de rábano; *horseradish peroxidase*) que se liga às porções constantes do anticorpo de detecção. Após a realização de etapas de lavagem, adiciona-se então o substrato da enzima. Caso a enzima utilizada seja HRP, esta etapa faz com que a amostra se torne azul. Por fim, adiciona-se um composto para interromper a reação enzimática, fazendo com que a solução adquira tons de amarelo. Estes variam em intensidade dependendo da concentração de analito na amostra. Por fim, a quantificação é realizada através de medidas de absorbância.

Para a quantificação exata da molécula de interesse, é essencial que se construa uma curva de calibração juntamente à cada batelada de amostras. O processo completo leva cerca de 4h para ser finalizado, requerendo cerca de 30 min para a manipulação dos reagentes.¹⁸⁷ Um esquema resumindo cada uma das etapas pode ser visto na Figura 2.2.

Figura 2.2 - Esquema ilustrando cada uma das etapas para a quantificação de analitos utilizando a técnica ELISA.

Fonte: Elaborada pela autora.

Radioimunoensaios

Os RIA são métodos que se baseiam no uso de compostos radioativos para a quantificação do analito de interesse de maneira extremamente sensível. No caso específico da melatonina, são usualmente utilizados o 2-I¹²⁵-iodomelatonina or ³H-melatonina como controles radioativos. Para a execução dos testes, estes compostos são primeiramente misturados à uma concentração fixa de Ab anti-melatonina. Em seguida, adiciona-se a amostra contendo a melatonina sem marcação, que compete com a melatonina radioativa, se ligando à parte dos Ab. Em seguida, a porção de melatonina livre é separada da ligada e a radioatividade da solução contendo os Ab é medida. Quanto maior a concentração de melatonina da amostra, menor a radioatividade.

Assim como na técnica ELISA, deve-se construir uma curva de calibração para cada batelada de experimentos. O processo completo leva cerca de 3 dias para ser realizado^{188,189} e um esquema ilustrando cada etapa da técnica pode ser visualizado na Figura 2.3.

Figura 2.3 - Esquema ilustrando as diferentes etapas envolvidas na técnica de radioimunoensaio.
Fonte: Elaborada pela autora.

Desvantagens das técnicas utilizadas atualmente

Apesar destes métodos serem capazes de detectar baixíssimos níveis do hormônio em amostras biológicas (LD na ordem de fmol/mL),¹⁹⁰ estes apresentam diversas desvantagens como o alto custo (cerca de US\$4,50 para a técnica de RIA¹⁹¹ e US\$8,28 para o ELISA,¹⁹² por teste realizado), demora na obtenção dos resultados, além de requerer pessoal e equipamento especializados para sua execução. Além disso, no caso de RIA, o pesquisador deve lidar com material radioativo, apresentando riscos à saúde e ao meio ambiente. Portanto, o desenvolvimento de ferramentas mais rápidas, simples e de baixo custo que requerem baixa ou nenhuma preparação de amostra são de grande interesse para a área médica.^{193,194}

2.1.6 Imunossensores eletroquímicos

Imunossensores eletroquímicos se apresentam como uma ótima opção para a quantificação rápida, simples e de baixo custo de uma grande diversidade de analitos. Estes se baseiam na mudança de propriedades eletroquímicas causadas pela interação do analito com Ab imobilizados na superfície eletrodos. Diversas técnicas podem ser utilizadas para monitorar a interação biológica, como a EIS e a VC por exemplo.

Espectroscopia de impedância eletroquímica

A técnica se baseia na perturbação da amostra pela aplicação de um potencial contínuo sobreposta por um sinal senoidal de baixa amplitude (mV), permitindo a investigação do sistema próximo ao estado de equilíbrio. A frequência do sinal senoidal pode variar em grandes intervalos (MHz a mHz), viabilizando a análise do sistema em diferentes condições.^{195,196} Devido à perturbação, surge uma corrente também de natureza senoidal. A partir da análise desta corrente pode-se obter diversos parâmetros do sistema estudado, como a impedância, a resistência de transferência de carga (R_{tc}) e a capacitância, permitindo o monitoramento preciso das interações biomoleculares. Vantagens da utilização de EIS incluem o fato de ser uma técnica não destrutiva, além de ser extremamente sensível e de rápida execução.

Tipicamente, ao analisarmos interações biológicas, obtém-se uma curva com formato semelhante ao exemplificado na Figura 2.4A. Cada um dos pontos apresentados no gráfico corresponde à uma frequência de medida distinta, sendo que os pontos mais próximos à origem possuem as maiores frequências. Observa-se que, na região de frequências mais altas, a curva possui o formato de um semi-círculo, cujo diâmetro está diretamente relacionado à R_{tc} do sistema, parâmetro fundamental para a análise das interações biológicas. Em geral, quanto mais material depositado sobre o eletrodo, maior a R_{tc} . Em frequências menores, observa-se que o gráfico toma o formato de uma reta com aproximadamente 45° de inclinação. Neste caso, a transferência de carga é regida pela difusão dos íons em solução.

Quando neste formato, os dados podem ser ajustados ao circuito equivalente de Randles, ilustrado na inserção da Figura 2.4B, que corresponde à um resistor R_s relacionado à resistência da solução acoplado em série à R_{tc} e ao elemento de Warburg (Z_w) – relacionado à difusão dos íons em solução. Os dois últimos, por sua vez, estão acoplados em paralelo com um capacitor C_{dl} que representa a capacitância da dupla camada elétrica – originada da separação de cargas na interface eletrodo/solução.

Figura 2.4 - A) Diagrama de Nyquist tipicamente obtido no monitoramento de interações biomoleculares utilizando EIS. B) Circuito equivalente de Randles, relacionado à curva em questão.
Fonte: Elaborada pela autora.

Voltametria cíclica

A VC é uma técnica eletroquímica baseada no monitoramento da corrente-resposta em uma janela de potenciais cíclicos. Em sensoriamento, esta é utilizada principalmente para a análise de reações de óxido-redução de compostos eletroativos. Porém, a técnica pode também ser utilizada para o monitoramento de interações biológicas através do uso de mediadores redox padrão, como o ferrocianeto de potássio. Através da intensidade da corrente dos picos de oxidação e/ou redução destes compostos pode-se inferir a presença de material sobre o eletrodo. No caso destes apresentarem propriedades isolantes, quanto menor a magnitude dos picos, maior a quantidade de material depositado. Este efeito ocorre devido à diminuição da taxa de reação na presença de material sobre o eletrodo. Voltamogramas cíclicos típicos relacionados à presença e à ausência do analito podem ser visualizados na Figura 2.5.

Figura 2.5 - Voltamogramas cíclicos típicos obtidos no monitoramento de interações biológicas utilizando o mediador redox ferrocianeto de potássio.
Fonte: Elaborada pela autora.

2.1.7 Sensores para melatonina descritos na literatura

Diversos sensores eletroquímicos para a detecção de melatonina podem ser encontrados na literatura. Por exemplo, Apetrei e Apetrei desenvolveram um dispositivo para a detecção de melatonina em fármacos baseado em grafeno.¹⁹⁷ O sistema apresentou boa performance, sendo capaz de realizar a quantificação do hormônio de maneira rápida e de baixo custo. Por sua vez, Tadayon e Sepehri desenvolveram um sensor eletroquímico baseado em grafeno dopado com nitrogênio e em nanopartículas CuCo_2O_4 para a determinação simultânea de dopamina, melatonina e triptofano.¹⁹⁸ O dispositivo apresentou baixos limites de detecção, sendo capaz de detectar melatonina em concentrações da ordem de nmol/L. Por fim, Kumar e Goyal desenvolveram um sensor baseado em nanopartículas de paládio para a detecção do hormônio.¹⁹⁹ O sensor foi capaz de quantificar melatonina em concentrações de 5-100 $\mu\text{mol/L}$, sendo aplicado com sucesso em formulações farmacêuticas e em amostras de urina humana.

Apesar dos dispositivos já descritos na literatura apresentarem boa performance, baixo custo e alta acessibilidade, a maior parte destes não é adequada à determinação de melatonina em amostras complexas - como sangue ou extratos de

tecidos. Isso é justificado pelo fato destes sensores serem baseados em compostos inorgânicos, os quais, na maioria das vezes, não apresentam alta especificidade para melatonina. Como amostras biológicas apresentam uma grande diversidade de moléculas, existe grande chance de haver interferência na resposta do dispositivo, prejudicando a quantificação precisa do hormônio.

Sendo assim, para a aplicação em amostras biológicas complexas, é imprescindível que o sensor apresente alta seletividade. Imunossensores são adequados para este fim devido à grande especificidade na interação antígeno-anticorpo.²⁰⁰ Nenhum imunossensor eletroquímico para melatonina foi encontrado em nossas buscas antes da publicação de nosso trabalho.

2.2 OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi o de desenvolver imunossensores eletroquímicos para a quantificação precisa e específica de melatonina através da imobilização de Ab em plataformas de óxido de estanho dopado com índio (ITO). Os eletrodos foram modificados com o auxílio dos agentes reticulantes (3-Aminopropil)triétoxissilano (APTES), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) e a melatonina foi detectada através do uso das técnicas de VC e EIS. Espera-se que o desenvolvimento destes sensores promova a quantificação simples e de baixo custo do composto, auxiliando no diagnóstico médico e no tratamento e monitoramento de doenças associadas às suas alterações.

2.2.1 Objetivos específicos

- Desenvolver um imunossensor eletroquímico para a quantificação precisa e de baixo custo de melatonina;
- Otimizar as etapas do desenvolvimento do dispositivo através do uso de amostras padrão;

- Caracterizar o sensor desenvolvido utilizando técnicas eletroquímicas, avaliando a estabilidade, repetibilidade, reprodutibilidade e especificidade fornecidas pelo dispositivo;
- Construir uma curva de calibração utilizando amostras padrão;
- Avaliar a performance do dispositivo em amostras biológicas;
- Comparar os resultados à técnica convencional ELISA.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Materiais

Ferrocianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$), metanol, APTES, BSA, EDC e NHS foram comprados da Sigma-Aldrich (Brasil). Anticorpos anti-melatonina foram adquiridos da Thermo Pierce (Brasil) e melatonina foi adquirida da Sigma Aldrich (Brasil). Eletrodos de ITO (Resistividade superficial = 8-12 Ω /sq, CG-51IN-1507) foram comprados da Delta Technologies (USA), modificados e usados como eletrodos de trabalho. Tampão fosfato (PB, 0,1 mol/L, pH 7,2) foi preparado usando fosfato de sódio monobásico e dibásico (Sigma Aldrich - Brasil). Tampão fosfato salino (PBS) foi preparado utilizando cloreto de potássio, cloreto de sódio, fosfato de sódio dibásico e fosfato de potássio monobásico (1x, pH 7,4) (Sigma Aldrich – Brasil). Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico. Água ultrapura foi obtida do sistema de purificação Mega UP (Mega Purity), com resistividade de 18,2 M Ω /cm.

2.3.2 Montagem dos biossensores

Eletrodos de ITO foram limpos através da imersão em acetona sob ultrassom por 10 min. O processo foi repetido utilizando álcool isopropílico, etanol e água ultrapura. Em seguida, os substratos foram imersos por 15 min em uma solução de H₂O: H₂O₂: NH₄OH 5:1:1 (v/v/v) à 80 °C. Por fim, os eletrodos foram enxaguados abundantemente com água ultrapura e secos utilizando um jato de N₂.

Ab anti-melatonina foram imobilizados na superfície dos substratos de maneira covalente (Figura 2.6). Inicialmente, os eletrodos de ITO foram imersos em uma solução de APTES (2% v/v, etanol) por 1h. Em seguida, foram enxaguados com PBS e imersos em uma solução de EDC-NHS/Ab (8 mmol/L, 5 mmol/L e 4 ng/ μ L respectivamente, PBS) por 1h. É importante que a solução de EDC-NHS/Ab seja preparada 2h antes da imersão do eletrodo, permitindo que os agentes reticulantes interajam com os grupos funcionais dos Ab. Os eletrodos foram então enxaguados com PBS e imersos em uma solução de BSA (1%, PBS, pH 7,4) por 30 min para o bloqueio de grupamentos funcionais ativos e de áreas livres dos eletrodos, evitando interações inespecíficas durante a detecção de melatonina. Em seguida, os eletrodos foram enxaguados usando PB, secos com N₂ e congelados em PBS (-10 °C). Os dispositivos podem ser congelados por até 30 dias sem perda de atividade. Para a detecção do hormônio, o biossensor foi imerso em soluções de melatonina por 1h30min (PBS, pH 7,4). As amostras foram mantidas no escuro, evitando a possível degradação do hormônio. Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente (25 °C).

Figura 2.6 - Esquema da configuração do biossensor Au-APTES-EDC/NHS-Ab. A) método de crescimento do filme fino. B) Ligações químicas estabelecidas no filme.

Fonte: Adaptada de BRAZACA et al.²⁰¹

2.3.3 Medidas eletroquímicas

Medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT 12 (Autolab, Metrohm, Suíça), em uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos. As plataformas de Ab/EDC-NHS/APTES/ITO foram usadas como eletrodos de trabalho (0,5 cm² de área geométrica), enquanto uma placa de platina (1 cm²) e um eletrodo de Ag/AgCl (solução interna de KCl, 3 mol/L) foram usados como contra eletrodo e eletrodo de referência, respectivamente. As medidas foram realizadas em 10 mL de uma solução de K₄[Fe(CN)₆] (4 mmol/L, PB), à temperatura ambiente (25 °C).

Medidas de VC foram realizadas no intervalo de -0,2 à 0,8 V (2 ciclos, 100 mV/s). Medidas de EIS foram realizadas em potencial de circuito aberto no intervalo de frequências de 10 kHz à 0,1 Hz, com amplitude de 10 mV. Todas as medidas foram realizadas três vezes por eletrodo, à temperatura ambiente (25 °C). O software FRA (*Frequency Response Analysis*) (Autolab, Metrohm, Suíça) foi utilizado para ajustar os circuitos equivalentes aos dados experimentais, retornando valores de R_{tc} utilizados para a quantificação de melatonina.

A curva de calibração foi obtida através da medida de valores de R_{tc} e de i_{ox} (intensidade do pico de corrente de oxidação) na faixa de concentrações de melatonina entre 0,75 e 7,5 µmol/L. O LD e o limite de quantificação (LQ) foram calculados utilizando as seguintes relações:

$$LD = \frac{3 \times SD_{tampão}}{s} \quad LQ = \frac{10 \times SD_{tampão}}{s}$$

sendo $SD_{tampão}$ o desvio padrão para três medidas em tampão e s a inclinação da curva de calibração.

Testes de reprodutibilidade foram realizados com três montagens paralelas igualmente construídas, e suas respostas foram testadas após a interação com 2,5 µmol/L de melatonina. Nos testes de repetibilidade, as respostas do biossensor foram investigadas sob medidas sucessivas, após a interação com 2,5 µmol/L de melatonina. Por fim, testes de estabilidade foram realizados através da submissão do eletrodo à 100 ciclos de VC.

2.3.4 Amostras biológicas

Amostras biológicas foram obtidas pelos pesquisadores e colaboradores da pesquisa, Dr. Sanseray da Silveira Cruz-Machado e Prof. Dra. Regina Pekelmann Markus. Resumidamente, Ratos adultos Wistar (machos, 10 semanas, 300–320 g) foram obtidos no biotério do departamento de fisiologia (IB-USP, São Paulo, Brasil), e foram mantidos sob um ciclo de 12/12h claro/escuro (LD, luzes às 07:00; Zeitgeber time 0 ou ZT0). Os animais receberam água e comida a vontade, e foram mortos por decaptação em ZT18. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética IB-USP (número de licença CEUA 198/2014, anexo I) e realizados de acordo com as leis brasileiras para o uso científico de animais (Lei Federal 11.794/2008).

Após a eutanásia, o fígado dos animais foi removido, congelado em gelo seco e pulverizado utilizando nitrogênio líquido e um almofariz. O material resultante foi diluído em metanol (100%, Sigma Aldrich – Brasil) na concentração de 500 mg/mL. As amostras foram vortexadas por 1 min e então centrifugadas à $4.500 \times g$ por 5 min, 4 °C. O metanol foi, em seguida, evaporado através do uso de um concentrador à vácuo (Eppendorf Vacufuge, Eppendorf, Alemanha) por aproximadamente 1 hora, à 45°C. O material seco foi ressuspendido em água ultrapura e melatonina sintética. Todas as concentrações preparadas foram diluídas de uma solução padrão de 100 $\mu\text{mol/L}$.

Para comparar a performance do sensor desenvolvido com a técnica utilizada atualmente, um kit ELISA (IBL International, Alemanha) foi utilizado para a quantificação de melatonina em amostras biológicas. O teste foi realizado de acordo com as instruções do fabricante e todas as amostras foram diluídas 10.000x para adequação à faixa linear do kit.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Estratégia de modificação dos eletrodos

Primeiramente estudou-se a estratégia de modificação dos eletrodos. A superfície do ITO possui grupamentos hidroxila disponíveis para modificação.²⁰² Ao adicionarmos o APTES, os grupos -OH presentes no ITO atacam os grupamentos alcóxi presentes no silano, formando uma ligação covalente com o substrato. Além disso, as moléculas de APTES formam ligações covalentes entre si a partir dos dois grupamentos alcóxi adicionais, formando uma rede única.^{202,203} Em seguida, os Ab são imobilizados covalentemente através do grupamento -NH₂ presente na extremidade livre do APTES. Para isso, utilizam-se os agentes reticulantes EDC-NHS. Ao misturarmos os reagentes EDC-NHS com os Ab, estes se ligam à grupamentos ácido carboxílicos presentes na biomolécula, formando um intermediário reativo à aminas secundárias. A interação entre estes complexos e grupamentos NH₂ presentes nos Ab irá formar uma rede destes componentes. Ao adicionarmos esta mistura ao substrato já modificado, os intermediários livres irão se ligar covalentemente através dos grupamentos -NH₂ disponíveis nas extremidades do APTES. Esta reação libera os agentes reticulantes em solução, ligando os Ab diretamente ao APTES.²⁰⁴ Por fim, BSA é utilizado para bloquear grupamentos funcionais livres, evitando interações inespecíficas durante a aplicação do sensor. Um esquema indicando detalhadamente cada uma das etapas de modificação do eletrodo pode ser visualizado na Figura 2.7.

Figura 2.7 - Esquema mostrando as ligações químicas envolvidas na construção do biossensor proposto.

Fonte: Elaborada pela autora. A estrutura da proteína BSA: NAIK; KOLLI; NANDIBEWOR.²⁰⁵

2.4.2 Avaliação eletroquímica da montagem do biossensor

Para verificar a eficiência de montagem dos eletrodos, medidas de EIS e VC foram realizadas após cada etapa de construção do sensor. Os resultados de EIS são mostrados na Figura 2.8. Substratos de ITO apresentaram uma R_{tc} de $535 \pm 40 \, \Omega$. Após a modificação da superfície com APTES, a R_{tc} diminuiu para $106 \pm 12 \, \Omega$, devido à protonação das moléculas na superfície do eletrodo. Em pH neutro, o APTES apresenta carga positiva ($pK_A=9,6^{206}$), atraindo o mediador eletroquímico ($[Fe(CN)_6]^{-4}$, negativamente carregado) à superfície do eletrodo. Após a camada de Ab/EDC-NHS ser adicionada ao filme, a R_{tc} aumentou para $488 \pm 10 \, \Omega$. A maior parte dos Ab é carregada positivamente²⁰⁷ e, portanto, atrai o mediador eletroquímico ao eletrodo. Porém, estes também apresentam grande volume molecular (150 kDa para IgG intacto²⁰⁰) evitando com que a transferência de elétrons ocorra com eficiência. Consequentemente, um aumento na R_{tc} é observado após a imobilização da camada Ab/EDC-NHS. Após o bloqueio da superfície utilizando BSA, a R_{tc} aumentou para 678 ± 47 devido aos impedimentos estéricos causados pela proteína (66 kDa²⁰⁸). Finalmente, após a incubação do imunossensor Ab/EDC-NHS/APTES/ITO em uma solução de melatonina ($1 \, \mu\text{mol/L}$) – que apresenta carga neutra sob condições biológicas²⁰⁹ – foi observado um aumento expressivo na R_{tc} para $4.050 \pm 333 \, \Omega$,

revelando boa afinidade entre antígeno-anticorpo e mostrando que o sensor montado é adequado para a detecção do composto.

Figura 2.8 - Diagramas de Nyquist mostrando cada etapa da funcionalização dos eletrodos. A) Resposta dos eletrodos de ITO (preto), APTES/ITO (vermelho), Ab/EDC-NHS/APTES/ITO (azul), BSA/Ab/EDC-NHS/APTES/ITO (rosa) e B) do sensor completo após a interação com 1 $\mu\text{mol/L}$ de melatonina (roxo). Medidas realizadas em PB na presença de 4 mmol/L $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Fonte: Adaptada de BRAZACA et al.²⁰¹

A avaliação do crescimento dos filmes utilizando VC gerou resultados análogos (Figura 2.9). Neste caso, um aumento na R_{tc} leva à uma diminuição de i_{ox} , assim como seu deslocamento à potenciais mais positivos. O eletrodo de ITO mostra um pico em $0,34 \pm 0,01$ V com uma corrente anódica de $0,204 \pm 0,009$ mA. Após a etapa de modificação com APTES, o pico deslocou para $0,319 \pm 0,008$ V, com um aumento de corrente para $0,312 \pm 0,009$ mA. A etapa de modificação com Ab/EDC-NHS revelou um pico em $0,373 \pm 0,008$ V, com um decréscimo na corrente anódica para $0,218 \pm 0,001$ mA. Após o bloqueio da superfície do sensor com BSA, o pico deslocou para $0,41 \pm 0,02$ V com um decréscimo de corrente para $0,185 \pm 0,009$ mA. Após a incubação do imunossensor Ab/EDC-NHS/APTES/ITO em uma solução de melatonina 1 $\mu\text{mol/L}$, foi observado um deslocamento do pico anódico do marcador eletroquímico para $0,538 \pm 0,008$ V, com um decréscimo na corrente para $0,112 \pm 0,007$ mA.

Figura 2.9 - Voltamogramas cíclicos obtidos em cada uma das etapas de montagem do eletrodo. As respostas dos eletrodos de ITO (preto), APTES-ITO (vermelho), Ab/EDC-NHS/APTES/ITO (azul), BSA/ab/EDC-NHS/ITO (rosa) e do sensor completo após a interação com 1 $\mu\text{mol/L}$ de melatonina (roxo) são mostradas. Medidas realizadas em PB na presença de 4 mmol/L $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Fonte: Adaptada de BRAZACA et al.²⁰¹

Para facilitar a visualização dos resultados, um gráfico foi montado mostrando lado a lado os valores de R_{tc} e i_{ox} para cada uma das etapas (Figura 2.10). Fica explícito que ambas as técnicas mostram resultados concordantes e que cada etapa da modificação dos eletrodos foi eficiente. Por fim, a grande diferença de sinal fornecida pelo sensor completo antes e depois da interação com melatonina mostram que este sistema é adequado para sua quantificação.

Figura 2.10 - Relação da R_{tc} e da i_{ox} com cada uma das etapas de montagem do biossensor estudado. Concentração de melatonina: 1 $\mu\text{mol/L}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

2.4.3 Otimização da montagem do biossensor

Após verificar que o imunossensor Ab/EDC-NHS/APTES/ITO era capaz de detectar melatonina de maneira eficiente, sua montagem foi otimizada para garantir uma maior sensibilidade e menor LD. A concentração e o tempo de imersão dos eletrodos na solução de cada um dos componentes foi cuidadosamente estudada. Primeiramente, os eletrodos de ITO foram colocados em contato com APTES (2% v/v) por 30, 60, 90, 120 e 150 min, tendo sua R_{tc} medida logo após estes períodos, na busca do menor valor (Figura 2.11A). Um valor médio de $16 \pm 3 \text{ k}\Omega$ foi obtido para os eletrodos imersos por 30 min na solução. Após 60 min, um decréscimo de aproximadamente $13 \text{ k}\Omega$ ocorreu ($R_{tc} = 3,2 \pm 0,7 \text{ k}\Omega$), comparado à medida de 30 min. Para períodos mais longos, R_{tc} permaneceu constante ($R_{tc} \sim 3 \text{ k}\Omega$). Portanto, 60 min foi o tempo escolhido para as montagens subsequentes.

A concentração de APTES foi também otimizada. Para isso, eletrodos de ITO foram imersos por 60 min em soluções de 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0% (v/v). A resposta dos eletrodos foi avaliada após a sua subsequente modificação com Ab/EDC-NHS e o contato com melatonina ($6 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$). Os resultados não apresentaram diferença significativa, sendo o valor de R_{tc} (médio) máximo obtido usando uma solução de 2% ($R_{tc} = 7 \pm 3 \text{ k}\Omega$), concentração que vinha sendo utilizada em estudos anteriores. Sendo assim, a concentração de 2% foi mantida para os experimentos subsequentes.

Em seguida, o tempo ideal para a interação entre os agentes reticulantes EDC/NHS e os Ab anti-melatonina foi avaliado. As moléculas foram misturadas 30, 60, 90, 120 e 150 min antes da funcionalização do eletrodo e valores de R_{tc} foram obtidos logo após a modificação dos eletrodos. O valor máximo de R_{tc} foi obtido após 120 min de contato entre as soluções ($602 \pm 18 \Omega$). Em seguida, a concentração dos Ab anti-melatonina foi variada de 1 a $5 \text{ ng}/\mu\text{L}$, mantendo a concentração de EDC/NHS constante e em excesso. A R_{tc} foi avaliada usando EIS após a interação do imunossensor com $6 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ de melatonina (Figura 2.11B). Pode ser observado que um valor máximo de R_{tc} foi obtido com o uso de Ab anti-melatonina na concentração de $4 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ($5.991 \pm 157 \Omega$). Possivelmente concentrações mais altas formam filmes mais densos, dificultando a interação adequada com o hormônio.

Em seguida, o tempo de imobilização dos complexos EDC/NHS/Ab nas superfícies modificadas foi testado. Estes compostos foram colocados em contato por 30, 60, 120 e 150 min (Figura 2.11C). Após um tempo de imersão de 60 min, os valores de R_{tc} se tornaram constantes ($1.971 \pm 172 \Omega$). Portanto, 60 min foi o tempo escolhido para os estudos subsequentes.

Por fim, o tempo ideal para a interação do biosensor com melatonina foi avaliado. O biossensor foi imerso em uma solução de melatonina ($6 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$) por 30, 60, 90, 120 e 150 min (Figura 2.11D). Observou-se um aumento gradual na R_{tc} , que atingiu valores constantes após 90 min. Portanto, este foi o tempo escolhido.

Figura 2.11 - Otimização do processo de montagem do biossensor. A) Estudo do tempo de imersão dos eletrodos de ITO em uma solução de APTES (2% v/v). B) Estudo da concentração ideal de Ab, mantendo a quantidade de EDC-NHS constante (8 mmol/L, 5 mmol/L respectivamente) e o tempo de interação de 2h; C) Avaliação do tempo de interação da plataforma de ITO com a solução de Ab/EDC-NHS (4 ng/ μL , 8 mmol/L e 5 mmol/L, respectivamente); D) Tempo de interação do sensor e de melatonina. Todas as medidas foram realizadas em PB na presença de 4 mmol/L $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Fonte: Adaptada de BRAZACA et al.²⁰¹

2.4.4 Detecção de melatonina em amostras padrão

A resposta do imunossensor Ab/EDC-NHS/APTES/ITO foi então testada em soluções contendo diferentes concentrações de melatonina (0,75 à 7,5 $\mu\text{mol/L}$) utilizando as técnicas de EIS e VC. Na técnica de EIS, o biossensor apresentou um aumento da R_{tc} linearmente proporcional à concentração de melatonina ($R^2=0,989$) (Figura 2.12). Este resultado era esperado, já que um aumento na concentração do hormônio leva à deposição de uma maior quantidade de material neutro na superfície do eletrodo, fazendo com que seja mais difícil que elétrons atinjam a superfície do ITO. A regressão linear mostra que a resposta dos eletrodos segue a equação $R_{tc} = (3.542 \pm 197) + (245 \pm 45) [\text{melatonina}] (\mu\text{mol/L})$, com uma sensibilidade de $4,91 \times 10^2 \Omega \text{ L}/\mu\text{mol cm}^2$. O LD obtido foi de 0,175 $\mu\text{mol/L}$, enquanto o LQ foi calculado em 0,583 $\mu\text{mol/L}$.

Figura 2.12 - Curva analítica para concentrações de melatonina entre 0,75 e 7,50 $\mu\text{mol/L}$ utilizando a técnica de EIS. A) Diagramas de Nyquist; B) Regressão linear mostrando o aumento na R_{tc} em maiores concentrações do hormônio. Medidas realizadas em PB na presença de 4mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Fonte: Adaptada de BRAZACA et al.²⁰¹

Usando VC, uma curva de calibração com comportamento correspondente foi obtida (Figura 2.13). Neste caso, a intensidade do pico de oxidação do marcador eletroquímico $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ decresce proporcionalmente ($R^2=0,953$) com a concentração de melatonina, seguindo a equação $i_{ox} = (1,15 \pm 0,03) \times 10^{-4} - (3,61 \pm 0,7) \times 10^{-6} [\text{melatonina}] (\mu\text{mol/L})$. A sensibilidade foi calculada em $-7,23 \times 10^{-6} \text{ A.L}/\mu\text{mol.cm}^2$ com um LD de 0,154 $\mu\text{mol/L}$ e um LQ de 0,513 $\mu\text{mol/L}$.

Figura 2.13 - Curva analítica para concentrações de melatonina entre 0,75 e 7,50 µmol/L utilizando a técnica de VC. A) Voltamogramas cíclicos. B) Regressão linear. Neste caso, i_{ox} diminui com o aumento na concentração do hormônio. Medidas realizadas em PB na presença de 4 mmol/L $K_4[Fe(CN)_6]$.

Fonte: Adaptada de BRAZACA et al.²⁰¹

Sendo assim, a melatonina pode ser quantificada na faixa de concentrações estudada (0,75 a 7,5 µmol/L) com boa sensibilidade por ambas as técnicas, pois apresentaram limites de detecção e quantificação semelhantes. A técnica de EIS se destacou por mostrar um coeficiente de correlação linear significativamente maior do que a técnica de VC ($R^2 = 0,989$ e $0,953$, respectivamente).

2.4.5 Caracterização eletroquímica do sensor

A caracterização eletroquímica dos eletrodos modificados Ab/EDC-NHS/APTES/ITO mostrou que estes são extremamente estáveis sob sucessivos ciclos de VC (Figura 2.14A), apresentando uma variação de 6,71% na i_{ox} em 100 ciclos (melatonina 2,5 µmol/L em PB). Para verificar a aplicabilidade dos dispositivos em análises clínicas, a estabilidade de armazenamento do biossensor também foi avaliada. Os dispositivos foram congelados em -10 °C por até 2 meses. Observa-se que após 1 mês os biossensores Ab/EDC-NHS/APTES/ITO ainda apresentaram respostas adequadas à 2,5 µmol/L melatonina (Figura 2.14B).

Figura 2.14 - A) A estabilidade do biossensor foi avaliada através da realização de 100 ciclos de VC; B) Estabilidade no tempo para os sensores desenvolvidos. Os dispositivos contendo Ab/EDC-NHS/APTES/ITO foram congelados em -10°C por 15, 30 e 60 dias. O biossensor apresentou respostas adequadas à $2,5\text{ }\mu\text{mol/L}$ de melatonina até 30 dias após o congelamento; C) Diversas medidas foram realizadas de maneira subsequente para avaliar a repetibilidade dos dispositivos. Bons valores foram obtidos para os dispositivos baseados em EIS (23,6% em 12 medidas) D) e em VC (1,81% em 18 medidas). Todas as medidas foram realizadas em PB na presença de $4\text{ mmol/L K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Fonte: Adaptada de BRAZACA et al.²⁰¹

Testes de reprodutibilidade utilizando a técnica de EIS apresentaram uma diferença de 3,45% no R_{tc} em 3 montagens paralelas, enquanto a técnica de VC mostrou uma diferença de 2,87% em i_{ox} . Os valores mostram boa reprodutibilidade por ambas as técnicas.

Em testes de repetibilidade, foi observada uma variação de 1,81% em i_{ox} após 18 medidas utilizando a técnica de VC e uma variação de 23,6% em R_{tc} após 12 medidas para a técnica de EIS (Figura 2.14C,D). Apesar dos bons resultados para a repetibilidade do sensor, é importante notar que os dispositivos foram desenvolvidos visando o uso médico e devem ser descartados após um único uso.

Considerando que ambas as técnicas apresentaram resultados satisfatórios nos parâmetros estudados, a técnica de EIS foi escolhida para a continuidade dos estudos devido ao seu melhor desempenho na calibração do sistema.

2.4.6 Reatividade cruzada

Considerando que o Ab anti-melatonina pode apresentar reatividade cruzada com alguns de seus metabólitos intermediários, avaliamos a interação do sensor desenvolvido com duas destas biomoléculas: a NAS e o complexo 5-Hidroxitriptamina creatinina sulfato (C5-HT). A estrutura de cada uma das moléculas pode ser observada na Figura 2.15. Medidas de EIS mostraram que tanto a NAS quanto o C5-HT apresentam baixos níveis de interação com os Ab anti-melatonina, com sinais 85,43 e 78,43% mais baixos do que os obtidos pela melatonina nas mesmas concentrações (2,5 $\mu\text{mol/L}$), respectivamente (Figura 2.16). Além disso, a NAS é usualmente encontrada em concentrações 10 vezes mais baixas do que melatonina em plasma²¹⁰ e, portanto, não é considerado um potencial interferente à nosso sistema. Não foram encontrados dados representativos para a concentração de C5-HT em plasma.

Figura 2.15 - Estrutura das moléculas estudadas no teste de reatividade cruzada. A) Melatonina; B) NAS; C) Complexo C5-HT.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 2.16 - Estudos de interferentes foram realizados utilizando NAS e C5-HT (2,5 $\mu\text{mol/L}$). NAS, C5-HT e PBS apresentaram R_{tc} mais baixa quando comparados à melatonina na mesma concentração. Medidas realizadas em PB na presença de 4 mmol/L $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Fonte: Adaptada de BRAZACA et al.²⁰¹

2.4.7 Curva de calibração em amostras biológicas

Em seguida, testou-se a aplicabilidade do sensor em amostras biológicas. Para isso, amostras de extrato de fígado de rato foram utilizadas devido à presença de altas concentrações do hormônio neste órgão.^{211,212} Como a concentração obtida pela extração destes tecidos ainda é mais baixa do que o LD do sensor desenvolvido, adicionou-se melatonina sintética às amostras nas concentrações de 0; 0,8; 1,5; 3,0; 5,0 e 7,0 $\mu\text{mol/L}$.

O primeiro passo para a quantificação de melatonina em amostras biológicas consistiu na construção de uma nova curva de calibração utilizando EIS. Observa-se que esta apresenta, em geral, o mesmo comportamento da curva obtida em condições ideais (Figura 2.17). A reta apresentou boa linearidade ($R^2=0,995$) na faixa de concentrações de melatonina de 0,0 à 7,0 $\mu\text{mol/L}$, com sensibilidade de $1,34 \times 10^3 \Omega \cdot \text{L} / \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^2$. A equação obtida através da regressão linear mostra que o sensor segue a relação $R_{tc} = (852 \pm 97) + (673 \pm 80) [\text{melatonina}] (\mu\text{mol/L})$, tendo seus LD e LOQ calculados como 0,222 e 0,741 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. Os sensores apresentaram boa reprodutibilidade (4,69% para 3 montagens paralelas, 1,5 $\mu\text{mol/L}$ melatonina), mostrando-se adequados para a quantificação do hormônio em amostras biológicas.

Figura 2.17 - Curva analítica da melatonina em extrato de fígado de rato construídas utilizando EIS e concentrações do hormônio entre 0,0 e 7,0 $\mu\text{mol/L}$. A) Diagramas de Nyquist; B) Regressão linear mostrado o aumento na R_{tc} com o aumento na concentração de melatonina. Experimentos realizados em PB contendo 4 mmol/L $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Fonte: Adaptada de BRAZACA et al.²⁰¹

2.4.8 Comparação da performance do sensor para quantificação de melatonina em amostras biológicas utilizando a técnica ELISA

Após a construção da curva analítica em amostras biológicas, esta foi utilizada para determinar a concentração de 12 amostras independentes. Um resumo dos resultados pode ser visualizado na Tabela 2.1. Observa-se que as concentrações determinadas pelo sensor estão em boa concordância com os resultados esperados, apresentando um desvio médio de 13,31%.

Tabela 2.1 - Sumário do resultado da quantificação de melatonina utilizando o sensor Ab/EDC-NHS/APTES/ITO em extrato de fígado.

Concentração esperada de melatonina ($\mu\text{mol/L}$)	Concentração de melatonina	
	obtida usando o sensor Ab/EDC-NHS/APTES/ITO ($\mu\text{mol/L}$)	% relativa à concentração esperada
0,0	$0,0 \pm 0,1$	--
0,8	$0,8 \pm 0,2$	100,00
0,8	$1,0 \pm 0,3$	125,00
1,5	$1,9 \pm 0,4$	126,67
1,5	$1,5 \pm 0,3$	100,00
1,5	$1,8 \pm 0,4$	120,00
1,5	$1,3 \pm 0,3$	86,67
1,5	$1,3 \pm 0,3$	86,67
3,0	$2,8 \pm 0,5$	93,33
3,0	$3,9 \pm 0,6$	130,00
5,0	$4,5 \pm 0,7$	90,00
7,0	$6,9 \pm 0,9$	98,57

Fonte: Adaptada de BRAZACA et al.²⁰¹

A fim de comparar o desempenho da técnica desenvolvida com os métodos atualmente aplicados, as amostras biológicas foram também avaliadas utilizando a técnica ELISA. Um resumo dos resultados pode ser encontrado na Tabela 2.2. Novamente, os resultados se encontram de acordo com o esperado, sendo que o desvio médio para 6 amostras foi de 16,27% - ligeiramente maior do que o apresentado pelo nosso sensor. Sendo assim, ambas as técnicas se mostraram adequadas à quantificação de melatonina em amostras biológicas, apresentando desempenho semelhante.

Tabela 2.2 - Resumo dos resultados da quantificação dos extratos de fígado usando a técnica ELISA. Erros foram calculados usando os máximos desvios nas porcentagens de recuperação apresentadas no manual do kit pelo fabricante (25%).²¹³

Concentração esperada de melatonina (μmol/L)	Concentração de melatonina obtida utilizando o kit ELISA (μmol/L)	% relativa à concentração esperada
0,0	0	--
0,8	0	--
1,5	1,1 ± 0,3	73,33
3,0	2,8 ± 0,7	93,33
3,0	3,3 ± 0,8	110,00
5,0	4 ± 1	80,00
5,0	4 ± 1	80,00
7,0	8 ± 2	114,29

Fonte: Adaptada de BRAZACA et al.²⁰¹

Apesar de ambos os métodos testados terem apresentado performance semelhante, o sensor desenvolvido apresenta diversas vantagens frente à técnica ELISA. Primeiramente, o preço por teste. Uma estimativa de custos foi realizada para comparar o valor gasto para realizar um único teste utilizando nosso dispositivo com a técnica ELISA. Para isso, o preço de cada produto utilizado para construir o sensor foi avaliado individualmente (Tabela 2.3). O preço total para a análise de uma única amostra (US\$ 1,66) é cerca de 5x menor do que a técnica ELISA (US\$ 8,28 por teste, US\$ 795,00 por 96 testes¹⁹²). Acreditamos que o baixo custo dos dispositivos seja possível principalmente devido ao formato direto do teste – evitando assim a necessidade de reagentes biológicos adicionais, os quais são usualmente de alto custo.

Outras vantagens do dispositivo desenvolvido frente à técnica usual incluem o tempo total de análise. Enquanto testes ELISA levam cerca de 6h para serem realizados,^{214,215} o sensor aqui apresentado é capaz de gerar resultados em 1h40min. Além disso, o tempo de manipulação é também significativamente menor. Nosso

sensor requer que o usuário atue por somente 5 min, enquanto a técnica ELISA requer cerca de 30 min devido aos diversos passos envolvidos no teste. Outra desvantagem da técnica ELISA, se comparada à nosso sensor, é o fato de necessitar de diversos reagentes para sua execução. Enquanto nosso sensor requer somente a solução de medida para a realização do ensaio – que é composto de um composto químico estável – a ELISA requer Ab secundários marcados com enzimas e seu substrato. Estes são reagentes biológicos, que podem sofrer degradação e instabilidades. Portanto, apesar de nosso sensor agir em concentrações mais altas (sensor desenvolvido: 0,75 a 7,5 $\mu\text{mol/L}$; ELISA 0,6 fmol/L – 4 pmol/L²¹⁶), apresenta diversas vantagens incluindo o preço, tempo e estabilidade dos reagentes. Além disso, o sensor pode ser utilizado em conjunto com técnicas de concentração de biomoléculas, permitindo que as amostras biológicas sejam lidas diretamente no dispositivo.

Portanto, o sensor aqui apresentado mostrou performance semelhante quando comparado ao ELISA, tendo as vantagens de requerer menos preparação de amostra, além de ser mais simples e mais barato do que os métodos existentes.

Tabela 2.3 - Estimativa de preços para a construção dos sensores.

Componente	Quantidade na embalagem original	Preço do produto original (US\$)	Quantidade utilizada em um único teste	Preço de um único teste (US\$)	Referência
ITO	6,25 mm ²	8,80	0,5 mm ²	0,704	217
APTES	100 mL	72,60	5 µL	0,004	218
EDC	1 g	62,50	0,3834 mg	0,024	219
NHS	5 g	17,60	0,144 mg	0,001	220
Ab	5 mg	791,82	80 ng	0,013	Cotação pessoal ²²¹
BSA	100 g	371,00	0,0025 g	0,009	208
Funcionário	1 h; 100 eletrodos/dia	10,00	1 unidade	0,800	222
Instalações	1 mês; 2300 u/mês	250,00	1 unidade	0,108	Valores típicos (São Carlos/São Paulo)
Total		\$1,663			

Fonte: Adaptada de BRAZACA et al.²⁰¹

2.4.9 Comparação entre o sensor desenvolvido e plataformas da literatura

Por fim, realizamos uma revisão da literatura, comparando a performance de diversos sensores de melatonina com o dispositivo desenvolvido neste trabalho. Um resumo dos resultados pode ser visto na Tabela 2.4. Primeiramente, é importante notar que todos os sensores encontrados são baseados em compostos inorgânicos. Sendo assim, de acordo com nosso conhecimento, este é o primeiro imunossensor publicado para a quantificação de melatonina.

Observa-se que a maior parte dos dispositivos desenvolvidos apresenta limites de detecção mais baixos do que os aqui apresentados, atuando muitas vezes em faixas de concentrações mais amplas. Isso se dá devido à alta estabilidade e à alta

taxa de catálise fornecida por diversos compostos inorgânicos em aplicações eletroquímicas. O uso de materiais biológicos, porém, apresenta diversas vantagens, sendo a principal delas a especificidade do sensor. Como exemplificado em resultados de seções anteriores (**2.4.6 Reatividade cruzada**), Ab são capazes de diferenciar compostos com extrema semelhança estrutural, garantindo a quantificação precisa dos analitos. Compostos inorgânicos, por outro lado, realizam a catálise de um grupo de moléculas – sendo mais suscetíveis à interferentes. Sendo assim, a análise de amostras biológicas complexas, como no caso de plasma, é extremamente difícil com este tipo de sensor, requerendo muitas vezes etapas adicionais de purificação. Sendo assim, o sensor aqui desenvolvido é mais adequado para este fim.

Tabela 2.4 - Revisão da literatura de sensores de melatonina e comparação com o sensor Ab/EDC-NHS/APTES/ITO desenvolvido neste trabalho.

Preparação farmacêutica e urina humana	Extrato de órgão de camundongo	PBS	Amostra
PdNPs	Ab/EDC-NHS/APTES/ITO		Eletrodo
0,1235 $\mu\text{A.L}/\mu\text{mol}$	$1,34 \times 10^3 \text{ohm.L}/\mu\text{mol} \cdot \text{cm}^2$	EIS $4,91 \times 10^2 \text{ohm.L}/\mu\text{mol} \cdot \text{cm}^2$; VC $7,23 \times 10^{-6} \text{A.L}/\mu\text{mol} \cdot \text{cm}^2$	Sensibilidade
2,73	4,69	EIS: 3,45; VC: 2,87	Reprodutibilidade (%)
0,09	0,222	EIS: 0,175; VC 0,154	LD ($\mu\text{mol/L}$)
-	0,741	EIS: 0,583; VC 0,513	LOQ ($\mu\text{mol/L}$)
5-100	0.0 – 7,0	0,75 – 7,50	LDR ($\mu\text{mol/L}$)
¹⁹⁹	Este trabalho		Ref

continua

continuação

Preparação farmacêutica e urina humana	Preparação farmacêutica e urina humana	Preparação farmacêutica e urina humana	PBS (pH 7.5)	Preparação farmacêutica e urina humana	Preparações farmacêuticas
Compósito de grafeno e co-polímero	Grafeno/ CuCo ₂ O ₄ dopado com nitrogênio	Eletropolímero molecularmente impresso	Eletrodo iônico líquido de carbono	Eletrodo de diamante dopado com boro	Eletrodo de carbono revestido com grafeno
-	-	-	-	-	0,0371 A.L/mol
1,3	3,5	-	-	2,06	-
0,0060	0,0049	0,00001	0,004	11,0	0,87
-	-	-	-	0,37	2,91
0,05-100	0,010-3,0	0,0001-0,05	0,01-50	4-50	1-300
226	198	225	224	223	197

Fonte: Elaborada pela autora.

2.5 CONCLUSÕES

Desenvolvemos um imunossensor eletroquímico de baixo custo, simples e eficiente para a quantificação de melatonina. O dispositivo apresentou uma resposta linear em concentrações de melatonina entre 0,75 e 7,5 $\mu\text{mol/L}$ usando tanto a técnica de EIS ($R^2=0,989$) quanto VC ($R^2=0,953$). Além disso, apresentou boa estabilidade (6,71%, 100 ciclos) e reprodutibilidade (EIS 3,45%; VC 2,87%, $n=3$) em amostras padrão. Os dispositivos desenvolvidos foram também testados em amostras biológicas compostas de extrato de fígado de rato enriquecidos com melatonina. Neste caso, os sensores apresentaram uma resposta linear na faixa de concentrações entre 0,0 e 7,0 $\mu\text{mol/L}$ do hormônio, com boa reprodutibilidade (4,69%, $n=3$). Por fim, os dispositivos apresentaram boa precisão em testes de adição e recuperação, apresentando um desvio médio de 13,31% ($n=12$) da concentração esperada, com resultados semelhantes à técnica padrão ELISA (16,27%, $n=7$), com a vantagem de produzir resultados mais rápidos e apresentando menor custo. Esperamos assim que os biossensores desenvolvidos levem à testes de quantificação de melatonina mais acessíveis, permitindo o diagnóstico e acompanhamento de um maior número de pacientes.

2.6 PUBLICAÇÕES RELACIONADAS

Os resultados apresentados neste capítulo foram publicados em Brazaca, L. C.; Bramorski, C. B.; Cancino-Bernardi, J.; da Silveira Cruz-Machado, S.; Markus, R. P.; Janegitz, B. C.; Zucolotto, V. An antibody-based platform for melatonin quantification. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 171, p. 94-100, 2018.

O trabalho gerou também uma patente, depositada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), com o número de registro BR1020170198251 como privilégio de inovação. Título: “Processo para obtenção de um imunossensor eletroquímico, imunossensor eletroquímico e usos do mesmo”. Depositante: Universidade de São Paulo; Inventores: Brazaca, L. C.; Bramorski, C. B.; Cancino-Bernardi, J.; da Silveira Cruz-Machado, S.; Markus, R. P.; Janegitz, B. C.; Zucolotto, V. Data de depósito: 15/09/2017.

3 CAPÍTULO III: GENOSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA O DIAGNÓSTICO E A DETERMINAÇÃO DO TRAÇO DE ANEMIA FALCIFORME

3.1 INTRODUÇÃO

3.1.1 A anemia falciforme

A anemia falciforme é a doença hereditária mais comum no mundo, com 5-40% da população do oeste, centro e leste da África apresentando seu traço genético.²²⁷⁻²²⁹ No Brasil também é a doença hereditária de maior prevalência,²³⁰ afetando mais de 25 mil pessoas e com 7,2 milhões apresentando seu traço.²³¹ Esta é um sério problema para os sistemas de saúde, já que é dificilmente curável e uma causa majoritária de morte de jovens crianças.²³²

A anemia falciforme é uma doença genética recessiva que afeta a hemoglobina, proteína essencial para a oxigenação de nosso organismo. Esta é formada de 4 subunidades – sendo duas cadeias β e duas cadeias α , idênticas entre si – apresentando uma massa molecular total de 64,5 kDa. Cada uma destas subunidades possui um arranjo de α -hélices que cercam e se ligam à um grupo prostético heme. O átomo de ferro presente neste, por sua vez, é essencial para o transporte de gases pelo sangue, sendo capaz de se ligar de maneira reversível ao oxigênio, ao monóxido de carbono e ao óxido nítrico, por exemplo.²³³ A hemoglobina se encontra presente em altíssimas concentrações nos eritrócitos (cerca de 30 g/dL), o que permite que esta célula atue com grande eficiência em sua principal função: a oxigenação do organismo.²³⁴ Porém, as altas concentrações da proteína podem também agravar diversos males – como no caso da anemia falciforme, detalhado a seguir.

A doença é causada, geneticamente, pela substituição de uma única base nitrogenada na posição 6 do gene da beta globina (GAG→GTG), codificando valina ao invés de ácido glutâmico.²³⁵⁻²³⁷ Esta mudança faz com que a célula produza uma forma anormal da hemoglobina, denominada hemoglobina S (HbS), a qual substitui a proteína normal – chamada de hemoglobina A (HbA).²³⁸ As substituições ocorrem na superfície da molécula e não provocam alterações significativas na conformação

global das proteínas.²³⁴ Porém, quando desoxigenada, a HbS forma polímeros e se torna insolúvel devido à presença de contatos intermoleculares que não existem na HbA.²³⁰ Estes polímeros, por sua vez, se agregam e deformam as células, fazendo com que estas assumam a forma de uma foice.²³⁹ Se a membrana celular não for significativamente danificada no processo, este fenômeno é reversível por oxigenação.²⁴⁰ Caso as membranas celulares tenham sido gravemente lesionadas, mesmo após a reoxigenação e a despolimerização da HbS, as células continuam rígidas e com formato anormal, fazendo com que sejam destruídas pelo sistema imune.^{230,234} Além disso, este ciclo diminui o tempo de vida das hemácias, agravando a anemia.^{235,238,241}

Apesar da diminuição expressiva do número de hemácias viáveis corresponder à um sério problema de saúde, as complicações mais graves da anemia falciforme advém do fato de que o formato de foice adquirido pelas hemácias doentes não permite com que estas transitem de maneira adequada no sistema circulatório. Desta maneira, os pacientes estão sujeitos à “crises de falcização”, sendo as mais comuns causadas pela lesão de tecidos devido à inflamação e obstrução vascular.

O processo se inicia com a aderência de eritrócitos doentes ao endotélio, causando danos às paredes dos vasos sanguíneos e induzindo uma resposta inflamatória. Este processo, que envolve interações entre hemácias, plaquetas, células endoteliais, proteínas plasmáticas e leucócitos, pode reduzir o fluxo sanguíneo e promover a vaso-oclusão, causando lesões à qualquer órgão do corpo²³⁴ (Figura 3.1). Atualmente acredita-se que o fenômeno é desencadeado principalmente pela adesão de leucócitos (em especial neutrófilos) à parede dos vasos, atraídos pela presença das células falcizadas. Estes são grandes (cerca de 15 μm) e relativamente rígidos, podendo auxiliar na adesão de outros componentes. Além disso, plaquetas também agravam o processo de vaso-oclusão pela liberação de potentes inflamatórios. Devido à inflamação dos vasos sanguíneos, diversas moléculas anti-inflamatórias apresentam elevados níveis em anemia falciforme, incluindo o Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α), Interleucina 1- β (IL-1 β) e a proteína C reativa. Nos períodos entre crises os pacientes são assintomáticos, com a ressalva da presença de anemia persistente.²³⁴

Figura 3.1 - Esquema mostrando o processo de vaso-oclusão ocorrido na anemia falciforme.
 Fonte: Adaptada de COSTA; CONRAN; FERTRIN.²³⁴

É interessante mencionar que o óxido nítrico, gás sinalizador produzido pelas células endoteliais, também apresenta um importante papel nas crises de falcização. Na anemia falciforme, devido ao consumo de NO pela hemoglobina livre liberada pelas hemácias hemolizadas, há uma redução da biodisponibilidade do gás. Este fenômeno causa a vasoconstrição, que favorece a vaso-oclusão.²³⁴

Sintomas da anemia falciforme

Além da anemia constante, o fenômeno mais comum à pacientes com anemia falciforme, já citado anteriormente, são as crises de falcização. Estas são manifestações agudas, que podem ser classificadas como crises vaso-oclusivas, crises aplásticas, hemolíticas ou de sequestro esplênico. Praticamente todos os órgãos do corpo humano podem ser afetados por estes fenômenos, que começam a acontecer, em geral, após os 6 meses de idade.

- Crises vaso-oclusivas: são as mais comuns, e extremamente dolorosas, podendo ser desencadeadas por infecção, desidratação ou tensão emocional, por exemplo. As crises podem ser fatais, sendo mais comuns entre pacientes de 30-50 anos.

- Crises aplásticas: neste caso observa-se uma acentuada queda nos níveis de hemoglobina e de reticulócitos (hemácias imaturas), levando à deficiências passageiras no processo de produção das células vermelhas. É usualmente observado em crianças, sendo desencadeado por infecção.

- Crises de sequestro esplênico: são caracterizadas por um acúmulo rápido de sangue no baço, causando queda nos níveis basais de hemoglobina, hiperplasia da medula óssea e aumento do baço. Ocorre em crianças de 6 meses até 2 anos, sendo responsável pelas altas taxas de mortalidade infantil relacionadas à doença (10-15%).

- Crises hemolíticas: são raras e relacionadas ao aumento expressivo da taxa de hemólise, causando o agravamento da anemia e acentuação da icterícia.

A principal causa de mortalidade dos pacientes com anemia falciforme, porém, vem da sua maior susceptibilidade à infecções, sendo a maior parte delas bacterianas. As causas deste fator ainda não são completamente conhecidas, mas é sabido que as diversas lesões causadas pela doença e o mal funcionamento do baço possuem importante papel na diminuição da imunidade dos pacientes. Além disso, outros fatores possivelmente contribuem para este aspecto, incluindo a alteração na atividade de vias de leucócitos, defeitos imunes e a deficiências de opsoninas séricas, as quais agem como facilitadoras da ligação na fagocitose.²³⁴

Além dos sintomas já citados, os pacientes com anemia falciforme costumam apresentar complicações cardíacas, pulmonares, neurológicas, hepatobiliares, oftalmológicas e reprodutivas, incluindo infartos pulmonares, acidente vascular cerebral e o comprometimento crônico de múltiplos órgãos.^{234,242}

Tratamento e cura

Pacientes que sofrem de anemia falciforme devem ser acompanhados regularmente por equipes especializadas e, idealmente, multidisciplinares – incluindo médicos, psicólogos, enfermeiros, assistentes sociais e fisioterapeutas.

Uma das principais funções do apoio médico é o tratamento imediato de fatores relacionados à doença. O tratamento das crises vaso-oclusivas, por exemplo, é extremamente difícil, variando com a intensidade da dor do paciente e a presença de outras complicações. Usualmente, trata-se o fator desencadeante (por exemplo uma infecção), e administra-se analgésicos e água.

Além do apoio imediato, necessário nas situações de crise, algumas estratégias permitem a manutenção da doença à longo prazo. Uma delas é a administração de medicamentos que podem, por exemplo, aumentar a síntese de hemoglobina fetal (HbF) - a qual inibe a polimerização da HbS. Diversos medicamentos são capazes de aumentar a produção de HbF, incluindo a hidroxureia (HU), 5-azacitina e os derivados do butirato. O acompanhamento de pacientes com anemia falciforme visa também à diminuição na taxa de infecções através da imunização adequada dos pacientes e da administração profilática de penicilina, por exemplo.

Infelizmente procedimentos que sejam capazes de curar a doença com sucesso são extremamente raros e se limitam ao transplante de células tronco hematopoiéticas aparentadas, sendo que este é de alto risco e é realizado somente em casos extremamente graves. O tratamento e a possível cura têm sido conduzidos pelo desenvolvimento de terapias gênicas, pelo aprimoramento das técnicas de transplante de medula em adultos e o uso de fontes alternativas de células progenitoras (por exemplo, sangue de cordão umbilical e doador não aparentado).²³⁴

3.1.2 O traço genético da anemia falciforme

Como citado anteriormente, a anemia falciforme apresenta caráter recessivo. Enquanto indivíduos homozigotos (SS) são gravemente afetados pela doença, heterozigotos (AS) são usualmente assintomáticos.²³⁵ Isso ocorre porque a

concentração de HbS nestes indivíduos é usualmente inferior à 50%, fazendo com que a polimerização da proteína não ocorra em condições normais do organismo.²³⁴ Sendo assim, seus portadores não necessitam de acompanhamento médico ou de tratamento.

Apesar de indivíduos AS não apresentarem as usuais complicações relacionadas à anemia falciforme, estes são capazes de gerar descendentes portadores da forma mais grave da doença - sendo que um casal de heterozigotos apresenta uma chance de 25% de gerar uma criança homozigota.²³⁵ Como a doença é grave e apresenta tratamentos limitados, o aconselhamento genético se mostra como importante ferramenta para a manutenção e controle desta.

O aconselhamento genético corresponde à identificação e à orientação dos carregadores do traço de certas doenças genéticas principalmente em relação à decisões que envolvem a reprodução.²³⁰ Neste processo, os indivíduos são conscientizados dos possíveis problemas que seus descendentes podem apresentar, mas nunca privados do seu direito de reprodução. São discutidos aspectos como tratamentos disponíveis, o grau de sofrimento físico, mental e social relacionado à doença, o prognóstico, e a importância de diagnóstico precoce, por exemplo. Durante a execução do aconselhamento genético, diversos aspectos devem ser levados em consideração. Primeiramente, deve ser avaliada a receptividade emocional e intelectual do paciente ao receber a informação.²³⁸ A orientação pode gerar intensas respostas emocionais ou ser de entendimento complexo à leigos, por exemplo. Sendo assim, o processo de aconselhamento genético deve sempre ser acompanhado por psicólogos e assistentes sociais. Outro aspecto de extrema importância é o fato de que a informação genética é pessoal e deve ser mantida sob sigilo, sendo que o desrespeito por esta representa ameaça à saúde pública e aos direitos humanos.²⁴³

3.1.3 Diagnóstico e determinação do traço

Atualmente, as técnicas utilizadas para o diagnóstico da anemia falciforme e de seu traço se baseiam principalmente na diferenciação entre as proteínas HbS e HbA. Isso pode ser realizado através de diversos métodos, incluindo eletroforese, testes de solubilidade ou utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Performance (*High pressure liquid chromatography* - HPLC).^{234,244} A execução destes testes em alguns indivíduos

portadores do traço e em recém-nascidos, porém, é usualmente complicada devido às baixas concentrações de HbS. É importante mencionar que o diagnóstico precoce é de extremo interesse devido à necessidade de ações imediatas aos recém-nascidos, que incluem a execução de medidas profiláticas e de programas adequados de vacinação, reduzindo as taxas de mortalidade infantil de 25% à 3%.²³⁴ No Brasil, o teste de anemia falciforme é obrigatório em todo o território, realizado pelo teste do pezinho.^{245,246} Em casos que a análise protéica não permite o diagnóstico, técnicas que realizam a análise do material genético, como a PCR podem ser utilizadas.^{234,247}

Discutiremos a seguir as principais técnicas atualmente utilizadas para o diagnóstico e a determinação do traço de anemia falciforme:

- Teste de Falcização: consiste em submeter o sangue pesquisado à baixas concentrações de oxigênio, e em investigar a presença de falcização das hemácias com o auxílio de microscópios após 24h. Apesar da técnica ser simples e de baixo custo, não é usualmente utilizada por ser extremamente demorada.²⁴⁸

- Teste de solubilidade: se baseia na insolubilidade da HbS em seu estado desoxigenado. Para obter a desoxi-HbS, hemácias hemolizadas são submetidas à altas concentrações salinas. Em seguida, a solução obtida é adicionada à um papel de filtro. Caso haja a presença de polímeros insolúveis, estes ficam retidos e é formado uma mancha escura visível à olho nu.²⁴⁹ A técnica é usualmente utilizada para triagem em emergências, mas não apresenta boa sensibilidade para pacientes recém-nascidos, podendo apresentar falsos positivos.²⁵⁰

- Eletroforese de Hemoglobina: se baseia nas diferenças das taxas de migração dos tipos de Hb sob aplicação de um campo elétrico. As proteínas carregadas migram por atração eletrostática para o polo designado de acordo com seu tamanho, carga e formato. Como a mutação da anemia falciforme envolve a substituição de um ácido glutâmico, que possui carga negativa, por uma valina, eletricamente neutra, a mobilidade eletroforética da HbS é menor do que a da HbA.²⁵¹ A técnica é simples e de baixo custo, podendo ser utilizada em exames pré-natais.²⁴⁸

- HPLC: o HPLC é uma técnica que permite a separação de espécies iônicas e macromoléculas a partir de diversos parâmetros, como tamanho, carga e afinidade. Para isso, utiliza colunas específicas e bombas, atuando em alta pressão. Pode ser utilizado para o diagnóstico de anemia falciforme com grande precisão, sendo capaz

de diferenciar diversos tipos de hemoglobina de maneira eficiente.²⁴⁸ Porém, é uma técnica de alto custo, dependendo de equipamentos e pesquisadores especializados para sua execução.

- PCR: é, atualmente, a principal técnica utilizada para amplificar uma região específica de uma cadeia de DNA. A PCR, porém, pode também ser utilizada como ferramenta para diagnóstico. Para isso, após a amplificação da sequência desejada, deve-se determinar o produto da reação. Neste caso pode-se utilizar a digestão por endonuclease e a eletroforese, por exemplo.²⁵² Por realizar o diagnóstico utilizando a sequência de DNA, pode ser utilizada para o diagnóstico pré-natal e para a determinação do traço com grande precisão.²⁴⁸

Além dos testes citados acima, outras alterações laboratoriais podem indicar a presença da doença, como a elevação de bilirrubina indireta, a redução da haptoglobina sérica, a elevação de urobilinogênio urinário e a hiperplasia eritróide na medula óssea.²³⁴

Portanto, observa-se que apesar de existirem diversos métodos capazes de diagnosticar a anemia falciforme com boa sensibilidade e eficiência em adultos, a maior parte deles apresenta limitações à aplicação em recém-nascidos, que apresentam alta concentração de HbF. Além disso, a determinação do traço através de técnicas que não utilizam a análise do material genético pode ser prejudicada em alguns casos devido à baixa concentração de HbS. Apesar do PCR ser eficiente para a determinação do traço e para o diagnóstico de recém-nascidos, esta técnica depende da execução de diversas etapas após a amplificação, e requer equipamentos e pesquisadores especializados, além de apresentar baixa portabilidade. Sendo assim, é de interesse o desenvolvimento de novas técnicas que simplifiquem o diagnóstico e a determinação do traço da doença, trazendo maior acessibilidade principalmente à regiões com poucos recursos.

3.1.4 Genossensores

Para simplificar o diagnóstico e identificação do traço de anemia falciforme, genossensores (ou sensores de DNA) podem ser utilizados. Estes dispositivos se

baseiam na alteração de propriedades físicas – como resistência ou alteração de massa – para determinar a taxa de hibridização de sequências genéticas específicas com suas respectivas sequências complementares. Estes métodos representam uma poderosa ferramenta para o diagnóstico simples, eficiente e de baixo custo de doenças genéticas.^{253,254} Outros exemplos de aplicações destes dispositivos incluem a detecção de organismos geneticamente modificados,²⁵⁵ a detecção de bactérias,²⁵⁶ a determinação de genotipos,²⁵⁷ detecção de proteínas²⁵⁸ e outros.^{254,259}

Entre os métodos de transdução convencionalmente utilizados para a quantificação de analitos em biossensores, as técnicas eletroquímicas tem se destacado. Em especial, a EIS pode ser utilizada para a detecção dos eventos de hibridização de DNA de maneira simples, rápida e precisa sem a necessidade de marcadores.²⁶⁰ A VC se apresenta como uma alternativa, sendo capaz de gerar resultados precisos à partir de uma instrumentação extremamente simples. A descrição detalhada de ambas as técnicas e de suas aplicações em biossensores pode ser encontrada na Seção 2.1.6 Imunossensores eletroquímicos.

3.1.5 Biossensores para anemia falciforme descritos na literatura

Um único genossensor para a determinação da mutação relacionada à anemia falciforme foi encontrado na literatura. O trabalho, desenvolvido por Kumar e colaboradores, é baseado na transferência de energia ressonante luminosa para a determinação da presença do analito.²⁶¹ O sensor foi capaz de diferenciar entre sequências normais e mutadas, apresentando limites de detecção da ordem de fmol/L. Apesar de o dispositivo apresentar boa performance, este não foi desenvolvido visando à acessibilidade da população, requisitando equipamentos especializados e de alto custo para a realização da análise.

Genossensores baseados em técnicas eletroquímicas, por sua vez, são capazes de apresentar resultados baseados em instrumentação extremamente simples e portátil, sendo adequados para o diagnóstico em regiões com baixos recursos. Até a publicação do dispositivo desenvolvido por nós nenhum sensor eletroquímico foi encontrado em nossas buscas.

3.2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho consiste no desenvolvimento de genossensores eletroquímicos simples e de baixo custo para o diagnóstico e a determinação do traço da anemia falciforme. Para isso, sequências de DNA fita simples (ssDNA) correspondentes ao traço de anemia falciforme (sequência de captura) foram imobilizadas à eletrodos de ouro utilizando a técnica de monocamadas auto-organizadas (SAM). A taxa de hibridização entre a amostra e a sequência de captura foi acompanhada pelo uso das técnicas de EIS e VC. De acordo com nosso conhecimento, este é o primeiro biossensor eletroquímico desenvolvido para a determinação do traço de anemia falciforme.

3.2.1 Objetivos específicos

- Desenvolver um genossensor eletroquímico para a determinação simples, rápida e de baixo custo do traço de anemia falciforme;
- Otimizar as etapas de construção do dispositivo utilizando amostras padrão;
- Caracterizar o sensor desenvolvido utilizando técnicas eletroquímicas, avaliando a estabilidade, repetibilidade, reprodutibilidade e especificidade fornecidas pelo dispositivo;
- Construir uma curva de calibração utilizando amostras padrão;
- Avaliar a capacidade do dispositivo de diferenciar entre a sequência alvo (que contém a mutação relacionada à doença) e a sequência normal;

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Materiais

Ácido sulfúrico, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, peróxido de hidrogênio e 2-mercaptoetanol foram adquiridos da Sigma Aldrich (Brasil). As sequências de DNA foram sintetizadas pela Integrated DNA Technologies (IDT, Brasil). Eletrodos de ouro (2mm de diâmetro) foram adquiridos da CH Instruments (USA). PB foi preparado usando fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico para uma concentração final de 0,1 mol/L, pH 7,0.

3.3.2 Sequências de DNA

Três sequências de ssDNA foram utilizadas no desenvolvimento do genossensor (Tabela 3.1): 1) Sequência alvo: ssDNA contendo o traço de anemia falciforme (23 bases); 2) Sequência de captura, complementar à sequência alvo e modificada com tiol na extremidade 5' (23 bases); e 3) Sequência normal, correspondente ao DNA de um indivíduo sem a doença. Esta apresenta a mudança de 1 única base, se comparada à sequência alvo (23 bases).

Tabela 3.1 - Sequências de DNA de captura, alvo e saudável utilizadas no desenvolvimento do sensor.

Nome da sequência	Sequência de nucleotídeos
Captura	5' SH-GTA ACG GCA GAC TTC TCC ACA GG 3'
Alvo	5' CCT GTG GAG AAG TCT GCC GTT AC 3'
Normal	5' CCT GAG GAG AAG TCT GCC GTT AC 3'

Fonte: Adaptada de BRAZACA et al.²⁶²

3.3.3 Modificação dos eletrodos

Antes da modificação dos eletrodos com o material biológico, as superfícies de ouro foram limpas utilizando o seguinte procedimento: primeiramente, uma solução de ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio (3:1 v/v) foi utilizada para remover contaminantes orgânicos da superfície do eletrodo. Este foi em seguida lavado utilizando água ultrapura e o processo foi repetido três vezes. Os eletrodos foram

então submetidos à 50 ciclos de VC (0,0 à 1,5 V, ácido sulfúrico 0,1 mol/L) com velocidade de varredura de 300 mV/s, seguido pelo mesmo processo à uma velocidade de varredura de 100 mV/s. Por fim, os substratos foram lavados abundantemente usando água ultrapura e secos utilizando um fluxo de N₂.

Os eletrodos de ouro foram, em seguida, modificados através do uso da técnica de SAM (Figura 3.2). Os substratos foram imersos em uma solução contendo a sequência de captura (1 µmol/L), modificada com tiol na extremidade 5', e 2-mercaptoetanol (0,12 mmol/L) em PB (0,1 mol/L, pH 7,0), por 4 h. A hibridização com a amostra foi realizada imergindo o eletrodo modificado por 2h em uma solução contendo a amostra (PB, 0,1 mol/L, pH 7,0). Após cada etapa, os eletrodos foram cuidadosamente lavados com água ultrapura e secos sob um fluxo de N₂. Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente (25 °C).

Figura 3.2 - Esquema da montagem do biossensor para detecção do traço de anemia falciforme. Fonte: Adaptada de BRAZACA et al.²⁶²

3.3.4 Medidas eletroquímicas

Medidas eletroquímicas foram realizadas em uma célula de 3 eletrodos convencional, utilizando um potenciostato/galvanostato PGSTAT 12 (Autolab, Metrohm, Suíça). Eletrodos de ouro modificados (2 mm de diâmetro) foram utilizados como eletrodos de trabalho, enquanto uma placa de platina (1×1 cm) e um eletrodo de Ag/AgCl (solução interna KCl 3,0 mol/L) foram utilizados como contra-eletrodo e eletrodo de referência, respectivamente. Medidas de EIS foram realizadas em

potencial de célula aberto nas frequências de 10 kHz à 100 mHz, com amplitude de 10 mV. Antes de cada experimento, uma medida de VC era realizada para de ativar o sensor ($-0,2$ à $0,8$ V, 100 mV/s, 2 ciclos). Uma solução de $4,0$ mmol/L de ferrocianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$) foi aplicada como um mediador redox em PB ($0,1$ mol/L, pH $7,0$, 10 mL). Antes de cada medida, a solução era agitada para garantir sua homogeneidade. Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente (25 °C). Valores de R_{tc} foram obtidos utilizando o software FRA (Frequency Response Analyzer) (Autolab, Metrohm, Suíça).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Montagem do biossensor

A estratégia de montagem do biossensor foi baseada na capacidade dos grupos funcionais tiol se ligarem espontaneamente e de maneira covalente ao ouro. Para isso, o grupamento sulfidril (R-SH) deve ser desprotonado, criando um radical $RS^\bullet$ - o qual é, por sua vez, capaz de se ligar covalentemente ao metal. Os grupamentos protonados SH podem também interagir com o ouro, mas em ligações mais fracas, coordenadas através dos pares de elétrons livres do enxofre. É interessante mencionar que a interação S-Au possui força semelhante à Au-Au. Sendo assim, esta é capaz de modificar significativamente interações metálicas próximas.²⁶³

A modificação das superfícies com tiol evolui através de diversas etapas. Primeiramente, as moléculas se arranjam horizontalmente, paralelas ao substrato. Em seguida, com o aumento da densidade de moléculas na superfície, uma transição de posicionamento ocorre, e as moléculas tomam a configuração vertical. Isso permite a formação de camadas densas e organizadas das moléculas de interesse, aspecto importante no desenvolvimento de biossensores.²⁶⁴

Por fim, utilizou-se 2-mercaptoetanol em conjunto com a sequência de captura para que este atue como um espaçador e permita com que o ssDNA se organize de maneira apropriada, facilitando sua interação com a amostra (Figura 3.3).

Figura 3.3 - Ilustração da imobilização das sequências de captura do eletrodo A) sem a presença de 2-mercaptoetanol e B) na presença do composto. Observa-se que no segundo caso as sequências de captura estão organizadas de maneira adequada para a interação com a amostra.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.4.2 Avaliação eletroquímica da modificação dos eletrodos

Para verificar se o filme biossensor estava sendo montado da maneira esperada, medidas eletroquímicas foram realizadas após a deposição de cada uma das camadas sobre o substrato utilizando tanto EIS (Figura 3.4A) quanto VC (Figura 3.4B).

Primeiramente, observou-se o diagrama de Nyquist obtido com eletrodos de ouro limpos (Figura 3.4A, vermelho), o qual corresponde à uma linha reta. Neste caso, o sistema apresenta R_{tc} desprezível, permitindo com que íons atravessem a interface eletrodo/solução assim que estes atinjam a superfície do ouro. Dessa maneira, a reação é dependente somente da difusão das espécies eletroativas em solução. Quando a camada de 2-mercaptoetanol/sequência de captura foi adicionada, um aumento de 8,6 k Ω foi observado (Figura 3.4A, preto). Isso ocorre devido à dois efeitos principais: i) impedimento estérico, devido à presença de material adsorvido na superfície do eletrodo; e ii) repulsão eletrostática, já que a cadeia de fosfato de DNA é carregada negativamente, bloqueando o acesso do marcador aniônico à superfície do eletrodo.²⁶⁵ Portanto, a modificação desejada foi atingida. Após a hibridização com 1,0 $\mu\text{mol/L}$ da sequência alvo, o diâmetro do semi-círculo é dobrado, aumentando sua R_{tc} para 21,5 k Ω (Figura 3.4A, azul). Isso indica o depósito de uma maior quantidade de material sobre o eletrodo, mostrando que a hibridização foi bem sucedida. Além disso, a diferença significativa entre o sinal antes e após o contato com a sequência alvo mostra que o protocolo escolhido é adequado para a detecção desta.

Figura 3.4 - Estudo da eficiência da modificação dos eletrodos por A) EIS e B) VC.
Fonte: Adaptada de BRAZACA et al.²⁶²

As medidas de VC realizadas em cada um dos estágios de montagem do eletrodo levaram à conclusões semelhantes (Figura 3.4B). Neste caso, um aumento na R_{tc} leva ao decréscimo da intensidade da corrente redox do mediador e seu deslocamento à potenciais mais positivos. Inicialmente, o eletrodo de ouro limpo apresentou uma i_{ox} de 20 μA em 0,25 V (Figura 3.4B, vermelho). Após a deposição da camada de 2-mercaptoetanol/sequência de captura, a i_{ox} decresceu para 18 μA e se deslocou para 0,27 V (Figura 3.4B, preto), indicando a presença de material sobre o eletrodo. Após o contato do genossensor com 1,0 $\mu mol/L$ da sequência alvo, i_{ox} decresceu significativamente para 10 μA e se deslocou para 0,38 V, indicando que a hibridização ocorreu como esperado (Figura 3.4B, azul).

3.4.3 Otimização do processo de montagem do biossensor

Etapas de otimização foram realizadas afim de obter um sensor com uma ampla faixa de linearidade e um baixo LD. Para isso, a concentração de cada um dos compostos e o tempo de imersão do eletrodo em cada uma das etapas foram cuidadosamente estudados.

Primeiramente, estudamos a concentração da sequência de captura. Diferentes eletrodos foram montados com concentrações entre 0,5 e 5,0 $\mu mol/L$ e medidas de EIS foram realizadas após a hibridização destes com 1,0 $\mu mol/L$ da

sequência alvo. Para garantir que o equilíbrio da reação fosse atingido, permitiu-se que os sensores reagissem *overnight* (17h). Neste caso, o melhor parâmetro é o que apresenta o maior R_{tc} , indicando possivelmente uma maior taxa de hibridização com a sequência alvo. Neste caso, a concentração de $1,0 \mu\text{mol/L}$ apresentou os melhores resultados e, portanto, foi escolhida para estudos subsequentes.

Em seguida, estudou-se o tempo requerido para a imobilização da sequência de captura. Eletrodos foram imersos em uma solução desta ($1,0 \mu\text{mol/L}$) por períodos de 1 a 14h. Medidas de EIS foram realizadas para determinar a deposição de material no eletrodo em função do tempo (Figura 3.5A). Observou-se que R_{tc} cresceu gradativamente com o aumento do período de imersão, apresentando valores semelhantes aos obtidos ao *overnight* após 4h. Provavelmente, a deposição de material atingiu o equilíbrio depois deste período, sendo o tempo escolhido para estudos subsequentes.

Figura 3.5 - Otimização do A) Tempo de imersão do eletrodo na solução contendo sequência de captura/2-mercaptoetanol e B) Tempo de hibridização.

Fonte: Adaptada de BRAZACA et al.²⁶²

Por fim, as condições de hibridização foram investigadas utilizando uma concentração da sequência alvo de $1,0 \mu\text{mol/L}$. Diferentes períodos de imersão do eletrodo foram testados (1-17h), com medidas de EIS sendo realizadas logo após a hibridização (Figura 3.5B). Observa-se, como no caso anterior, um aumento gradativo na R_{tc} , sendo que esta atinge um equilíbrio após aproximadamente 2h. Sendo assim, este foi o período escolhido para dar continuidade aos experimentos.

3.4.4 Curva de calibração

O comportamento do sensor foi investigado frente à diferentes concentrações de DNA alvo para obtenção de uma curva analítica utilizando a técnica de EIS (Figura 3.6). Pode ser observado que, para menores concentrações da sequência alvo (0,01 à 2,5 $\mu\text{mol/L}$), o diagrama de Nyquist pode ser adequado ao circuito de Randles. Por outro lado, em concentrações mais altas (7,5 $\mu\text{mol/L}$) apresentaram um comportamento distinto. Neste caso, dois semi-círculos independentes e sobrepostos podem ser observados. Isso provavelmente ocorre devido à presença de sequência alvo não hibridizada ligada ao filme, levando os dados à corresponderem à dois resistores e capacitores independentes, ao invés de um único.²⁶⁶ Para a construção da curva de calibração a R_{tc} considerada foi a do primeiro semi-círculo. Provavelmente, somente o evento de hibridização contribuiu ao valor obtido.

Figura 3.6 - Curva de calibração para concentrações de 0,01 a 7,50 $\mu\text{mol/L}$ da sequência alvo. A) Diagramas de Nyquist e B) Regressão linear.

Fonte: Adaptada de BRAZACA et al.²⁶²

A curva de calibração apresentou um aumento linear na R_{tc} em uma concentração da sequência alvo que variou de 0,01 à 7,5 $\mu\text{mol/L}$, com um coeficiente de correlação (R^2) de 0,979 e sensibilidade de $1,23 \times 10^5 \text{ ohm L}/\mu\text{mol cm}^2$. O comportamento da reta seguiu a equação $R_{tc} (\Omega) = (5.908 \pm 762) + (3.876 \pm 474) [\text{Sequência alvo}] (\mu\text{mol/L})$ apresentando um LD de 7,0 nmol/L, determinado pelo primeiro sinal detectável.^{267–269}

3.4.5 Determinação do traço de anemia falciforme

Em seguida, avaliamos a resposta dos biossensores à sequências de DNA normal (sem a mutação) (Figura 3.7). Como esperado, sequências de DNA normais levaram à uma R_{tc} mais baixa (8,64 k Ω), quando comparado às sequências alvo (21,5 k Ω). Isso ocorre porque sequências alvo hibridizam em uma taxa muito mais alta do que sequências normais devido à sua complementariedade à sequência de captura. Portanto, a sequência de DNA relacionada à um indivíduo saudável pode ser facilmente diferenciada à de um doente, e o biossensor mostra grande potencial para a determinação do traço de anemia falciforme.

Figura 3.7 - Diagrama de Nyquist relacionado ao estudo da especificidade do sensor. Observa-se que a sequência normal (preto) fornece um sinal muito semelhante à sequência de captura (azul), enquanto a sequência alvo (vermelho) apresenta uma R_{ct} significativamente maior. Fonte: Adaptada de BRAZACA et al.²⁶²

3.4.6 Caracterização eletroquímica

A reprodutibilidade dos sensores foi avaliada através da fabricação de 3 eletrodos em paralelo, testados com uma concentração de sequência alvo de 1,0 $\mu\text{mol/L}$. Neste caso, observamos uma variação de 10,4 % ($n=3$) na R_{tc} , mostrando boa reprodutibilidade entre diferentes montagens (Figura 3.8A). A repetibilidade do sensor foi também estudada através da execução de diversas medidas de EIS sequenciais.

Após 4 medidas, o sinal diminuiu cerca de 37,3% (Figura 3.8B), mostrando que o sensor possui baixa repetibilidade. Este fato não deve influenciar na performance dos dispositivos pois foram projetados para uso médico e possuem a indicação de serem descartados após um único uso. Por fim, o sensor apresentou ótima estabilidade, apresentando variações em i_{ox} de 1,63% em 30 ciclos de VC (Figura 3.8C).

Figura 3.8 - Caracterização eletroquímica do sensor desenvolvido. A) Diagrama de Nyquist mostrando estudos de reprodutibilidade utilizando 1 $\mu\text{mol/L}$ da sequência alvo. B) Repetibilidade das medidas de EIS. Um único eletrodo foi medido diversas vezes, sequencialmente. C) Voltamograma cíclico relacionado ao estudo de estabilidade do sensor. 30 ciclos são mostrados na figura.

Fonte: Adaptada de BRAZACA et al.²⁶²

3.5 CONCLUSÕES

Desenvolvemos um genossensor eletroquímico simples e de baixo custo baseado em EIS para a determinação do traço de anemia falciforme. Para isso, uma sequência de ssDNA alvo, correspondente à de um indivíduo com a anomalia, foi imobilizada em plataformas de ouro através da técnica de SAM. O dispositivo apresentou boa linearidade ($R^2=0,979$) em uma ampla faixa de concentrações

(0,01 à 7,5 $\mu\text{mol/L}$) com boa reprodutibilidade (10,4 %, $n=3$) e um LD de 7,0 nmol/L. Além disso, a R_{tc} variou significativamente (cerca de 13 k Ω) quando o dispositivo foi testado contra sequências alvo e normais, mostrando grande potencial para a determinação do traço de anemia falciforme. Portanto, espera-se que os biossensores desenvolvidos possam auxiliar na determinação do traço da doença, permitindo aconselhamento genético e a orientação de um maior número de pacientes.

3.6 PUBLICAÇÕES RELACIONADAS

Os resultados apresentados neste capítulo foram publicados em Brazaca, L. C.; Bramorski, C. B.; Cancino-Bernardi, J.; Janegitz, B. C.; Zucolotto, V. A Genosensor for Sickle Cell Anemia Trait Determination. **Electroanalysis**, v. 29, n. 3, p. 773-777, 2017.

O trabalho gerou também uma patente, depositada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), com o número de registro BR1020160223440 como privilégio de inovação. Título: “Biossensor eletroquímico de DNA, processo para sua preparação e uso do mesmo”. Depositante: Universidade de São Paulo; Inventores: Brazaca, L. C.; Bramorski, C. B.; Cancino-Bernardi, J.; Janegitz, B. C.; Zucolotto, V. Data de depósito: 28/09/2016.

4 CONCLUSÕES GERAIS

Esta tese descreve o desenvolvimento de três biossensores para o auxílio do diagnóstico médico de doenças com alta relevância na atualidade. O primeiro capítulo trata da construção de biossensores microfluídicos *lateral flow* para a quantificação simultânea de dois biomarcadores da doença de Alzheimer, Clusterina e Fetuína B. O dispositivo foi capaz de detectar as macromoléculas com precisão mesmo em amostras complexas, apresentando maior facilidade de uso e potencialmente menor custo quando comparado às técnicas de detecção atuais. No segundo capítulo, descreve-se o desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos para a detecção de melatonina em amostras biológicas. O dispositivo teve ótimo desempenho em amostras extraídas de fígado de rato, apresentando resultados mais rápidos e de menor custo quando comparados à técnica padrão ELISA. Por fim, o terceiro capítulo trata do desenvolvimento de genossensores para a determinação do traço de anemia falciforme. O biossensor foi capaz de diferenciar entre sequências de DNA correspondentes à indivíduos doentes e saudáveis, sendo capaz de realizar a determinação de maneira mais simples do que as técnicas atualmente existentes. Sendo assim, os sensores desenvolvidos apresentaram melhorias em relação às técnicas de detecção já existentes sendo, usualmente, mais rápidos, mais simples e de menor custo. Esperamos que estes auxiliem no diagnóstico de seus males associados, permitindo maior acessibilidade à população e fornecendo informações rápidas e em campo aos profissionais de saúde.

5 INFORMAÇÕES ADICIONAIS

5.1 Projetos realizados em paralelo

5.1.1 SABio – um sensor baseado em aptâmeros para a detecção de bactérias

Autores: Laís Canniatti Brazaca, Adriano Lopes Rodrigues, Ana Laura de Lima, Ilaiáli Souza Leite, Otávio Henrique Thiemann, Natália Mayumi Inada, Valtencir Zucolotto

As infecções hospitalares são reconhecidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um sério problema de saúde pública, matando milhares de pessoas por ano. Só no Brasil, as infecções hospitalares ocorrem em 14% das internações e causam de cerca de 100 mil mortes anualmente. Os principais agentes causadores das infecções hospitalares são as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas Aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* e, atualmente, sua detecção é comumente realizada por cultura de microorganismos. Apesar de ser uma técnica simples, é um método demorado e limitado, dependendo do uso de materiais e pessoal especializados. Sendo assim, visando maior rapidez e eficiência no tratamento das infecções hospitalares, assim como a diminuição no número de casos, é necessário o desenvolvimento de métodos mais rápidos e precisos para a identificação de microorganismos. Biossensores eletroquímicos apresentam grande potencial para quantificação de analitos de maneira rápida, simples e de baixo custo através da análise de mudanças nas propriedades elétricas de um sistema. Por sua vez, aptâmeros (Ap) são oligonucleotídeos curtos que se ligam de maneira específica a uma determinada espécie química. Estes vêm sendo amplamente estudados como elementos de reconhecimento devido à sua alta especificidade e baixo custo, se comparados à Ab. Esse trabalho tem como objetivo desenvolver biossensores eletroquímicos à base de Ap para a quantificação das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, principais causadoras da infecção hospitalar. Os dispositivos são baseados na modificação de plataformas de ouro através da técnica de monocamadas auto-organizadas (SAM) com Ap específicos para cada uma das

bactérias estudadas. Após o contato dos eletrodos modificados com a solução a ser analisada é possível detectar a interação Ap-bactéria através da mudança de resistência do sistema, a qual pode ser avaliada pelas técnicas de EIS e/ou VC. Até o momento, o protocolo de modificação dos eletrodos foi otimizado para ambas as bactérias, e uma curva de calibração linear foi obtida para concentrações de *E. coli* com OD₆₀₀ entre 0,1 e 1,0 ($R^2=0,944$). Os próximos passos consistem na construção da curva de calibração para *S. aureus* e na avaliação da estabilidade, reprodutibilidade e especificidade dos sensores desenvolvidos. Além disso, planejamos testar o dispositivo em amostras biológicas. O biossensor proposto é uma ferramenta potencialmente simples, portátil, precisa e de baixo custo para a detecção simultânea das principais bactérias causadoras de infecções hospitalares. A detecção pode, potencialmente, ser realizada tanto no ambiente hospitalar como em fluidos biológicos, por exemplo sangue e saliva. Esperamos que o dispositivo auxilie na identificação de infecções hospitalares em estágios iniciais, assim como na delimitação de regiões potencialmente favoráveis ao acúmulo dessas bactérias.

O projeto se encontra em andamento.

5.1.2 Sensor baseado em nanoflores de ouro para a detecção sensível de dopamina

Autores: Laís Canniatti Brazaca, Olavo Santos Amorim, Juliana Cancino-Bernardi, Valtencir Zucolotto

Materiais em nanoescala apresentam propriedades elétricas interessantes que podem melhorar consideravelmente o desempenho de sensores eletroquímicos. Neste trabalho, nanoflores de ouro foram sintetizadas e utilizadas como um elemento catalítico para detecção eletroquímica de dopamina. Para isso, foram construídos filmes layer-by-layer em eletrodos de ITO utilizando poli (alilamina hidroclorada) (PAH) e nanoflores de ouro complexadas com ftalocianina de cobre. O uso das nanopartículas aumentou a sensibilidade do sensor, catalisando as reações de óxido-redução no sistema estudado. Este apresentou desempenho melhor, quando comparado à filmes construídos somente com os componentes individuais, e também

com nanopartículas esféricas. O biossensor apresentou um aumento linear na corrente de oxidação de dopamina em concentrações de 10 a 430 $\mu\text{mol/L}$, com $R^2=0,996$. Os próximos passos no desenvolvimento do projeto incluem a avaliação da estabilidade, reprodutibilidade e tempo de prateleira do dispositivo. Até o presente momento, o dispositivo apresentou boa performance, permitindo a quantificação do hormônio de maneira simples e de baixo custo.

O projeto se encontra em andamento.

5.1.3 Plataforma sem fio integrada aos óculos para a determinação de analitos em lágrimas

Autores: Juliane Renata Sempionatto, Laís Canniatti Brazaca, Laura García-Carmona, Aida Martin, Alan S. Campbell, Jayoung Kim, Guangda Tang, Valtencir Zucolotto, Alberto Escarpa, Joseph Wang

O interesse pelo uso de lágrimas como amostras biológicas tem crescido recentemente principalmente devido à sua baixa complexidade, ao seu fácil acesso e por apresentar diversos analitos de interesse. Desenvolvemos um novo sistema *wearable* integrado à armação dos óculos para a determinação de glicose e álcool em lágrimas. Para capturar as lágrimas, construímos um sistema microfluídico utilizando membranas superhidrofílicas. No interior do dispositivo foram posicionados HSPEs modificados com as enzimas glicose oxidase (GOx) ou álcool oxidase (AOx). A integração do biossensor à um circuito de distribuição de dados por *Bluetooth* permite a transmissão dos resultados sem fio à um computador, o qual faz o registro das medidas. A plataforma mostrou correlação linear com a concentração de ambos os analitos, com coeficientes de correlação R^2 de 0,912 e de 0,990 para o álcool e glicose, respectivamente. Além disso, em testes *on body*, um único dispositivo foi capaz de realizar a quantificação de glicose de maneira adequada durante um dia completo. O biossensor de álcool, por sua vez, permitiu a determinação das concentrações do composto por 6 horas ininterruptas, tendo estas 2 picos de álcool. Sendo assim, o sistema permitiu o monitoramento imediato de ambos os compostos de maneira inovadora e minimamente invasiva. Até o momento, nenhum sensor foi

descrito para a determinação de álcool em lágrimas. No futuro, o dispositivo desenvolvido pode ser adaptado para o monitoramento de outros analitos relevantes neste fluido.

O projeto foi realizado durante a execução de estágio no exterior (BEPE FAPESP, 2017/03779-0), supervisionado pelo prof. Dr. Joseph Wang (Universidade da Califórnia, San Diego). Este foi finalizado e está em fase de publicação.

5.1.4 Desenvolvimento de biossensores baseados em nanopartículas magnéticas para a identificação de OGMs

Autores: Enrique Albuerne Suárez, Laís Canniatti Brazaca, Valtencir Zucolotto, María Jesús Lobo Castañón.

Alimentos ou ingredientes que contenham organismos geneticamente modificados (OGMs) devem ser rotulados adequadamente devido à incerteza de que estes sejam prejudiciais à saúde e à biodiversidade. Sendo assim, o desenvolvimento de métodos para a detecção e quantificação rápida, simples e de baixo custo de OGMs é de grande interesse à órgãos reguladores. Genossensores eletroquímicos são uma excelente alternativa para detectar sequências específicas de DNA e, sendo assim, são ferramentas muito úteis para identificar material geneticamente modificado. Para que estes possuam a sensibilidade adequada à quantificação de OGMs em amostras reais, comumente são utilizadas enzimas como marcadores – materiais que, apesar de permitirem a amplificação do sinal de maneira adequada, são instáveis e de alto custo. Neste trabalho, tivemos como objetivo explorar o potencial das nanopartículas de prata (AgNPs) como uma alternativa às enzimas no desenvolvimento de genoensaios eletroquímicos no formato de sanduíche para quantificação do milho geneticamente modificado MON 810. Foram também utilizadas partículas magnéticas funcionalizadas com DNA para realizar separações entre as frações ligadas e não ligadas ao sensor desenvolvido. Após a realização dos processos de separação, as nanopartículas de prata foram dissolvidas utilizando ácido nítrico 0,1 mol/L e íons Ag^+ foram quantificados através do uso da voltametria de onda quadrada – sendo posteriormente relacionados à quantidade de MON810 nas amostras.

A aluna trabalhou no projeto durante um estágio de 2 meses na Universidade de Oviedo, Espanha (junho e julho de 2015), no projeto Marie Curie IRSES, financiado pela União Europeia.

5.1.5 Rubberbye: Degradação de borracha natural

Autores: Time Brasil-USP – Ana Laura de Lima, Ana Paula Ulian de Araújo, Bruno Andrade Ono, Camila Barbosa Bramoski, Camila Maria dos Santos Boralli, Cristiane Casonato Melo, Cristina Kurachi, Danilo Keiji Zampronio, Deborah Cezar Mendonça, Éverton Edésio Silva, Fabiane Fantinelli Franco, Grazielle Vasconcelos, Ivan Rosa e Silva, Jennifer Machado Soares, Juliana Cancino-Bernardi, Karen Freire Carvalho, Laís Canniatti Brazaca, Laís Ribovski, Letícia Camargo Tavares, Mariana Lopes Garcia, Otavio Henrique Thiemann, Paula Pincela Lins, Richard Charles Garratt, Thiago Schiavo Mosqueiro, Valtencir Zucolotto, Victor Henrique Rabesquine Nogueira.

O acúmulo de pneus e resíduos de borracha representa um problema ambiental significativo a nível mundial. Técnicas de reciclagem atuais requerem alto consumo de energia, e são completamente sobrecarregadas pela quantidade anual de resíduos. Além disso, a degradação natural da borracha pode levar até 1000 anos. Com este projeto, pretendemos acelerar a degradação da borracha natural por engenharia genética da *Escherichia coli* para que esta expresse e secrete duas enzimas: RoxA (*Rubber oxygenase*) e Lcp (*Latex clearing protein*). Para a desvulcanização da borracha, o projeto inclui um pré-tratamento utilizando *Acidithiobacillus ferrooxidans*, uma bactéria que realiza a reação naturalmente. Ambos estes processos serão realizados em biorreatores. O principal composto resultante do tratamento é o ODTD (12-oxo-4,8-dimetil-trideca-4,8-dieno-1-al), uma unidade de triisopreno que pode ser transformada em produtos com elevado interesse comercial, tal como combustíveis ou um novo polímero. Consequentemente, além de possibilitar a degradação mais rápida de borracha e diminuir a quantia de poluentes, o nosso projeto também concede um produto final de alto interesse económico.

Mais informações sobre o projeto no site: <http://2015.igem.org/Team:Brasil-USP>

O projeto foi desenvolvido em 2015.

5.2 Prêmios Recebidos

- Medalha de ouro na competição iGEM (International Genetically Engineered Machine) com o time Brasil-USP (Boston, 2015);
- 1º lugar na Oficina de Inovação da USP, organizada pela Agência USP de Inovação, EESCin/CEAS com o projeto “SABio – Bacteria Detection” (São Carlos – 2016).
- 1º lugar na Biomaker Battle organizada pela Biominas Brasil e pelo Sebrae com o projeto “Novas plataformas para diagnóstico do mal de Alzheimer” (São Paulo – 2017).
- Vencedora da etapa regional com o time Fastibular da competição SINP 2016 (Sua Ideia na Prática) (São Carlos, 2016);
- Vencedora da etapa nacional com o time Fastibular da competição SINP 2016 (Sua Ideia na Prática) (São Carlos, 2017);

5.3 Experiências no exterior

5.3.1 Oviedo – Espanha

A aluna realizou estágio por 2 meses no Grupo de Eletroanálise, localizado Universidade de Oviedo, Espanha, sob supervisão da Prof. Dra. María Jesús Lobo Castañon (Junho – Julho/2015). Durante este período, Laís trabalhou no desenvolvimento de genossensores para a detecção de OGMs baseados em nanopartículas magnéticas, descrito na seção 4.1.4. O estágio foi financiado pelo programa Marie Curie IRSES (*International Research Staff Exchange Scheme*), desenvolvido pela União Europeia.

5.3.2 San Diego - Estados Unidos

A aluna realizou também um estágio no Laboratório de Nanobioeletrônica, localizado na Universidade da Califórnia, San Diego. As atividades foram supervisionadas pelo Prof. Dr. Joseph Wang e tiveram uma duração de 9 meses (Julho 2017- Abril 2018). Durante o período, a aluna trabalhou no aperfeiçoamento das plataformas de papel para diagnóstico de Alzheimer, iniciado no Brasil, e em dispositivos microfluídicos para a análise de lágrimas, descrito na seção 4.1.3. O estágio foi financiado pela bolsa BEPE FAPESP (Nº de processo 2017/03779-0).

5.4 Participação em eventos

Participação pela própria autora

- Participação, apresentação oral e de pôster na competição internacional iGEM (International Genetically Engineered Machine) (Boston, EUA - 2015)

Título do Projeto: RubberBye – Degrading rubber to fuel

Autores: Laís Ribovski, Laís Canniatti Brazaca, Grazielle Vasconcelos, Paula Pincela Lins, Thiago Schiavo Mosqueiro, Letícia Camargo Tavares, Fabiane Fantinelli Franco, Mariana Lopes Garcia, Ana Laura de Lima, Ivan Rosa e Silva, Karen Freire Carvalho, Cristiane Casonato Melo, Camila Barbosa Bramoski, Jennifer Machado Soares, Éverton Edésio Silva, Deborah Cezar Mendonça, Victor Henrique Rabesquine Nogueira, Bruno Andrade Ono, Camila Maria dos Santos Boralli, Danilo Keiji Zampronio, Otavio Henrique Thiemann, Cristina Kurachi, Valtencir Zucolotto, Juliana Cancino-Bernardi, Richard Charles Garratt, Ana Paula Ulian de Araújo.

- Participação e apresentação oral no XX SIBEE (Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica) (Uberlândia - 2015)

Título da apresentação: Detection of adiponectin hormone through the immobilization of its transmembrane receptors AdipoR1/R2 in gold platforms

Autores: Laís Canniatti Brazaca, Bruno Campos Janegitz, Juliana Cancino-Bernardi, Valtencir Zucolotto

- Apresentação oral no encontro XIV Brazil MRS Meeting. (Rio de Janeiro - 2015)

Título: Development of an electrochemical biosensor for adiponectin detection

Autores: Laís Canniatti Brazaca, Bruno Campos Janegitz, Juliana Cancino-Bernardi, Valtencir Zucolotto

- Participação no evento “Sexta Semana de Propriedade Intelectual e Inovação” organizado pela Agência USP (São Carlos - 2015)

- Participação como avaliadora no 23º SIICUSP (Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP) (São Paulo - 2015)

- Participação e apresentação de pôster no 18º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA) (Florianópolis - 2016)

Título do trabalho: Desenvolvimento de um Imunossensor Eletroquímico para Quantificação Simples e Rápida do Hormônio Melatonina

Autores: Laís Canniatti Brazaca, Camila Barbosa Bramorski, Juliana Cancino-Bernardi, Regina Pekelmann Markus, Bruno Campos Janegitz, Valtencir Zucolotto

- Participação e apresentação oral no XV Brazilian MRS Meeting (SBPMat) (Campinas – 2016)

Título do trabalho: A self-assembled antibody-based platform for melatonin detection

Autores: Laís Canniatti Brazaca, Camila Barbosa Bramorski, Juliana Cancino-Bernardi, Regina Pekelmann Markus, Bruno Campos Janegitz, Valtencir Zucolotto

- Participação e apresentação oral na VI Semana Integrada do Instituto de Física de São Carlos (SIFSC 6) (São Carlos, 2016)

Título do trabalho: Paper-based biosensor for the quantification of blood biomarkers for Alzheimer's disease

Autores: Laís Canniatti Brazaca, Valtencir Zucolotto

- Participação e apresentação oral na Oficina de Inovação, organizada pela Agência USP de Inovação (São Carlos, 2016)

Título do trabalho: SABio – Bacteria Detection

Autores: Laís Canniatti Brazaca, Adriano Rodrigues Lopes, Valtencir Zucolotto

- Participação e apresentação oral no evento BIN@SP (Business and Innovation Network Annual Event) (São Paulo, 2016)

Título da apresentação: SABio – Bacteria Detection

Autores: Laís Canniatti Brazaca, Adriano Rodrigues Lopes, Valtencir Zucolotto

- Participação na 1ª Escola de Pesquisadores (São Carlos, 2016).**
- Participação no I Workshop USP-IFSC SPIE Chapter (São Carlos, 2016).**
- Participação da oficina Sua Ideia na Prática (SINP 2016), organizada pela Ideation Brasil (São Carlos, 2016/2017) com o projeto “Fastibular”.**
- Participação da IBMC (International Business Model Competition) representando o Brasil (São Francisco, EUA, 2017), com o projeto “Fastibular”.**
- Participação no evento “Biomaker Battle – Biostartup lab” organizado por Biominas Brasil e Sebrae (São Paulo - 2017) com o projeto “Novas plataformas para diagnóstico do mal de Alzheimer”.**
- Apresentação de pôster no evento VIII Semana Integrada do Instituto de Física de São Carlos (SIFSC 8).**

Título: Novas plataformas para o diagnóstico rápido e precoce do mal de Alzheimer

Autores: Laís Canniatti Brazaca, José Roberto Moreto, Joseph Wang, Valtencir Zucolotto.

Apresentação de trabalhos por colegas

- Apresentação de pôster no encontro XIV Brazil MRS Meeting. (Rio de Janeiro - 2015)

Título do pôster: Development of a Genosensor for Sickle-cell Disease Diagnosis

Autores: Camila Barbosa Bramorski, Laís Canniatti Brazaca, Bruno Campos Janegitz, Juliana Cancino-Bernardi, Valtencir Zucolotto.

- Apresentação de pôster no congresso V SIFSC (Semana Integrada do Instituto de Física de São Carlos) (São Carlos, 2015)

Título do pôster: Development of a Genosensor for Sickle-cell Disease Trait Determination

Autores: Camila Barbosa Bramorski, Laís Canniatti Brazaca, Bruno Campos Janegitz, Juliana Cancino-Bernardi, Valtencir Zucolotto.

- Apresentação de pôster no 23º SIICUSP (Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP) (São Carlos e São Paulo – 2015)

Título do pôster: Development of a Genosensor for Sickle-cell Disease Trait Determination

Autores: Camila Barbosa Bramorski, Laís Canniatti Brazaca, Bruno Campos Janegitz, Juliana Cancino-Bernardi, Valtencir Zucolotto

- Apresentação oral no ECS Meeting (San Diego, EUA – 2015)

Título da apresentação: Development of a Genosensor for Sickle Cell Anemia Trait Determination

Autores: Bruno Campos Janegitz, Laís Canniatti Brazaca, Camila Barbosa Bramorski, Juliana Cancino-Bernardi, Valtencir Zucolotto

5.5 Participação em minicursos

- Realização do minicurso “Detecção Ultrassensível de Biomarcadores e o diagnóstico precoce de doenças” ministrado no 18º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA) pelo prof. Ronaldo Censi Faria (Florianópolis - 2016).

- Realização do minicurso “Empreendedorismo com Ciência: Como transformar conhecimento em bons projetos” ministrado na VI Semana Integrada do Instituto de Física de São Carlos (SIFSC 6) (São Carlos, 2016)

5.6 Matérias encaminhadas para publicação

Publicações

- **Capítulo de Livro Publicado:** Laís Canniatti Brazaca, Laís Ribovski, Bruno Campos Janegitz, Valtencir Zucolotto. Nanostructured materials and nanoparticles for point-of-care (POC) medical biosensors. Livro: Medical Biosensors for Point of Care (POC) Applications 1, 229-254, Editora Elsevier. 2016.

- **Artigo Publicado:** Laís Canniatti Brazaca, Bruno Campos Janegitz, Juliana Cancino-Bernardi, Valtencir Zucolotto. Transmembrane Protein-Based Electrochemical Biosensor for Adiponectin Hormone Quantification. ChemElectroChem 3 (6), 1006-1011, 2016.

- **Artigo Publicado:** Laís Canniatti Brazaca, Camila Barbosa Bramorski, Juliana Cancino-Bernardi, Bruno Campos Janegitz, Valtencir Zucolotto. A Genosensor for Sick Cell Anemia Trait Determination. Electroanalysis 29 (3), 773-777, 2017.

- **Artigo Publicado:** Laís Canniatti Brazaca, Camila Barbosa Bramorski, Juliana Cancino-Bernardi, Sanseray da Silveira Cruz-Machado, Regina Pekelman Markus, Bruno Campos Janegitz, Valtencir Zucolotto. An antibody-based platform for melatonin quantification. Colloids and Surfaces B, v. 171, p. 94-100, 2018.

- **Manuscrito em elaboração:** Juliane Renata Sempionatto, Laís Canniatti Brazaca, Laura Garcia Carmona, Aída Galán, Alan S. Campbell, Jayoung Kim, Guangda Tang, Valtencir Zucolotto, Alberto Escarpa, Joseph Wang. Electrochemical Detection of Analytes in Tears Using a Novel Fluidic Device Mounted on Eyeglasses, 2018.

- **Manuscrito em elaboração:** Laís Canniatti Brazaca, Adriano Lopes Rodrigues, Ana Laura de Lima, Ilaiáli Souza Leite, Otávio Henrique Thiemann, Natália

Mayumi Inada, Valtencir Zucolotto. An aptamer-based electrochemical biosensor for the quantification of E. coli, 2018.

- **Manuscrito em elaboração:** Laís Canniatti Brazaca; Olavo Amorim dos Santos; Juliana Cancino-Bernardi; Valtencir Zucolotto. Using gold nanoflowers to catalyse dopamine oxidation, 2018.

- **Review em elaboração:** Laís Canniatti Brazaca, Isabella Sampaio do Nascimento, Bruno Campos-Janegitz, Valtencir Zucolotto. The Advancements POC Sensors can Bring to Alzheimers Disease Diagnosis, 2018.

Patentes

- **Patente Depositada:** Laís Canniatti Brazaca, Camila Barbosa Bramorski, Juliana Cancino-Bernardi, Regina Pekelman Markus, Bruno Campos Janegitz, Valtencir Zucolotto. Processo de obtenção de um eletrodo de trabalho, biossensor eletroquímico baseado na técnica de VC, uso e método de medição do mesmo. Instituição de registro – INPI. Patente de inovação. Número de registro BR102150259093. Data de depósito: 09/10/2015.

- **Patente Depositada:** Laís Canniatti Brazaca, Camila Barbosa Bramorski, Juliana Cancino-Bernardi, Bruno Campos Janegitz, Valtencir Zucolotto. Biossensor eletroquímico de DNA, processo para sua preparação e uso do mesmo. Instituição de registro – INPI. Patente de inovação. Número do registro: BR1020160223440. Data de depósito 28/09/2016.

- **Patente Depositada:** Laís Canniatti Brazaca, Camila Barbosa Bramorski, Juliana Cancino-Bernardi, Sanseray da Silveira Cruz-Machado, Regina Pekelman Markus, Bruno Campos Janegitz, Valtencir Zucolotto. Processo para obtenção de um imunossensor eletroquímico, imunossensor eletroquímico e usos do mesmo. Instituição de registro - INPI. Patente de inovação. Número de registro: BR1020170198251. Data de depósito 15/09/2017.

5.7 Atuação como revisora de periódicos

-Sensors and Actuators B-Chemical

-Journal of Biomedical Nanotechnology

5.8 Projetos de extensão

5.8.1 Fastibular: plataforma voltada à melhorar a administração de tempo de prova

Autores: Laís Canniatti Brazaca, Carolina de Paula Campos, Rafael Pereira Lima, Isabella Beninca, Kayo Addonay.

O vestibular é um momento decisivo na vida do estudante devido à alta competitividade e pressão para definir seu futuro. No ano passado, 8 milhões de brasileiros se inscreveram no ENEM. De uma amostra de 76 alunos, 68% relataram que a falta de tempo dificulta tanto quanto ou mais do que o domínio de conteúdo. Para resolver esses problemas, os alunos podem pagar altas taxas para *coaches* particulares ou realizar seu autodiagnóstico de maneira ineficiente. Pensando nestes alunos, a equipe Fastibular desenvolveu uma solução que combina preço baixo e eficiência. Idealizamos uma plataforma on-line que, por meio do diagnóstico e treinamento, gera um feedback personalizado, fornecendo ferramentas para que os alunos possam gerenciar melhor seu tempo de prova. Funciona assim: o aluno entra na plataforma, registra informações sobre os exames que deseja realizar e o sistema mostra simulados com diferentes tempos de resolução para ele escolher. Após o término da prova, o aluno recebe um *feedback* personalizado com uma avaliação do seu desempenho e também dicas de como melhorá-lo. Além disso, são fornecidos gráficos com o tempo gasto por questão, por disciplina e índices de aproveitamento. Com cada prova ele pode acompanhar seu histórico de evolução. O estudante pode acessar o sistema Fastibular através de seu computador, *tablet* ou *smartphone* pagando apenas uma pequena taxa por mês. Assim, ele gasta muito menos do que com um *coach* particular e tem muito mais recursos do que em auto-avaliações. Esperamos que o uso da plataforma desenvolvida alguns meses antes das provas

possa melhorar o desempenho do aluno nos testes, auxiliando-os a atingir seus objetivos.

O projeto foi desenvolvido em 2016/2017.

REFERÊNCIAS

- 1 BIOMARKERS DEFINITION WORKING GROUP. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 69, n. 3, p. 89–95, 2001.
- 2 DOBSON, M. Nature of the urine in diabetes. **Medical Observations and Inquiries**, v. 5, p. 298–310, 1776.
- 3 DHINGRA, R.; VASAN, R. S. Biomarkers in cardiovascular disease: statistical assessment and section on key novel heart failure biomarkers. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 27, n. 2, p. 123–133, 2017.
- 4 BEACH, T.G. A review of biomarkers for neurodegenerative disease: will they swing us across the valley? **Neurology and Therapy**, v. 6, n. S1, p. 5–13, 2017.
- 5 HENRY, N. L.; HAYES, D. F. Cancer biomarkers. **Molecular Oncology**, v. 6, n. 2, p. 140–146, 2012.
- 6 SELKOE, D. J.; LANSBURY, P. J. J. **Alzheimer's disease is the most common neurodegenerative disorder**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999.
- 7 ALZHEIMER MED. **Quantas pessoas sofrem de Alzheimer no mundo e no Brasil?** 2018. Disponível em: <<http://www.alzheimermed.com.br/perguntas-e-respostas/quantas-pessoas-sofrem-de-doenca-de-alzheimer-no-mundo-e-no-brasil>>. Acesso em: 10 out. 2018.
- 8 WIMO, A. et al. The worldwide economic impact of dementia 2010. **Alzheimer's & Dementia**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2013.
- 9 WORLD HEALTH RANKINGS. **Health profile: Brasil**. 2018. Disponível em: <<http://www.worldlifeexpectancy.com/country-health-profile/brazil>>. Acesso em: 08 out. 2018.
- 10 HUANG, Y.; MUCKE, L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1204–1222, 2012.
- 11 NATIONAL INSTITUTE ON AGING. 2018. Disponível em: < <https://www.nih.gov/>>. Acesso em: 18 nov. 2014.
- 12 ALZHEIMER'S ASSOCIATION. **Inside the brain: a tour of how the mind works**. 2018. Disponível em: <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/what-is-alzheimers/brain_tour_part_2>. Acesso em: 10 out. 2018.
- 13 GOMEZ-ISLA, T. et al. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. **Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 14, p. 4491–4500, 1996.
- 14 QIU, C. et al. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 11, n. 2, p. 111–128, 2009.
- 15 ALZHEIMER'S SOCIETY. **What is Alzheimer's disease**. 2018. Disponível em: < http://www.alzheimers.org.uk/site/scripts/documents_info.php?documentID=100>. Acesso: 12 nov. 2014.

- 16 NORTON, S. et al. Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data. **Lancet Neurology**, v. 13, n. 8, p. 788–794, 2014.
- 17 HENRIKSEN, K. et al. The future of blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 10, n. 1, p. 115–131, 2014.
- 18 CUMMINGS, J. L. Biomarkers in Alzheimer's disease drug development. **Alzheimer's & Dementia**, v. 7, n. 3, p. e13–e44, 2011.
- 19 BLENNOW, K. et al. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 6, n. 3, p. 131–144, 2010.
- 20 HAMPEL, H. et al. Core candidate neurochemical and imaging biomarkers of Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 4, n. 1, p. 38–48, 2008.
- 21 MATTSSON, N. et al. CSF biomarkers: pinpointing alzheimer pathogenesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1180, n. 1, p. 28–35, 2009.
- 22 ALMEIDA, S. M. et al. Incidence of post-dural puncture headache in research volunteers. **Headache**, v. 51, n. 10, p. 1503–1510, 2011.
- 23 SCHNEIDER, P. et al. Biological marker candidates of Alzheimer's disease in blood, plasma, and serum. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 15, n. 4, p. 358–374, 2009.
- 24 LI, J. et al. Effect of human cerebrospinal fluid sampling frequency on amyloid- β levels. **Alzheimer's & Dementia**, v. 8, n. 4, p. 295–303, 2012.
- 25 JETER, C. B. et al. Biomarkers for the diagnosis and prognosis of mild traumatic brain injury/concussion. **Journal of Neurotrauma**, v. 30, n. 8, p. 657–670, 2013.
- 26 SATTLECKER, M. et al. Alzheimer's disease biomarker discovery using SOMAscan multiplexed protein technology. **Alzheimer's & Dementia**, v. 10, n. 6, p. 724–734, 2014.
- 27 DENECKE, B. et al. Tissue distribution and activity testing suggest a similar but not identical function of fetuin-B and fetuin-A. **Biochemical Journal**, v. 376, p. 135–145, 2003.
- 28 SMITH, E. R. et al. Plasma fetuin-A is associated with the severity of cognitive impairment in mild-to-moderate Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 24, n. 2, p. 327–333, 2011.
- 29 DIAO, W. Q. et al. Fetuin-B (FETUB): a plasma biomarker candidate related to the severity of lung function in COPD. **Scientific Reports**, v. 6, p. 30045, 2016. doi: 10.1038/srep30045.
- 30 DIETZEL, E. et al. Fetuin-B, a liver-derived plasma protein is essential for fertilization. **Developmental Cell**, v. 25, n. 1, p. 106–112, 2013.
- 31 LIN, C.-C. C. et al. Apolipoprotein J, a glucose-upregulated molecular chaperone, stabilizes core and NS5A to promote infectious hepatitis C virus virion production. **Journal of Hepatology**, v. 61, n. 5, p. 984–993, 2014.
- 32 THAMBISETTY, M. et al. Association of plasma clusterin concentration with

severity, pathology, and progression in Alzheimer disease. **Archives of General Psychiatry**, v. 67, n. 7, p. 739–748, 2010.

33 SCHRIJVERS, E. M. C. et al. Plasma clusterin and the risk of Alzheimer disease. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 305, n. 13, p. 1322–1326, 2011.

34 HAROLD, D. et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. **Nature Genetics**, v. 41, n. 10, p. 1088–1093, 2009.

35 OU-YANG, M.-C. C. et al. Plasma clusterin concentrations may predict resistance to intravenous immunoglobulin in patients with Kawasaki disease. **Scientific World Journal**, v. 2013, p. 382523, 2013. doi.org/10.1155/2013/382523.

36 THERMO SCIENTIFIC. **Overview of ELISA**. 2018. Disponível em: <<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=F88ADEC9-1B43-4585-922E-836FE09D8403#elisaformats>>. Acesso em: 10 out. 2018.

37 SIGMA ALDRICH. **EIA Kits**. 2018. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/antibodies/antibody-products.html?TablePage=13831609>>. Acesso em: 10 out. 2018.

38 THEVENOT, D. R. et al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification (Technical report). **Pure Applied Chemistry**, v. 71, n. 12, p. 2333–2348, 1999.

39 CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, p. 29–45, 1962. doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x.

40 SUN, H. et al. Oligonucleotide aptamers: new tools for targeted cancer therapy. **Molecular Therapy Nucleic Acids**, v. 3, n. 8, p. e182, 2014.

41 SCITABLE - NATURE EDUCATION. **What is a cell?** 2014. Disponível em: <<https://www.nature.com/scitable/topicpage/what-is-a-cell-14023083>>. Acesso em: 20 set. 2018.

42 TODA MATÉRIA. **DNA**. 2018. Disponível em: <<https://www.todamateria.com.br/dna/>>. Acesso em: 20 set. 2018.

43 ESCOLA KIDS. **Anticorpos**. 2018. Disponível em: <<https://escolakids.uol.com.br/anticorpos.htm>>. Acesso em: 20 set. 2018.

44 PHYS.ORG. **Scientists find donut-shaped structure of enzyme involved in energy metabolism**. 2018. Disponível em: <<https://phys.org/news/2010-02-scientists-donut-shaped-enzyme-involved-energy.html>>. Acesso em: 20 set. 2018.

45 CRESPILO, F. N. et al. The origin of the molecular interaction between amino acids and gold nanoparticles: a theoretical and experimental investigation. **Chemical Physics Letters**, v. 469, n. 1–3, p. 186–190, 2009.

46 CRESPILO, F. N. et al. Enzyme immobilization on Ag nanoparticles/polyaniline nanocomposites. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 10, p. 3073–3077, 2009.

47 CHIKKAVEERIAH, B. V. et al. Single-wall carbon nanotube forest arrays for immunoelectrochemical measurement of four protein biomarkers for prostate cancer.

Analytical Chemistry, v. 81, n. 21, p. 9129–9134, 2009.

48 MERCANTE, L. A. et al. Electrospun polyamide 6/poly(allylamine hydrochloride) nanofibers functionalized with carbon nanotubes for electrochemical detection of dopamine. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 8, p. 4784–4790, 2015.

49 ALWARAPPAN, S. et al. Chitosan-modified graphene electrodes for DNA mutation analysis. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 686, p. 69–72, 2012. doi: 10.1016/j.jelechem.2012.09.026.

50 JANEGITZ, B. C. et al. Electrochemical determination of estradiol using a thin film containing reduced graphene oxide and dihexadecylphosphate. **Materials Science and Engineering C**, v. 37, p. 14–19, 2014. doi:10.1016/j.msec.2013.12.026.

51 SIQUEIRA, J. R. et al. Penicillin biosensor based on a capacitive field-effect structure functionalized with a dendrimer/carbon nanotube multilayer. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 2, p. 497–501, 2009.

52 SUN, J. S. et al. Point-of-care biochemical assays using gold nanoparticle-implemented microfluidics. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 17, p. 6239–6253, 2014.

53 JANEGITZ, B. C. et al. Direct electrochemistry of tyrosinase and biosensing for phenol based on gold nanoparticles electrodeposited on a boron-doped diamond electrode. **Diamond and Related Materials**, v. 25, p. 128–133, 2012. doi: 10.1016/j.diamond.2012.02.023.

54 NEVES, M. M. M. P. S. et al. Multiplexed electrochemical immunosensor for detection of celiac disease serological markers. **Sensors and Actuators B- chemical**, v. 187, p. 33–39, 2013. doi: 10.1016/j.snb.2012.09.019.

55 CHIKKAVEERIAIAH, B. V. et al. Microfluidic electrochemical immunoarray for ultrasensitive detection of two cancer biomarker proteins in serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 11, p. 4477–4483, 2011.

56 LEE, T. M. H. et al. Microfabricated PCR-electrochemical device for simultaneous DNA amplification and detection. **Lab on a Chip**, v. 3, n. 2, p. 100–105, 2003.

57 CHUMBIMUNI-TORRES, K. Y. et al. Potentiometric biosensing of proteins with ultrasensitive ion-selective microelectrodes and nanoparticle labels. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 42, p. 13676–13677, 2006.

58 MERCK MILLIPORE. **Rapid lateral flow test strips**: considerations for product development. 2018. Disponível em: <http://www.emdmillipore.com/Web-US-Site/en_CA/-/USD/ShowDocument-File?ProductSKU=MM_NF-HF13504S30&DocumentId=201306.12550.ProNet&DocumentType=TI&Language=EN&Country=NF&Origin=SERP>. Acesso em: 5 set. 2018.

59 LIU, B. et al. Paper-based electrochemical biosensors: from test strips to paper-based microfluidics. **Electroanalysis**, v. 26, n. 6, p. 1214–1223, 2014.

60 DEQUAIRE, M. et al. An electrochemical metalloimmunoassay based on a colloidal gold label. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 22, p. 5521–5528, 2000.

61 MUBAMMAD-TAHIR, Z. et al. A conductometric biosensor for biosecurity. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, n. 5–6, p. 813–819, 2003.

- 62 LIN, Y. Y. et al. A nanoparticle label/immunochromatographic electrochemical biosensor for rapid and sensitive detection of prostate-specific antigen. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, n. 11, p. 1659–1665, 2008.
- 63 LI, Z. et al. Rapid and sensitive detection of protein biomarker using a portable fluorescence biosensor based on quantum dots and a lateral flow test strip. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 16, p. 7008–7014, 2010.
- 64 CHOI, D. H. et al. A dual gold nanoparticle conjugate-based lateral flow assay (LFA) method for the analysis of troponin I. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 8, p. 1999–2002, 2010.
- 65 STREETS, A. M.; HUANG, Y. Chip in a lab: microfluidics for next generation life science research. **Biomicrofluidics**, v. 7, n. 1, p. 11302, 2013.
- 66 CATE, D. M. et al. Recent developments in paper-based microfluidic devices. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 1, p. 19–41, 2015.
- 67 STRADIOTTO, N. R. et al. Electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 159–173, 2003.
- 68 WANG, J. Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 10, p. 1887–1892, 2006.
- 69 QUESADA-GONZÁLEZ, D.; MERKOÇI, A. Nanoparticle-based lateral flow biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 73, p. 47–63, 2015. doi: 10.1016/j.bios.2015.05.050.
- 70 SINAWANG, P. D. et al. Electrochemical lateral flow immunosensor for detection and quantification of dengue NS1 protein. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 77, p. 400–408, 2016. doi: 10.1016/j.bios.2015.09.048.
- 71 DU, D. et al. Integrated lateral flow test strip with electrochemical sensor for quantification of phosphorylated cholinesterase: biomarker of exposure to organophosphorus agents. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 1380–1385, 2012.
- 72 PRINCETON APPLIED RESEARCH. **Fundamentals of stripping voltammetry, application note S-6**. 2018. Disponível em: <https://www.ameteksi.com/-/media/ameteksi/download_links/documentations/library/princetonappliedresearch/application_note_s-6.pdf?la=en>. Acesso em: 10 out. 2018.
- 73 PACHECO, W. F. et al. Voltametrias: uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.
- 74 BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods - fundamentals and applications**. New York: Wiley, 2001.
- 75 RENEDO, O. D. et al. Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. **Talanta**, v. 73, n. 2, p. 202–219, 2007.
- 76 KRÖGER, S. et al. Imprinted polymer-based sensor system for herbicides using differential-pulse voltammetry on screen-printed electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 17, p. 3698–3702, 1999.
- 77 ANDREESCU, S. et al. Immobilization of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes: comparative study between three immobilization methods and applications to the detection of organophosphorus insecticides. **Analytica Chimica Acta**, v. 464,

n. 2, p. 171–180, 2002.

78 METTAKOONPITAK, J. et al. Electrochemistry on paper-based analytical devices: a review. **Electroanalysis**, v. 28, n. 7, p. 1420–1436, 2016.

79 FU, E. et al. Enhanced sensitivity of lateral flow tests using a two-dimensional paper network format. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 20, p. 7941–7946, 2011.

80 HOSSAIN, S. M. Z. et al. Reagentless bidirectional lateral flow bioactive paper sensors for detection of pesticides in beverage and food samples. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 21, p. 9055–9064, 2009.

81 LIU, J. et al. A simple and sensitive “Dipstick” test in serum based on lateral flow separation of aptamer-linked nanostructures. **Angewandte Chemie**, v. 118, n. 47, p. 8123–8127, 2006.

82 LINARES, E. M. et al. Enhancement of the detection limit for lateral flow immunoassays: Evaluation and comparison of bioconjugates. **Journal of Immunological Methods**, v. 375, n. 1, p. 264–270, 2012.

83 ABERA, A.; CHOI, J.-W. Quantitative lateral flow immunosensor using carbon nanotubes as label. **Analytical Methods**, v. 2, n. 11, p. 1819–1822, 2010.

84 LOU, S. C. et al. One-step competitive immunochromatographic assay for semiquantitative determination of lipoprotein(a) in plasma. **Clinical Chemistry**, v. 39, n. 4, p. 619–624, 1993.

85 PARK, J.-M. et al. Chemiluminescence lateral flow immunoassay based on Pt nanoparticle with peroxidase activity. **Analytica Chimica Acta**, v. 853, p. 360–367, 2015.

86 KIMLING, J. et al. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 32, p. 15700–15707, 2006.

87 HAISS, W. et al. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 11, p. 4215–4221, 2007.

88 GE HEALTHCARE. **Protein A sepharose CL-4B**. 2006. Disponível em: <<http://wwwuser.gwdg.de/~jgrossh/protocols/Biochem/ProtA-Sepha.pdf>>LINK>. Acesso em: 10 out. 2018.

89 FERNÁNDEZ, J. G. et al. Development of nitrocellulose membrane filters impregnated with different biosynthesized silver nanoparticles applied to water purification. **Talanta**, v. 146, p. 237–243, 2016. doi: 10.1016/j.talanta.2015.08.060.

90 PUMERA, M. et al. Direct voltammetric determination of gold nanoparticles using graphite-epoxy composite electrode. **Electrochimica Acta**, v. 50, n. 18, p. 3702–3707, 2005.

91 NG, B. Y. C. et al. Rapid, single-cell electrochemical detection of *Mycobacterium tuberculosis* using colloidal gold nanoparticles. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 20, p. 10613–10618, 2015.

92 GILLESPIE, A. et al. Gold nanoparticle determination by inductively coupled plasma-mass spectrometry, anodic stripping voltammetry, and flame atomic absorption spectrophotometry. **Analytical Letters**, v. 45, n. 10, p. 1310–1320, 2012.

- 93 QIN, X. et al. Ultrasensitive electrochemical immunoassay of proteins based on in situ duple amplification of gold nanoparticle biolabel signals. **Chemical Communications**, v. 51, n. 40, p. 8540–8543, 2015.
- 94 LA ESCOSURA-MUNIZ, A. et al. Size-dependent direct electrochemical detection of gold nanoparticles: application in magnetoimmunoassays. **Nanoscale**, v. 3, n. 8, p. 3350–3356, 2011.
- 95 WANG, J. et al. Metal nanoparticle-based electrochemical stripping potentiometric detection of DNA hybridization. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 22, p. 5576–5581, 2001.
- 96 FANG, Z. et al. Lateral flow nucleic acid biosensor for Cu²⁺ detection in aqueous solution with high sensitivity and selectivity. **Chemical Communications**, v. 46, n. 47, p. 9043–9045, 2010.
- 97 NGOM, B. et al. Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 3, p. 1113–1135, 2010.
- 98 JAZAYERI, M. H. et al. Colorimetric detection based on gold nanoparticles (GNPs): An easy, fast, inexpensive, low-cost and short time method in detection of analytes (protein, DNA and ion). **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 20, p. 1-8, 2018.
- 99 DOECKE, J. D. et al. Blood-based protein biomarkers for diagnosis of Alzheimer disease. **Archives of Neurology**, v. 69, n. 10, p. 1318–1325, 2012.
- 100 HU, W.T. et al. Plasma multianalyte profiling in mild cognitive impairment and Alzheimer disease. **Neurology**, v. 79, n. 9, p. 897–905, 2012.
- 101 PANDI-PERUMAL, S. R. et al. Melatonin: nature's most versatile biological signal? **FEBS Journal**, v. 273, n. 13, p. 2813–2838, 2006.
- 102 CLAUSTRAT, B. et al. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep Medicine Reviews**, v. 9, n. 1, p. 11–24, 2005.
- 103 BARRENETXE, J. et al. Physiological and metabolic functions of melatonin. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 61–72, 2004.
- 104 MARKUS, R. P. et al. The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. **Neuroimmunomodulation**, v. 14, n. 3–4, p. 126–133, 2007.
- 105 MUXEL, S. M. et al. The RelA/cRel nuclear factor- κ B (NF- κ B) dimer, crucial for inflammation resolution, mediates the transcription of the key enzyme in melatonin synthesis in RAW 264.7 macrophages. **Journal of Pineal Research**, v. 60, n. 4, p. 394–404, 2016.
- 106 PINATO, L. et al. Selective protection of the cerebellum against intracerebroventricular LPS is mediated by local melatonin synthesis. **Brain Structure and Function**, v. 220, n. 2, p. 827–840, 2015.
- 107 COUTO-MORAES, R. et al. The immune–pineal axis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1153, n. 1, p. 193–202, 2009.
- 108 ALMEIDA, E. A. et al. Measurement of melatonin in body fluids: standards, protocols and procedures. **Child's Nervous System**, v. 27, n. 6, p. 879–891, 2011.

- 109 BENLOUCIF, S. et al. Measuring melatonin in humans. **Journal of Clinical Sleep Medicine**, v. 4, n. 1, p. 66–69, 2008.
- 110 TOUITOU, Y. Human aging and melatonin. clinical relevance. **Experimental Gerontology**, v. 36, n. 7, p. 1083–1100, 2001.
- 111 ROLČÍK, J. et al. Isolation of melatonin by immunoaffinity chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 775, n. 1, p. 9–15, 2002.
- 112 FOULKES, N. S. et al. Rhythmic transcription: the molecular basis of circadian melatonin synthesis. **Biology of the Cell**, v. 89, n. 8, p. 487–494, 2012.
- 113 SRINIVASAN, R. et al. **What is the molecular basis of sleep regulation**. 2018. Disponível em: <<https://sites.tufts.edu/sleep/>>. Acesso em: 10 out. 2018.
- 114 BORJIGIN, J. et al. Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in pineal gland. **Nature**, v. 378, n. 6559, p. 783–785, 1995.
- 115 ROSEBOOM, P. H. et al. Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. **Endocrinology**, v. 137, n. 7, p. 3033–3045, 1996.
- 116 GANGULY, S. et al. Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 14, p. 8083–8088, 2001.
- 117 BENYASSI, A. et al. Melatonin synthesis: arylalkylamine N-acetyltransferases in trout retina and pineal organ are different. **Neuroreport**, v. 11, n. 2, p. 255–258, 2000.
- 118 BUBENIK, G. A. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 47, n. 10, p. 2336–2348, 2002.
- 119 CARRILLO-VICO, A. et al. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v. 18, n. 3, p. 537–539, 2004.
- 120 LIU, Y.-J. et al. Cultured rat cortical astrocytes synthesize melatonin: absence of a diurnal rhythm. **Journal of Pineal Research**, v. 43, n. 3, p. 232–238, 2007.
- 121 PONTES, G. N. et al. Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) - melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. **Journal of Pineal Research**, v. 41, n. 2, p. 136–141, 2006.
- 122 HARDELAND, R. Melatonin in aging and disease — multiple consequences of reduced secretion, options and limits of treatment. **Aging and Disease**, v. 3, n. 2, p. 194–225, 2012.
- 123 DUBOCOVICH, M. L.; MARKOWSKA, M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. **Endocrine**, v. 27, n. 2, p. 101–110, 2005.
- 124 NOSJEAN, O. et al. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 40, p. 31311–31317, 2000.
- 125 NOSJEAN, O. et al. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. **Biochemical**

Pharmacology, v. 61, n. 11, p. 1369–1379, 2001.

126 MAILLIET, F. et al. Characterization of the melatoninergic MT3 binding site on the NRH:quinone oxidoreductase 2 enzyme. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 1–2, p. 74–88, 2005.

127 HARDELAND, R. et al. Melatonin - a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. **Progress in Neurobiology**, v. 93, n. 3, p. 350–384, 2011.

128 CARLBERG, C.; WIESENBERG, I. The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: an unexpected relationship. **Journal of Pineal Research**, v. 18, n. 4, p. 171–178, 1995.

129 CARLBERG, C. Gene regulation by melatonin. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 917, p. 387–396, 2000. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05403.x.

130 CARRILLO-VICO, A. et al. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. **Endocrine**, v. 27, n. 2, p. 189–200, 2005.

131 HARDELAND, R. Melatonin: signaling mechanisms of a pleiotropic agent. **BioFactors**, v. 35, n. 2, p. 183–192, 2009.

132 LARANJEIRA-SILVA, M. F. et al. Melatonin attenuates Leishmania (L.) amazonensis infection by modulating arginine metabolism. **Journal of Pineal Research**, v. 59, n. 4, p. 478–487, 2015.

133 FRANCO, D. G.; MARKUS, R. P. The cellular state determines the effect of melatonin on the survival of mixed cerebellar cell culture. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e106332, 2014.

134 ERIKA, C. et al. Relevance of the chronobiological and non-chronobiological actions of melatonin for enhancing therapeutic efficacy in neurodegenerative disorders. **Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery**, v. 5, n. 2, p. 91–99, 2011.

135 SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S. et al. Glia-pinealocyte network: the paracrine modulation of melatonin synthesis by tumor necrosis factor (TNF). **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40142, 2012.

136 LOTUFO, C. M. et al. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. **European Journal of Pharmacology**, v. 430, n. 2–3, p. 351–357, 2001.

137 LOTUFO, C. M. C. et al. Melatonin effect on endothelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotriene B4. **European Journal of Pharmacology**, v. 534, n. 1–3, p. 258–263, 2006.

138 SKWARLO-SONTA, K. et al. Bidirectional communication between the pineal gland and the immune system. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 81, n. 4, p. 342–349, 2003.

139 MAJEWSKI, P. et al. Seasonality of pineal gland activity and immune functions in chickens. **Journal of Pineal Research**, v. 39, n. 1, p. 66–72, 2005.

140 MALDONADO, M. D. et al. Evidence of melatonin synthesis and release by mast cells. possible modulatory role on inflammation. **Pharmacological Research**, v. 62, n.

3, p. 282–287, 2010.

141 GARCIA-MAURINO, S. et al. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. **Journal of Immunology**, v. 159, n. 2, p. 574–581, 1997.

142 GARCIA-MAURINO, S. et al. Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. **Life Sciences**, v. 65, n. 20, p. 2143–2150, 1999.

143 SRINIVASAN, V. et al. Role of melatonin in neurodegenerative diseases. **Neurotoxicity Research**, v. 7, n. 4, p. 293–318, 2005.

144 MAESTRONI, G. J. M. et al. Does melatonin play a disease-promoting role in rheumatoid arthritis? **Journal of Neuroimmunology**, v. 158, n. 1–2, p. 106–111, 2005.

145 CUTOLO, M.; MAESTRONI, G. The melatonin-cytokine connection in rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 64, n. 8, p. 1109–1111, 2005.

146 FORREST, C. M. et al. Inflammatory status and kynurenine metabolism in rheumatoid arthritis treated with melatonin. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 64, n. 4, p. 517–526, 2007.

147 POEGGELER, B. et al. Melatonin - a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 738, p. 419–420, 1994. doi: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb21831.x.

148 TAN, D. et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 2, p. 181–197, 2002.

149 ROSEN, J. et al. Interactions of melatonin and its metabolites with the ABTS cation radical: extension of the radical scavenger cascade and formation of a novel class of oxidation products, C2-substituted 3-indolinones. **Journal of Pineal Research**, v. 41, n. 4, p. 374–381, 2006.

150 HARDELAND, R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. **Endocrine**, v. 27, n. 2, p. 119–130, 2005.

151 PANDI-PERUMAL, S. R. et al. Melatonin. **FEBS Journal**, v. 273, n. 13, p. 2813–2838, 2006.

152 HAIMOV, I. et al. Sleep disorders and melatonin rhythms in elderly people. **BMJ**, v. 309, n. 6948, p. 167, 1994.

153 BROWN, R. et al. Differences in nocturnal melatonin secretion between melancholic depressed patients and control subjects. **American Journal of Psychiatry**, v. 142, n. 7, p. 811–816, 1985.

154 HASLER, B. P. et al. Phase relationships between core body temperature, melatonin, and sleep are associated with depression severity: further evidence for circadian misalignment in non-seasonal depression. **Psychiatry Research**, v. 178, n. 1, p. 205–207, 2010.

- 155 PAULIS, L. et al. Blood pressure modulation and cardiovascular protection by melatonin: potential mechanisms behind. **Physiological Research**, v. 56, n. 6, p. 671–684, 2007.
- 156 CARDINALI, D. P. et al. Clinical aspects of melatonin intervention in Alzheimers disease progression. **Current Neuropharmacology**, v. 8, n. 3, p. 218–227, 2010.
- 157 LIU, R.-Y. et al. Decreased melatonin levels in postmortem cerebrospinal fluid in relation to aging, Alzheimer's disease, and Apolipoprotein E- ϵ 4/4 genotype. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, n. 1, p. 323–327, 1999.
- 158 DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, A. et al. Melatonin and circadian biology in human cardiovascular disease. **Journal of Pineal Research**, v. 49, n. 1, p. 14–22, 2010.
- 159 SHARMA, S. et al. The role of melatonin in diabetes: therapeutic implications. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 59, n. 5, p. 391–399, 2015.
- 160 SCHERNHAMMER, E. S.; HANKINSON, S. E. Urinary melatonin levels and breast cancer risk. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 97, n. 14, p. 1084–1087, 2005.
- 161 SORIA, V. et al. Resequencing and association analysis of arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) gene and its contribution to major depression susceptibility. **Journal of Pineal Research**, v. 49, n. 1, p. 35–44, 2010.
- 162 HA, E. et al. Positive relationship between melatonin receptor type 1B polymorphism and rheumatoid factor in rheumatoid arthritis patients in the Korean population. **Journal of Pineal Research**, v. 39, n. 2, p. 201–205, 2005.
- 163 HU, C. et al. Effects of GCK, GCKR, G6PC2 and MTNR1B variants on glucose metabolism and insulin secretion. **PloS ONE**, v. 5, n. 7, p. e11761, 2010.
- 164 TAM, C. H. T. et al. Common polymorphisms in MTNR1B, G6PC2 and GCK are associated with increased fasting plasma glucose and impaired beta-cell function in Chinese subjects. **PloS ONE**, v. 5, n. 7, p. e11428, 2010.
- 165 SAMIMI-FARD, S. et al. A case-control study of melatonin receptor type 1A polymorphism and acute myocardial infarction in a Spanish population. **Journal of Pineal Research**, v. 51, n. 4, p. 400–404, 2011.
- 166 BLASK, D. E. et al. Putting cancer to sleep at night: the neuroendocrine/circadian melatonin signal. **Endocrine**, v. 27, n. 2, p. 179–188, 2005.
- 167 HILL, S. M. et al. Melatonin synergizes with retinoic acid in the prevention and regression of breast cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 460, p. 345–362, 1999.
- 168 AGÊNCIA FAPESP. **Nível de melatonina pode indicar grau de malignidade de tumores**. 2018. Disponível em: <<http://agencia.fapesp.br/nivel-de-melatonina-pode-indicar-grau-de-malignidade-de-tumores-/28115/>>. Acesso em 10 de outubro de 2018.
- 169 SKENE, D. J.; SWAAB, D. F. Melatonin rhythmicity: effect of age and Alzheimer's disease. **Experimental Gerontology**, v. 38, n. 1–2, p. 199–206, 2003.
- 170 WU, Y.-H.; SWAAB, D. F. Disturbance and strategies for reactivation of the circadian rhythm system in aging and Alzheimer's disease. **Sleep Medicine**, v. 8, n. 6, p. 623–636, 2007.

- 171 MATSUBARA, E. et al. Melatonin increases survival and inhibits oxidative and amyloid pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 85, n. 5, p. 1101–1108, 2003.
- 172 FENG, Z. et al. Melatonin alleviates behavioral deficits associated with apoptosis and cholinergic system dysfunction in the APP 695 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Journal of Pineal Research**, v. 37, n. 2, p. 129–136, 2004.
- 173 QUINN, J. et al. Chronic melatonin therapy fails to alter amyloid burden or oxidative damage in old Tg2576 mice: implications for clinical trials. **Brain Research**, v. 1037, n. 1–2, p. 209–213, 2005.
- 174 SEWERYNEK, E. Melatonin and the cardiovascular system. **Neuro Endocrinology Letters**, v. 23, n. S1, p. 79–83, 2002.
- 175 REITER, R. J.; TAN, D.-X. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. **Cardiovascular Research**, v. 58, n. 1, p. 10–19, 2003.
- 176 TENGATTINI, S. et al. Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 44, n. 1, p. 16–25, 2007.
- 177 MAYO, J. C. et al. Melatonin prevents apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuronal cells: implications for Parkinson's disease. **Journal of Pineal Research**, v. 24, n. 3, p. 179–192, 1998.
- 178 ANTOLIN, I. et al. Protective effect of melatonin in a chronic experimental model of Parkinson's disease. **Brain Research**, v. 943, n. 2, p. 163–173, 2002.
- 179 JAMES, S. P. et al. Melatonin administration in insomnia. **Neuropsychopharmacology**: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, v. 3, n. 1, p. 19–23, 1990.
- 180 KARBOWNIK, M. et al. Anticarcinogenic actions of melatonin which involve antioxidative processes: comparison with other antioxidants. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, n. 8, p. 735–753, 2001.
- 181 BARTSCH, C. et al. Melatonin in clinical oncology. **Neuro Endocrinology Letters**, v. 23, n. S1, p. 30–38, 2002.
- 182 HERXHEIMER, A.; PETRIE, K. J. Melatonin for the prevention and treatment of jet lag. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2002, n. 2, p. CD001520, 2002.
- 183 TAYLOR, D. et al. Antidepressant efficacy of agomelatine: meta-analysis of published and unpublished studies. **BMJ**, v. 348, p. g1888, 2014. doi: 10.1136/bmj.g1888.
- 184 FLORA, S. J. et al. Lead induced oxidative stress and its recovery following co-administration of melatonin or N-acetylcysteine during chelation with succimer in male rats. **Cellular and Molecular Biology**, v. 50, p. OL543-51, 2004. doi: 10.1170/67.
- 185 WALDHAUSER, F. et al. Alterations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 66, n. 3, p. 648–652, 1988.
- 186 KARASEK, M. Melatonin, human aging, and age-related diseases. **Experimental**

Gerontology, v. 39, n. 11-12, p. 1723-1729, 2004.

187 THERMO FISHER SCIENTIFIC. **General sandwich ELISA protocol**. 2018. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/elisa-protocol/general-elisa-protocol.html#prot4>>. Acesso em 15 set. 2018.

188 PENINSULA LABORATORIES INTERNATIONAL. **Peptide radioimmunoassay protocol**. 2018. Disponível em: <http://penlabs.com/wp-content/uploads/2014/06/RIA-protocol-050814_PLI-Inc.pdf>. Acesso em: 15 set. 2018.

189 PHOENIX PHARMACEUTICALS. **General protocol for radioimmunoassay kit**. 2018. Disponível em: <http://www.phoenixbiotech.net/catalog/repository/QCdata_RIK/10-1280-color-RIA.pdf>. Acesso em: 15 set. 2018.

190 FERRUA, B.; MASSEYEFF, R. Immunoassay of melatonin with enzyme-labeled antibodies. **Journal of Immunoassay**, v. 6, n. 1–2, p. 79–94, 1985.

191 ALPCO. **Direct melatonin RIA**. 2018. Disponível em: <<https://www.alpco.com/store/direct-melatonin-ria.html>>. Acesso em: 10 out. 2018.

192 MYBIOSOURCE. **Human melatonin ELISA Kit**. 2018. Disponível em: <https://www.mybiosource.com/prods/ELISA-Kit/Human/Melatonin-MT/MT/datasheet.php?products_id=704506>. Acesso em: 10 out. 2018.

193 BRAZACA, L. C. et al. Nanostructured materials and nanoparticles for point of care (POC) medical biosensors. In: NARAYAN, R. J. **Medical biosensors for point of care (POC) applications**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2017. cap. 10, p. 229–254.

194 JANEGITZ, B.C. et al. Disposable biosensors for clinical diagnosis. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 378–389, 2014.

195 LASSETER, T. L. et al. Frequency-dependent electrical detection of protein binding events. **Analyst**, v. 129, n. 1, p. 3–8, 2004.

196 DAMOS, F. S. et al. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)ssensores. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 970–979, 2004.

197 APETREI, I. M.; APETREI, C. Voltammetric determination of melatonin using a graphene-based sensor in pharmaceutical products. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 1859–1866, 2016. doi: 10.2147/IJN.S104941.

198 TADAYON, F.; SEPEHRI, Z. A new electrochemical sensor based on a nitrogen-doped graphene/CuCo₂O₄ nanocomposite for simultaneous determination of dopamine, melatonin and tryptophan. **RSC Advances**, v. 5, n. 80, p. 65560–65568, 2015.

199 KUMAR, N. et al. Nanopalladium grained polymer nanocomposite based sensor for the sensitive determination of melatonin. **Electrochimica Acta**, v. 211, p. 18–26, 2016. doi: 10.1016/j.electacta.2016.06.023

200 LEHNINGER, A. L. et al. **Lehninger principles of biochemistry**. New York: W.

H. Freeman, 2006.

201 BRAZACA, L. C. et al. An antibody-based platform for melatonin quantification. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 171, n. 94-100, 2018. doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.07.006.

202 KHAN, M. Z. H. et al. Electrochemical detection of tyramine with ITO/APTES/ErGO electrode and its application in real sample analysis. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 108, p. 76–81, 2018. doi: 10.1016/j.bios.2018.02.042.

203 MOHAMMED, M. I.; DESMULLIEZ, M. P. Y. Autonomous capillary microfluidic system with embedded optics for improved troponin I cardiac biomarker detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 61, p. 478–484, 2014. doi: 10.1016/j.bios.2014.05.042.

204 BRAZACA, L. C. **Desenvolvimento de um sistema para o diagnóstico precoce do diabetes mellitus tipo 2**. 2015. 111 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

205 NAIK, K. M. et al. Elucidation of binding mechanism of hydroxyurea on serum albumins by different spectroscopy studies. **SpringerPlus**, v. 3, p. 360, 2014. doi: 10.1186/2193-1801-3-360.

206 VALTINER, M. et al. The electrochemical surface forces apparatus: the effect of surface roughness, electrostatic surface potentials, and anodic oxide growth on interaction forces, and friction between dissimilar surfaces in aqueous solutions. **Langmuir**, v. 28, n. 36, p. 13080–13093, 2012.

207 BOSWELL, C. A. et al. Effects of charge on antibody tissue distribution and pharmacokinetics. **Bioconjugate Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 2153–2163, 2010.

208 SIGMA ALDRICH. **Bovine serum albumin**. 2018. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a2153?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 10 out. 2018.

209 RÖMSING, S.; ROMSING, S. **Development and validation of bioanalytical methods application to melatonin and selected anti-infective drugs**. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis, 2010.

210 CARTER, M. D. et al. Quantitation of melatonin and n-acetylserotonin in human plasma by nanoflow LC-MS/MS and electrospray LC-MS/MS. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, n. 3, p. 277–285, 2012.

211 MESSNER, M. et al. Presence of melatonin in the human hepatobiliary-gastrointestinal tract. **Life Sciences**, v. 69, n. 5, p. 543–551, 2001.

212 TAN, D. et al. High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. **Life Sciences**, v. 65, n. 23, p. 2523–2529, 1999.

213 TECAN. **Melatonin ELISA**. 2018. Disponível em: <<http://www.ibl-international.com/en/melatonin-elisa>>. Acesso em: 10 out. 2018.

214 U-CYTECH BV. **Instruction manual ELISA kit**. 2018. Disponível em: <https://www.ucytech.com/sites/default/files/manuals/ELISA_manual.pdf>. Acesso em: 10 out. 2018.

215 VASEASHTA, A.; DIMOVA-MALINOVSKA, D. Nanostructured and nanoscale

devices, sensors and detectors. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 6, n. 3, p. 312–318, 2005.

216 BIOCOMPARE. **Melatonin ELISA kits**. 2018. Disponível em: <https://www.biocompare.com/pfu/110627/soids/2-4313/ELISA_Kit/ELISA_Melatonin>. Acesso em: 10 out. 2018.

217 DELTA TECHNOLOGIES. **Corning® Boro-Aluminosilicate glass products**. 2018. Disponível em: <<http://www.delta-technologies.com/products.asp?C=1>>. Acesso em: 10 jun. 2018.

218 SIGMA ALDRICH. **(3-Aminopropyl)triethoxysilane**. 2018. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/440140?lang=en®ion=US&gclid=Cj0KCQjw0a7YBRDnARIsAJgsF3NgPgvrslUgqoOx_0Zu1K2IHRqqr99ob0wLq09prLG-Q8WCi6TBxgaAjtSEALw_wcB>. Acesso em: 10 jun. 2018.

219 SIGMA ALDRICH. **N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride**. 2018. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/440140?lang=en®ion=US&gclid=Cj0KCQjw0a7YBRDnARIsAJgsF3NgPgvrslUgqoOx_0Zu1K2IHRqqr99ob0wLq09prLG-Q8WCi6TBxgaAjtSEALw_wcB>. Acesso em: 10 jun. 2018.

220 SIGMA ALDRICH. **N-Hydroxysuccinimide**. 2018. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/130672?lang=en®ion=US>>. Acesso em: 10 out. 2018.

221 FISHER SCIENTIFIC. **Anti-melatonin, polyclonal, invitrogen**. 2018. Disponível em: <<https://www.fishersci.com/shop/products/anti-melatonin-polyclonal-thermo-scientific-pierce-1ml-unlabeled/pa185053>>. Acesso em: 10 jun. 2018.

222 NATIONAL CONFERENCE OF STATES LEGISLATURES. **State minimum wages**. 2018. Disponível em: <<http://www.ncsl.org/research/labor-and-employment/state-minimum-wage-chart.aspx>>. Acesso em: 10 jun. 2018.

223 LEVENT, A. Electrochemical determination of melatonin hormone using a boron-doped diamond electrode. **Diamond and Related Materials**, v. 21, p. 114–119, 2012. doi: 10.1016/j.diamond.2011.10.018.

224 BABAEI, A. et al. Nanomolar simultaneous determination of levodopa and melatonin at a new cobalt hydroxide nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes composite modified carbon ionic liquid electrode. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 183, p. 265–272, 2013. doi: 10.1016/j.snb.2013.03.101.

225 WEI, S. L. et al. Study of melatonin sensor based on molecular imprinting technique and electropolymerization membrane. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 40, n. 8, p. 1219–1224, 2012.

226 GUPTA, P.; GOYAL, R. N. Graphene and co-polymer composite based molecularly imprinted sensor for ultratrace determination of melatonin in human biological fluids. **RSC Advances**, v. 5, n. 50, p. 40444–40454, 2015.

227 DIALLO, D.; TCHERNIA, G. Sick cell disease in Africa. **Current Opinion in Hematology**, v. 9, n. 2, p. 111–116, 2002.

228 DELICAT-LOEMBET, L. M. et al. Prevalence of the sickle cell trait in Gabon: a nationwide study. **Infection Genetics and Evolution**, v. 25, p. 52–56, 2014. doi:

10.1016/j.meegid.2014.04.003

229 PIEL, F. B. et al. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. **Nature Communications**, v. 1, p. 104, 2010. doi: 10.1038/ncomms1104.

230 GUIMARÃES, C. T. L. et al. The importance of genetic counseling at sickle cell anemia. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. S1, p. 1733–1740, 2010.

231 CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. Sickle cell disease in Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 203–206, 2007.

232 KUMAR, R. et al. Sickle cell anemia-molecular diagnosis and prenatal counseling: SGPGI experience. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 79, n. 1, p. 68–74, 2012.

233 LUKIN, J. A.; HO, C. The structure–function relationship of hemoglobin in solution at atomic resolution. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 3, p. 1219–1230, 2004.

234 COSTA, F. F. et al. Anemia falciforme. In: ZAGO, M. A. et al. (Ed.) **Tratado de hematologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. cap 27, p. 205–223.

235 SILVA, R. B. P.; RAMALHO, A. S. Risks and benefits of genetic screening: the sickle cell trait as a model in a Brazilian population group. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 13, n. 2, p. 285–294, 1997.

236 BARANY, F. Genetic-disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 1, p. 189–193, 1991.

237 SYVANEN, A. C. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 12, p. 930–942, 2001.

238 ZAGO, M. **A anemia falciforme e doenças falciformes**. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

239 REES, D. C. et al. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 376, n. 9757, p. 2018–2031, 2010.

240 PAULING, L. et al. Sickle cell anemia, a molecular disease. **Science**, v. 110, n. 2865, p. 543–548, 1949.

241 WANG, W. C. et al. Hydroxycarbamide in very young children with sickle-cell anaemia: a multicentre, randomised, controlled trial (BABY HUG). **Lancet**, v. 377, n. 9778, p. 1663–1672, 2011.

242 ALVES, A. L. Estudo da mortalidade por anemia falciforme. **Informe Epidemiológico do SUS**, v. 5, n. 4, p. 45–53, 1996.

243 DINIZ, D.; GUEDES, C. Confidencialidade, aconselhamento genético e saúde pública: um estudo de caso sobre o traço falciforme. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 3, p. 747–755, 2005.

244 BENDER, M. A.; SEIBEL, G. D. **Sickle cell disease**. Seattle: University of Washington, 2003.

245 REICHERT, A. P. S.; PACÍFICO, V. C. Conhecimento de mães quanto à importância do teste do pézinho. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 56, n. 3, p.

226–229, 2003.

246 RIO GRANDE DO SUL (Estado) Secretaria da Saúde. **Teste do pezinho**. 2018. Disponível em: <<http://www.saude.rs.gov.br/teste-do-pezinho>>. Acesso em: 10 out. 2018.

247 AYATOLLAHI, M.; HAGHSHENAS, M. Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of sickle cell disease in Iran. **Archive of Iranian Medicine**, v. 7, n. 2, p. 84–88, 2004.

248 SILVA, N. C. H. et al. Principais técnicas para o diagnóstico da anemia falciforme: uma revisão de literatura. **Cadernos de Graduação: ciências biológicas e da saúde**, v. 3, n. 2, p. 33–46, 2017.

249 WOITOWICZ, E. J. et al. Traço falciforme: estudo comparativo de técnicas laboratoriais utilizadas para a triagem da doença. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 2, p. 74–79, 2010.

250 BANDEIRA, F. M. G. C. et al. Diagnóstico da hemoglobina S: análise comparativa do teste de solubilidade com a eletroforese em pH alcalino e ácido no período neonatal. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 3, n. 3, p. 265–270, 2003.

251 NAOUM, P. C. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22, n. 1, p. 5–22, 2000.

252 BOEHM, C. D. Use of polymerase chain reaction for diagnosis of inherited disorders. **Clinical Chemistry**, v. 35, n. 9, p. 1843–1848, 1989.

253 ABADI, H. K. F. et al. Development of carbon nanotube based biosensors model for detection of single-nucleotide polymorphism. **Science of Advanced Materials**, v. 6, n. 3, p. 513–519, 2014.

254 SASSOLAS, A. et al. DNA biosensors and microarrays. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 1, p. 109–139, 2008.

255 KALOGIANNI, D. P. et al. Nanoparticle-based DNA biosensor for visual detection of genetically modified organisms. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 7, p. 1069–1076, 2006.

256 MAO, X. L. et al. A nanoparticle amplification based quartz crystal microbalance DNA sensor for detection of Escherichia coli O157: H7. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 7, p. 1178–1185, 2006.

257 ARIKSOYSAL, D. O. et al. Label-free electrochemical hybridization genosensor for the detection of hepatitis B virus genotype on the development of lamivudine resistance. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 15, p. 4908–4917, 2005.

258 PAVLOV, V. et al. Aptamer-functionalized Au nanoparticles for the amplified optical detection of thrombin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 38, p. 11768–11769, 2004.

259 LIU, J. et al. Functional nucleic acid sensors. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 5, p. 1948–1998, 2009.

260 KATZ, E.; WILLNER, I. Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: routes to impedimetric immunosensors, DNA-Sensors, and enzyme biosensors. **Electroanalysis**, v. 15, n.

11, p. 913–947, 2003.

261 KUMAR, M. et al. Highly sensitive and selective oligonucleotide sensor for sickle cell disease gene using photon upconverting nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 5, p. 1522–1526, 2009.

262 BRAZACA, L. C. et al. A genosensor for sickle cell anemia trait determination. **Electroanalysis**, v. 29, n. 3, p. 773–777, 2016.

263 HÄKKINEN, H. The gold–sulfur interface at the nanoscale. **Nature Chemistry**, v. 4, p. 443, 2012. doi: 10.1038/NCHEM.1352

264 PENSA, E. et al. The chemistry of the sulfur–gold interface: in search of a unified model. **Accounts of Chemical Research**, v. 45, n. 8, p. 1183–1192, 2012.

265 ROLIM, T. et al. A nanostructured genosensor for the early diagnosis of systemic arterial hypertension. **Biomedical Microdevices**, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2015.

266 ZHANG, S. S. et al. Electrochemical impedance study on the low temperature of Li-ion batteries. **Electrochimica Acta**, v. 49, n. 7, p. 1057–1061, 2004.

267 ARMBRUSTER, D. A.; PRY, T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. **Clinical Biochemist Reviews**, v. 29, n. S1, p. S49–S52, 2008.

268 ARMBRUSTER, D. A. et al. Limit of detection (LQD)/limit of quantitation (LOQ): comparison of the empirical and the statistical methods exemplified with GC-MS assays of abused drugs. **Clinical Chemistry**, v. 40, n. 7, p. 1233–1238, 1994.

269 LAWSON, G. M. Defining limit of detection and limit of quantitation as applied to drug of abuse testing: striving for a consensus. **Clinical Chemistry**, v. 40, n. 7, p. 1218–1219, 1994.

ANEXOS

Anexo I – Aprovação do Comitê de Ética para a realização dos experimentos com animais

OF.CEUA/IB/007/2014
Proc. 2014.1.149.41.7

São Paulo, 06 de março 2014

Prezada Senhora,

Dirijo-me a V. Sa. para informar que foi **APROVADO "AD-REFERENDUM"** da Comissão de Ética no Uso de Animais do IB (CEUA), nesta data, o Projeto "Eixo Imune-Pineal: integrando a biologia do tempo em condições fisiológicas, fisiopatológicas e patológicas" - **Protocolo nº 198/2014**, de sua responsabilidade (Colaboradores: Zulma F. Silva Ferreira e Pedro Augusto C. M. Fernandes).

A pesquisadora responsável deverá comunicar a esta Comissão qualquer alteração e/ou intercorrência que houver durante a realização da pesquisa.

Lembramos que deverão ser apresentados os relatórios anuais ou final, conforme modelo disponível no link desta Comissão.

Atenciosamente,

Atenciosamente,

Prof. Dra. Mariz Vainzof
Coordenadora da Comissão de Ética no
Uso de Animais - CEUA

Ilma. Sra.
Prof. Dra. REGINA PEKELMANN MARKUS
Departamento de Fisiologia – IB-USP

Rua do Matão • Travessa 14 • nº 321 • Cidade Universitária • São Paulo • SP • CEP 05508-090 • Brasil