

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS**

ISABELLA SAMPAIO DO NASCIMENTO

**Desenvolvimento de biossensor para detecção de nematoides
parasitas de plantas**

São Carlos

2019

ISABELLA SAMPAIO DO NASCIMENTO

**Desenvolvimento de biossensor para detecção de nematoides parasitas
de plantas**

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

Área de concentração: Física Aplicada
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.

Nascimento, isabella Sampaio do
Desenvolvimento de biossensor para detecção de
nematoides parasitas de plantas / isabella Sampaio do
Nascimento; orientador Valtencir Zucolotto - versão
corrigida -- São Carlos, 2019.
121 p.

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

1. Biossensor. 2. Detecção de nematoides. 3. Nematoides
parasitas de plantas. I. Zucolotto, Valtencir, orient.
II. Título.

Aos meus pais, Rosemary e Alfredo,
por todo amor, apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rose e Alfredo, por sempre incentivarem o meu crescimento pessoal e profissional. O amor e o apoio de vocês foram imprescindíveis para que eu concluísse mais essa etapa da minha carreira científica.

Ao meu orientador Prof. Dr. Valtencir Zucolotto pela oportunidade a mim oferecida e pelo valoroso conhecimento transmitido.

A toda equipe do Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia, em especial, aos funcionários Bruna e Romeu, pelo suporte necessário para a realização dos experimentos. Agradeço também aos companheiros de laboratório Paula, Camila, Idelma, Laís Brazaca, Adrislaine, Olavo e Chiquito, sobretudo, pela amizade construída.

Aos alunos de iniciação científica Felipe Quatroni, Juliana Yamauti, Nayla Takeuti e Beatriz Gusson que contribuíram de forma significativa para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À equipe Bayer *CropScience* pelo apoio financeiro e, em especial, ao meu co-orientador Ricardo Duarte pelo suporte técnico necessário para a realização desse projeto de pesquisa.

Aos meus amigos Carol, Letícia e Pedro que estiveram sempre ao meu lado, torcendo e comemorando as minhas conquistas.

Ao meu namorado, Felipe, pela paciência e pelo apoio incondicional nos momentos mais difíceis. Obrigada por tanto!

À toda minha família, em especial, ao meu afilhado Miguel que chegou nesse período e trouxe mais alegria para os meus dias. A minha gratidão e amor por vocês são imensuráveis.

“Meditai se só as nações fortes podem fazer ciência
ou se é a ciência que as torna fortes.”

Walter Oswaldo Cruz

RESUMO

NASCIMENTO, I. S. **Desenvolvimento de biossensor para detecção de nematoides parasitas de plantas.** 2019. 121 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Nematoides parasitas de plantas são microrganismos patogênicos que infectam uma grande variedade de culturas, causando baixa produtividade na plantação e perdas econômicas significativas. A detecção e identificação das espécies é importante para que se escolha a técnica de manejo mais adequada e para que não seja necessário aplicar uma grande quantidade de pesticida. Atualmente, a identificação dos nematoides é feita com base nas características morfométricas observadas por microscopia ou por análise genética através de amplificação por PCR e eletroforese. No entanto, pessoas especializadas e equipamentos de alto custo são requeridos para a realização dessas técnicas. Esse trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de dois biossensores para detecção de nematoides parasitas de plantas: um genossensor eletroquímico e um imunossensor elétrico. Foram selecionadas três espécies mais importantes economicamente: *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus brachyurus*. Para o genossensor, projetou-se as sequências de DNA e para o imunossensor, foram extraídas as proteínas dos indivíduos de cada espécie e produzidos anticorpos policlonais. Eletrodos de ouro descartáveis do tipo multiplex e interdigitados foram desenvolvidos e fabricados para a construção dos biossensores. As caracterizações eletroanalíticas por espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria cíclica mostraram que o genossensor para detecção de sequências de DNA da espécie *M. incognita* foi capaz de diferenciá-las de sequências da espécie *M. javanica*, pertencente ao mesmo gênero. Para o imunossensor, as medidas de impedância elétrica e análise estatística por PCA também apresentaram seletividade. Uma curva de calibração em função da concentração da proteína dos nematoides foi construída, exibindo um limite de detecção de $28,8 \pm 3,2$ ng/mL. Os biossensores desenvolvidos representam uma alternativa rápida, sensível e de baixo custo para a detecção e identificação de nematoides, destacando a portabilidade e possibilidade de medidas *point-of-care* do imunossensor elétrico.

Palavras-chave: Biossensor. Detecção de nematoides. Nematoides parasitas de plantas.

ABSTRACT

NASCIMENTO, I. S. **Development of a biosensor for plant-parasitic nematodes detection.** 2019. 121 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Plant-parasitic nematodes are pathogenic microorganisms that infect a wide variety of crops, causing low crop yields and significant economic losses. The detection and species identification are very important to choose the most appropriate management technique and not to apply a large amount of pesticide. Currently, the nematode identification is based on morphometrics characteristics observed by microscopy or genetic analysis through PCR amplification and electrophoresis. However, specialized people and high-cost equipment are required to perform these techniques. This work aimed to develop two biosensors for detection of plant-parasitic nematodes: an electrochemical genosensor and an electric immunosensor. Three economically important species were selected: *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica* and *Pratylenchus brachyurus*. For the genosensor, DNA sequences were designed and for the immunosensor, proteins from individuals of each species were extracted and polyclonal antibodies were produced. Disposable gold electrodes with multiplex and interdigitated design were developed and fabricated for these biosensors. Electroanalytical characterization by electrochemical impedance spectroscopy and cyclic voltammetry showed that the genosensor for detecting DNA sequences of *M. incognita* species was able to differentiate them from *M. javanica*, a species of the same genus. For the immunosensor, electrical impedance measurements and PCA statistical analysis also showed selectivity. A calibration curve as a function of nematode protein concentration was constructed, showing a limit of detection of $28,8 \pm 3,2$ ng/mL. The developed biosensors represent a fast, sensitive and low-cost alternative for the detection and identification of nematodes, highlighting the portability and possibility of point-of-care measurements of the electric immunosensor.

Keywords: Biosensor. Nematode detection. Plant-parasitic nematode.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1 Morfologia fusiforme dos nematoides (A) e estilete presente nos nematoides fitoparasitas (B) 29
- Figura 3.2 Sintomas das plantas após a infecção por nematoides: crescimento atrofiado e descoloração das plantas (A), formação de cistos (B) e de galhas (C) nas raízes. 30
- Figura 3.3 Princípio de funcionamento de um biossensor: um transdutor é modificado com um elemento biológico que forma uma camada de biorreconhecimento. Na presença do analito, há uma interação específica que gera alterações físico-químicas convertidas pelo transdutor e interpretadas por medidas eletroanalíticas. 33
- Figura 3.4 Etapas de construção do genossensor: Primeiro, as sequências de captura são imobilizadas no eletrodo de ouro. Depois, é feita a imobilização de moléculas intercalantes, como o mercaptoetanol, para o alinhamento das sequências de captura. Por último, na presença do DNA alvo, ocorre a hibridização entre as sequências complementares. 34
- Figura 3.5 Estrutura típica de um anticorpo IgG: quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias idênticas de alto peso molecular e duas cadeias idênticas de baixo peso molecular, unidas por ligações dissulfeto. As quatro cadeias possuem regiões constantes e regiões variáveis, C_L e V_L para as de baixo peso molecular e C_H e V_H para as de alto peso molecular, respectivamente. A estrutura dos anticorpos é também dividida em dois tipos de fragmentos: os fragmentos F_{ab} onde ocorre efetivamente a ligação com o antígeno e o fragmento F_c que se liga aos receptores celulares. 38
- Figura 3.6 Ativação EDC/NHS de grupos carboxílicos para ligação covalente com amina primária. 40
- Figura 3.7 Técnica de voltametria cíclica: A-) onda triangular utilizada para 43

varrer o potencial entre dois valores e B-) voltamograma típico de uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, mostrando os picos de oxidação (E_{pa} , I_{pa}) e de redução (E_{pc} , I_{pc}), com $V_2 > V_1$.

- Figura 3.8 Técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica: circuito equivalente comumente encontrado em biossensores eletroquímicos (A) e diagrama de Nyquist representando a impedância em um plano complexo em função da frequência ω (B). CE: contra-eletrodo; WE: eletrodo de trabalho; RE: eletrodo de referência. 45
- Figura 3.9 Modelo esquemático de um biossensor capacitivo: **A-**) Eletrodo de ouro interdigitado **B-**) Visão lateral de um eletrodo interdigitado modificado com anticorpos quando colocado em uma amostra a ser analisada **C-**) Gráfico típico de uma medida de capacitância. 46
- Figura 3.10 Exemplo de matriz de covariância para três amostras com quatro variáveis distintas. 48
- Figura 3.11 Exemplo de uma matriz ortogonal que diagonaliza a matriz de covariância. Cada coluna dela corresponde a um autovetor. 49
- Figura 4.1 Eletrodos descartáveis fabricados em substrato de vidro pelas técnicas de fotolitografia e *sputtering*: A-) multiplex e B-) interdigitado 52
- Figura 4.2 Reação de redução do DNA de captura (CP) com grupo tiol protegido, utilizando o DTT como agente redutor. 56
- Figura 4.3 Extração de proteínas de nematoides: Amostras coletadas em solo antes da remoção de resíduos (A), processamento em turrax (B) e homogenato contendo as proteínas (C). 58
- Figura 4.4 Montagem do sistema para medidas eletroquímicas: Suporte de contato acoplado ao potenciostato (A) e no detalhe, eletrodo com adesivos para delimitar a área disponível para a solução eletrolítica (B). 60

Figura 4.5	Montagem do sistema para medidas elétricas: Eletrodo interdigitado, com área delimitada por adesivo isolante, é inserido em um suporte de três contatos conectados por dois cabos ao espectrômetro.	61
Figura 5.1	Sistema eletroquímico utilizado como modelo: (A) eletrodo de ouro tipo barra e (B) célula eletroquímica composta também por contra-eletrodo de platina e eletrodo de referência Ag/AgCl.	63
Figura 5.2	Voltamograma do último ciclo de limpeza do eletrodo de barra utilizado para o cálculo da área eletroativa: presença de três picos de oxidação relativos as etapas da formação da monocamada de óxido de ouro e um pico de redução.	65
Figura 5.3	Diagramas de Nyquist representando as etapas de construção da camada de biorreconhecimento com o uso de MCE (A) e de MCH (B) como moléculas intercalantes. As curvas azuis mostram o comportamento distinto delas: após a modificação com MCH ocorre o aumento do R_{ct} e para o MCE, a diminuição.	67
Figura 5.4	Estudo sobre o efeito do tempo de imobilização de seqüências de captura a $0,5 \mu\text{mol/L}$ na variação do R_{CT} , onde $\Delta R_{CT} = R_{CT \text{ IMOB}} - R_{CT \text{ LIMPO}}$. Observa-se um aumento do ΔR_{CT} até 12 h de incubação. Entre 12 e 15 h não houve variação, indicando que houve a saturação do eletrodo.	68
Figura 5.5	Diagramas de Nyquist para análise de seletividade do biossensor em eletrodo de barra: etapa de detecção em (A) com seqüências da espécie <i>M. incognita</i> (TP) e em (B) com seqüências da <i>M. javanica</i> (NC) na concentração de $1 \mu\text{mol/L}$.	69
Figura 5.6	Gráfico de barras representando a porcentagem de variação do R_{CT} após a incubação com as seqüências de TP (em azul) e NC (em vermelho).	70
Figura 5.7	Perfil topográfico obtido por AFM de eletrodo multiplex em	71

substrato de vidro antes da limpeza: imagens 10 μm x 10 μm em 2D **(A)** e 3D **(B)** apresentam rugosidade por área (R_a) de 1,4 nm e rugosidade quadrática média (R_q) de 2,38 nm. Nas imagens tomadas em 2 μm x 2 μm para 2D **(C)** e 3D **(D)** observa-se que o filme de ouro depositado é formado por pequenas nanopartículas de ouro, apresentando altura máxima de 23 nm.

- Figura 5.8 Caracterização por AFM de eletrodo multiplex em substrato de vidro após a limpeza: imagens de 10 μm x 10 μm em 2D **(A)** e 3D **(B)** mostram uma diminuição na rugosidade após a limpeza eletroquímica, $R_a = 1,07$ nm e $R_q = 1,98$ nm. Observa-se nas imagens com dimensão 2 μm x 2 μm em 2D **(C)** e 3D **(D)** que a altura máxima do filme é de 11,1 nm, indicando uma ótima uniformidade na deposição do ouro. 72
- Figura 5.9 Caracterização por AFM de eletrodo multiplex em substrato de PET: imagens de 10 μm^2 antes **(A)** e depois da limpeza **(C)** mostram uma superfície com rugosidade superior aos eletrodos em vidro. Nas microscopias tomadas em 4 μm^2 antes **(B)** e após a limpeza **(D)**, observa-se a diminuição da altura máxima do filme. No entanto, em **(D)** observa-se um filme menos uniforme, com a formação de vales. 73
- Figura 5.10 Imagem de contraste de fase 2 μm x 2 μm de eletrodo multiplex em substrato de PET antes da limpeza. A caracterização por AFM revela a presença de um único elemento na superfície. 74
- Figura 5.11 Espectros de XPS na região Au4f antes e após limpeza eletroquímica para eletrodos em vidro **(A)** e em PET **(B)**. 75
- Figura 5.12 Voltamogramas de eletrodos em substrato de vidro **(A)** e em substrato de PET **(B)** tomados no último ciclo de limpeza eletroquímica para cálculo da área eletroativa. 77
- Figura 5.13 Caracterização por voltametria cíclica de eletrodos em substratos de PET (AuPET) e vidro (AuVIDRO) após a limpeza eletroquímica. 78

Figura 5.14	Diagrama de Nyquist para eletrodos limpos AuPET (curva em laranja) e AuVIDRO (curva em azul).	790
Figura 5.15	Espectros de impedância e voltamogramas de eletrodos AuPET (A,B) e AuVIDRO (C,D) antes e após a incubação com sequências CP a 1 µmol/L.	80
Figura 5.16	Gráfico de barras para a variação percentual da resistência a transferência de cargas após a etapa de imobilização de sequências CP a 1 µmol/L.	81
Figura 5.17	Imagens de topografia obtidas por AFM e valores de rugosidade por área (Ra) para cada etapa da construção do biossensor.	82
Figura 5.18	Imagens de contraste de fase obtidas por AFM e valores de rugosidade por área (Ra) para cada etapa da construção do biossensor	83
Figura 5.19	Diagramas de Nyquist para teste de seletividade nos eletrodos multiplex: etapa de hibridização em (A) com <i>M. javanica</i> -NC - e em (B) com <i>M. incognita</i> -TP	84
Figura 5.20	Gráficos de barras para variação percentual da resistência a transferência de cargas antes e após etapa de hibridização com <i>M. incognita</i> (TP) e <i>M. javanica</i> (NC).	85
Figura 5.21	Gráfico de barras com a variação percentual de R_{CT} ($[R_{CT\ IMO} - R_{CT\ LIMPO}] / R_{CT\ LIMPO}$) para a imobilização de sequências CP a 0,2 µmol/L em eletrodos multiplex por 2, 5, 15 e 48 h.	86
Figura 5.22	Diagrama de Nyquist para a imobilização de CP a 0,2 µmol/L em eletrodos multiplex nos tempos indicados.	87
Figura 5.23	Diagramas de Nyquist da influência da concentração de MCH na formação da SAM e na seletividade do biossensor: eletrodos sem modificação com MCH incubados com TP (A) e NC (B); eletrodos modificados com MCH 0,2 mmol/L incubados com TP (C) e NC	89

(D); eletrodos modificados com MCH 1 mmol/L incubados com TP (E) e NC (F).

- Figura 5.24 Gráfico de barras com a variação percentual de RCT entre as etapas anterior e posterior a incubação com as sequências TP e NC para eletrodos sem MCH, com MCH 0,2 mmol/L e com MCH 1 mmol/L. 90
- Figura 5.25 Diagramas de Nyquist de eletrodos modificados com MCH 0,2 mmol/L em diferentes tempos e sua influência na seletividade: por 30 min – detecção com TP (A) e NC (B); por 1 h – detecção com TP (C) e NC (D); por 4 h – detecção com TP (E) e NC (F). 91
- Figura 5.26 Gráfico de barras com a variação percentual de RCT entre as etapas anterior e posterior a incubação com as sequências TP e NC para eletrodos incubados com MCH 0,2 mmol/L por 30 min, 1 h e 4 h. 92
- Figura 5.27 Gráfico de barras para a seletividade em função do tempo de hibridização: sequências de NC ou TP a 1 $\mu\text{mol/L}$ foram incubadas com os eletrodos durante 1 e 2 h. 93
- Figura 5.28 Gráfico de barras para a seletividade em função da temperatura de hibridização: sequências de NC ou TP a 1 $\mu\text{mol/L}$ foram incubadas com os eletrodos por 1 h a 25°C e 60°C. 94
- Figura 5.29 Imagens de topografia obtidas por AFM em 2D (A) e 3D (B) de eletrodo interdigitado limpo. Os valores de rugosidade encontrados para esse eletrodo foram $R_a = 1,29 \text{ nm}$ e $R_q = 1,64 \text{ nm}$ com altura máxima de 16 nm 95
- Figura 5.30 Espectro de capacitância de 20 medidas consecutivas realizadas no mesmo eletrodo para avaliação da reprodutibilidade na faixa de 10^2 a 10^6 Hz . No detalhe, a ampliação da faixa 10^5 a 10^6 Hz . 96
- Figura 5.31 Espectro de capacitância para eletrodos modificados com soro imunizado da espécie *M. incognita* - sem incubação (PBS), incubados com 30 $\mu\text{g/mL}$ de proteínas da espécie *M. javanica* (negativo) e incubados com 30 $\mu\text{g/mL}$ de proteínas da espécie *M.* 97

incognita (positivo).

- Figura 5.32 Gráfico de *score* da análise de componentes principais de dois grupos de eletrodos submetidos a limpezas diferentes – discriminação das amostras sem proteínas, com proteínas de outra espécie (negativo) e com proteínas da mesma espécie (positivo). Para cada grupo é mostrado a elipse de confiança 95%. 98
- Figura 5.33 Gráfico de *loading* da análise de componentes principais de dois grupos de eletrodos submetidos a limpezas diferentes – discriminação das amostras sem proteínas, com proteínas de outra espécie (negativo) e com proteínas da mesma espécie (positivo). 99
- Figura 5.34 Gráfico de *score* da análise de componentes principais obtida pela combinação de três conjuntos sensoriais – eletrodos limpos, eletrodos com filme orgânico e eletrodos com SAM – para a discriminação de amostras sem proteínas (PBS), com proteínas da espécie *M. javanica* (negativo) e com as proteínas da espécie *M. incognita* (positivo). Para cada grupo de amostras é mostrado a elipse de confiança 95%. 100
- Figura 5.35 Gráfico de *loading* da análise de componentes principais obtida pela combinação de três conjuntos sensoriais – eletrodos limpos, eletrodos com filme orgânico e eletrodos com SAM - para a discriminação de amostras sem proteínas (PBS), com proteínas da espécie *M. javanica* (negativo) e com as proteínas da espécie *M. incognita* (positivo). 101
- Figura 5.36 Gráfico de *score* da análise de componentes principais obtida pela combinação de dois conjuntos sensoriais – eletrodos com filme orgânico e eletrodos com SAM – para a discriminação de amostras sem proteínas (PBS), com proteínas da espécie *M. javanica* (negativo) e com as proteínas da espécie *M. incognita* (positivo). Para cada grupo de amostras é mostrado a elipse de confiança 95%. 102
- Figura 5.37 Gráfico de *loading* da análise de componentes principais obtida pela 103

combinação de três conjuntos sensoriais – eletrodos limpos, eletrodos com filme orgânico e eletrodos com SAM - para a discriminação de amostras sem proteínas (PBS), com proteínas da espécie *M. javanica* (negativo) e com as proteínas da espécie *M. incognita* (positivo).

- Figura 5.38 Gráfico de *score* da análise de componentes principais obtida pela combinação de dois conjuntos sensoriais – eletrodos com filme orgânico e eletrodos com SAM – para a discriminação de amostras sem período de incubação. Para cada grupo de amostras é mostrado a elipse de confiança 95% 104
- Figura 5.39 Gráfico de *loading* da análise de componentes principais obtida pela combinação de dois conjuntos sensoriais – eletrodos com filme orgânico e eletrodos com SAM – para a discriminação de amostras sem período de incubação 105
- Figura 5.40 Análise de componentes principais de biossensor para a espécie *M. javanica* com a combinação dos conjuntos sensoriais FO e AC: gráfico de *loading* e no detalhe, gráfico de *score* para a discriminação de amostras sem proteínas (PBS), com 30 µg/mL de proteínas *Mi* (negativo) e com 30 µg/mL de proteínas *Mj* (positivo). 106
- Figura 5.41 Variação percentual da capacitância do biossensor construído para a espécie *M. incognita* em função da concentração do analito: A-) Gráfico de barras e B-) curva de calibração ΔC (%) versus log da concentração. 107
- Figura 5.42 Dependência linear da variação percentual da capacitância em função do log da concentração de proteínas (espécie *M. incognita*) – Curva de calibração obtida por regressão linear com ajuste $R^2 = 0,971$. 107

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Principais grupos de nematoides parasitas de plantas	31
Tabela 4.1	Relação das sequências alvo e de captura projetadas neste trabalho para cada uma das espécies selecionadas. As sequências de captura apresentam grupo tiol na extremidade 5' para ligação nos eletrodos de ouro e são complementares à região em negrito das sequências alvo.	55
Tabela 5.1	Valores de rugosidade por área (R_a) e rugosidade quadrática média (R_q) para os eletrodos estudados	73
Tabela 5.2	Valores da energia de ligação encontrados para Au 4f _{7/2} e Au 4f _{5/2} em eletrodos multiplex	76
Tabela 5.3	Valores calculados da área eletroativa para eletrodos em diferentes substratos (n=3)	77
Tabela 5.4	Valores calculados da área eletroativa para eletrodos em diferentes substratos (n=3)	79
Tabela 5.5	Variação percentual do R_{CT} (ΔR_{CT}) após a incubação dos eletrodos com CP nos tempos indicados. O valor médio do ΔR_{CT} entre as réplicas e o desvio médio relativo são apresentados para cada tempo.	87
Tabela 5.6	Custo estimado para a produção do imunossensor elétrico	109
Tabela 5.7	Custo estimado para a produção do genossensor eletroquímico	110

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	29
3.1 NEMATOIDES PARASITAS DE PLANTAS	29
3.1.1 Detecção e controle da praga	31
3.2 BIOSSENSORES.....	32
3.2.1 Genossensores	34
3.2.2 Imunossensores.....	37
3.2.3 Biossensores comerciais	41
3.3 TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS	41
3.3.1 Voltametria cíclica (CV).....	42
3.3.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).....	43
3.3.3 Espectroscopia de impedância não-Faradaica.....	45
3.4 MÉTODO ESTATÍSTICO MULTIVARIADO.....	47
3.4.1 Análise de componentes principais (PCA)	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1 MATERIAIS	51
4.1.1 Reagentes.....	51
4.1.2 Soluções.....	51
4.2 MÉTODOS	52
4.2.1 Fabricação eletrodos descartáveis.....	52
4.2.2 Limpeza eletrodos.....	53
4.2.3 Planejamento sequências de DNA	54
4.2.4 Redução, purificação e quantificação das sequências de DNA	55
4.2.5 Extração de proteínas dos nematoides e produção de anticorpos	57
4.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E MORFOLÓGICA DOS ELETRODOS.....	59
4.3.1 Microscopia de força atômica (AFM).....	59
4.3.2 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS)	59
4.4 TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS	60
4.4.1 Voltametria cíclica (CV).....	61
4.4.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).....	61
4.4.3 Espectroscopia de impedância elétrica	62

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1	GENOSSENSOR ELETROQUÍMICO EM ELETRODOS DE BARRA.....	63
5.1.1	Cálculo da área eletroativa dos eletrodos	63
5.1.2	Estudo do uso de intercalantes na eficiência de hibridização.....	66
5.1.3	Otimização do tempo de imobilização	67
5.1.4	Estudo de seletividade.....	68
5.2	GENOSSENSOR ELETROQUÍMICO EM ELETRODOS DESCARTÁVEIS MULTIPLEX	70
5.2.1	Caracterização morfológica dos eletrodos	70
5.2.2	Caracterização da composição química dos eletrodos	74
5.2.3	Cálculo da área eletroativa.....	76
5.2.4	Caracterização eletroquímica	77
5.2.5	Imobilização de sequência de captura	80
5.2.6	Análise da rugosidade do eletrodo para cada etapa.....	81
5.2.7	Reprodução do teste de seletividade realizado em eletrodo de barra.....	83
5.2.8	Tempo de imobilização.....	85
5.2.9	Concentração da molécula intercalante.....	88
5.2.10	Tempo de imobilização da molécula intercalante	90
5.2.11	Tempo de hibridização.....	92
5.2.12	Temperatura de hibridização.....	93
5.3	IMUNOSSENSOR ELÉTRICO	94
5.3.1	Caracterização morfológica dos eletrodos interdigitados	94
5.3.2	Medidas de capacitância – reprodutibilidade e escolha de frequência	95
5.3.3	Influência da limpeza dos eletrodos na seletividade	97
5.3.4	Combinação de diferentes unidades sensoriais	99
5.3.5	Medidas de detecção sem período de incubação.....	103
5.3.6	Variação na capacitância em função da concentração do analito.....	106
5.4	CUSTO ESTIMADO DOS BIOSSENSORES	108
6	CONCLUSÕES	111
7	PERSPECTIVAS	114
	REFERÊNCIAS.....	116

1 Introdução

Nematoides parasitas de plantas (do inglês, *Plant-parasitic nematodes*, PPN) são parasitas que em pelo menos uma fase de seu ciclo de vida, utilizam as raízes das plantas para adquirir nutrientes. O parasitismo pode causar o crescimento atrofiado das plantas, necrose das raízes e descoloração das folhas.¹ Estima-se que a perda global na agricultura causada por nematoides parasitas de plantas seja de 157 bilhões de dólares por ano, impactando significativamente a economia mundial.²

As plantações infectadas são tratadas majoritariamente com a rotação de cultura, onde é feita a plantação de uma cultura resistente a nematoides, e com o uso de nematicidas. No entanto, essas estratégias não são direcionadas ao tratamento de uma única espécie e podem ser ineficazes quando a espécie de nematoides presente no solo é resistente à estratégia adotada.³ Além disso, o uso extensivo de nematicidas pode não só tornar os nematoides resistentes, como também acarretar diversos problemas de saúde para a população. Assim, a identificação e quantificação das espécies dos nematoides são essenciais para que a melhor estratégia seja adotada e para que o controle seja feito quando a densidade populacional dos nematoides ainda não está alta, evitando o uso de altas dosagens de nematicidas.

Atualmente, a identificação dos nematoides é feita por meio de técnicas de microscopia, em que a diferenciação das espécies baseia-se nas características morfométricas dos exemplares, ou pela análise molecular utilizando PCR (do inglês *polimerase chain reaction*) para a amplificação do DNA e eletroforese para a identificação das sequências amplificadas.³⁻⁴ Essas técnicas utilizam aparelhos sofisticados que demandam pessoas especializadas para operá-los e etapas minuciosas que conferem um tempo maior para a obtenção dos resultados. Nesse sentido, dispositivos *point-of-care*, como é o caso de biossensores, surgem como uma nova ferramenta para a detecção de pragas agrícolas, uma vez que a análise da amostra pode ser feita de maneira mais simples e rápida.

Biossensores são plataformas em que moléculas biológicas, como enzimas, proteínas e DNA, formam uma camada de biorreconhecimento capaz de se ligar seletivamente a molécula que se deseja detectar. A interação entre as moléculas complementares causa mudanças físico-químicas que são convertidas a um sinal mensurável por um transdutor, como um eletrodo.⁵ A plataforma é desenvolvida de acordo com a alteração físico-química que será analisada durante a detecção, podendo ser ótica, elétrica ou eletroquímica.⁶ Devido à sua especificidade, possibilidade

de uso em campo, rapidez na detecção e custo baixo, os biossensores têm sido empregados em diversas áreas, por exemplo, na detecção de doenças,⁷ pesticidas⁸ e alimentos transgênicos.⁹

Nesse projeto, inserido na modalidade de doutorado acadêmico industrial e realizado em parceria com a empresa Bayer (divisão *CropScience*), dois biossensores foram estudados e desenvolvidos – um genossensor eletroquímico e um imunossensor elétrico – para a detecção de nematoides parasitas de plantas. Os objetivos desse trabalho são apresentados no **Capítulo 2**, seguido da revisão bibliográfica e estado da arte da temática abordada inseridos no **Capítulo 3**. O **Capítulo 4** descreve as metodologias utilizadas na construção dos biossensores. Resultados e discussão são apresentados no **Capítulo 5**. As conclusões inferidas dos resultados são discutidas no **Capítulo 6** e, por fim, o **Capítulo 7** apresenta as perspectivas desse trabalho.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Este projeto de doutorado tem como objetivo principal o desenvolvimento de dois biossensores – um genossensor eletroquímico e um imunossensor elétrico – para a detecção e identificação de espécies de nematoides.

2.2 Objetivos específicos

- Planejar as sequências a serem utilizadas como DNA alvo e DNA de captura, utilizando ferramentas de bioinformática, para as espécies *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus brachyurs*.
- Desenvolvimento de novo design de eletrodos multiplex, com a integração de quatro eletrodos de trabalho.
- Extração de proteínas das espécies de nematoides e utilização de anticorpos policlonais como elementos de biorreconhecimento em imunossensor.
- Fabricação de eletrodos de ouro descartáveis nas configurações multiplex e interdigitados.
- Otimização da construção das camadas automontadas
- Realização de análises de componentes principais (PCA) nos dados obtidos pelas medidas elétricas.

3 Revisão da literatura

3.1 Nematoides parasitas de plantas

Nematoides são organismos pertencentes ao filo Nematoda, tipicamente fusiformes (de forma alongada e com extremidades mais estreitas que o centro), simétricos bilateralmente, com comprimento entre 0,1 a 2,5 mm e espessura entre 5 a 100 μm , como mostrado na **Figura 3.1A**.¹⁰⁻¹¹ Nesses animais os sistemas circulatório e respiratório são ausentes e seus corpos são revestidos por uma cutícula colagenosa. Os nematoides apresentam uma ampla diversidade de espécies adaptadas a diferentes nichos ecológicos e por isso são divididos em três grandes categorias: os de vida livre, que se alimentam de bactérias, fungos e outros nematoides, os parasitas de animais e os parasitas de plantas.¹²

Nematoides parasitas de plantas formam uma classe de fitoparasitas que utilizam as plantas como fonte de alimentação. As espécies apresentam diferentes estratégias para a obtenção dos nutrientes, dividindo-se em ectoparasitas e endoparasitas. Os ectoparasitas permanecem no solo e se alimentam apenas das raízes das plantas, enquanto os endoparasitas infectam seus tecidos intracelularmente estabelecendo uma relação mais nociva para a planta hospedeira.¹ Os nematoides fitoparasitas possuem uma estrutura especializada denominada de estilete, presente na cavidade bucal e com ligação ao sistema digestivo, que é ilustrada na **Figura 3.1B**. Essa estrutura possui forma pontiaguda que permite aos nematoides perfurar a parede celular, além de secretar proteínas e enzimas capazes de inibir a resposta imune das plantas e auxiliar a formação dos sítios de alimentação.^{1,13}



Figura 3.1 - Morfologia fusiforme dos nematoides (A) e estilete presente nos nematoides fitoparasitas (B)
Fonte: Elaborada pela autora

Essa classe de nematoides é, portanto, extremamente prejudicial para as plantas causando diversos problemas no seu desenvolvimento. A **Figura 3.2** ilustra os principais sintomas apresentados pelas plantas infectadas como crescimento atrofiado, descoloração das folhas e necrose das raízes com a formação de cistos e galhas.¹

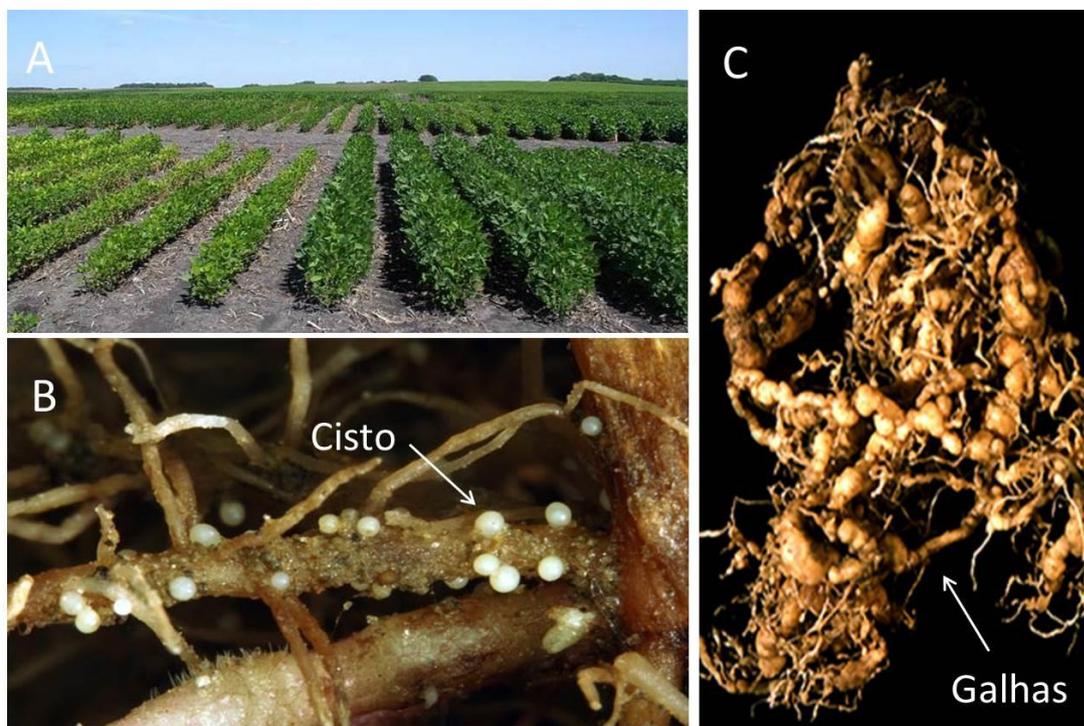


Figura 3.2 - Sintomas das plantas após a infecção por nematoides: crescimento atrofiado e descoloração das plantas (A), formação de cistos (B) e de galhas (C) nas raízes.
Fonte: Adaptada de HAMMERAAS; SARDANELLI; CHEN.¹⁴⁻¹⁶

As espécies de nematoides fitoparasitas são classificadas em grupos de acordo com o tipo de lesão causada na planta e as culturas que costumam infectar. Os principais grupos são: nematoides formadores de galhas, nematoides formadores de cistos e nematoides de lesões radiculares.¹ Os dois primeiros são endoparasitas sedentários obrigatórios, enquanto o último é endoparasita migratório. Os nematoides formadores de cistos penetram nas raízes e se movem para o tecido vascular, onde secretam proteínas através do estilete, que induzem a formação de células multinucleadas, chamadas de sincícios, usadas como fonte de alimentação. Eles ocorrem principalmente em culturas de soja, batata e arroz, sendo as espécies pertencentes aos gêneros *Heterodera* e *Globodera* as de maior relevância econômica, devido aos enormes danos causados nas plantações.¹⁷⁻¹⁸ Já os nematoides formadores de galhas, ao penetrarem as raízes, induzem a hiperplasia e hipertrofia das células, gerando células gigantes visíveis macroscopicamente, de onde os nematoides retiram seus nutrientes. Espécies do gênero *Meloidogyne* são as mais conhecidas e nocivas dessa categoria por infectarem uma grande variedade de culturas, sendo café, soja e algodão as principais.^{1,18-19} Devido a sua atividade migratória, os nematoides de lesões

radiculares não induzem a formação de sítios de alimentação permanente. Eles infectam as células do parênquima cortical e se alimentam do citoplasma, causando a morte celular e a necrose das regiões afetadas da planta.²⁰⁻²¹ As principais espécies desse grupo de nematoides são do gênero *Pratylenchus* que devastam plantações como soja, cana-de-açúcar e milho.^{1,20} A **Tabela 3.1** apresenta os três grandes grupos de nematoides parasitas de plantas com as principais espécies e culturas afetadas.

Tabela 3.1 – Principais grupos de nematoides parasitas de plantas

	Principais culturas afetadas	Espécies parasitas
Nematoides formadores de cisto	Batata, soja e arroz	<i>Globodera e Heterodera</i>
Nematoides formadores de galhas	Café, soja e algodão	<i>Meloidogyne</i>
Nematoides de lesão radicular	Soja, cana-de-açúcar, café e milho	<i>Pratylenchus</i>

Fonte: Elaborada pela autora

A infestação das culturas por nematoides tem se tornado cada vez mais recorrente e severa. Estima-se que a perda global na agricultura causada por nematoides parasitas de plantas é de 157 bilhões de dólares por ano, sendo a cana-de-açúcar, o café e a banana, as culturas com maiores perdas.² No Brasil, o prejuízo anual ultrapassa 35 bilhões de reais, segundo a Sociedade Brasileira de Nematologia (SBN). A produção de soja é a de principal impacto econômico com perdas estimadas em 16,2 bilhões de reais.²²

3.1.1 Detecção e controle da praga

A erradicação dos nematoides parasitas de planta é considerada difícil de acontecer, no entanto, é possível atenuar as infestações e preservar as culturas adotando estratégias de controle. A escolha da melhor estratégia é baseada, principalmente, na densidade populacional inicial, tipo de solo e período de colheita.¹ A rotação de culturas, onde uma cultura resistente ao nematoide é plantada na entressafra, é a mais indicada para as culturas anuais, além de ser ambientalmente sustentável.²³⁻²⁴ Assim como para outros tipos de pragas, o tratamento com nematicidas é também bastante utilizado pelos agricultores por permitir o

controle dos nematoides mesmo em plantações já estabelecidas. No entanto, esses nematicidas possuem em suas formulações moléculas químicas tóxicas, como os fumegantes, que podem contaminar os lençóis freáticos, diminuir a atividade microbiológica do solo e causar problemas de saúde nos seres humanos.^{1-2,25} Para plantações com alta densidade populacional de nematoides, uma única técnica de manejo muitas vezes não é suficiente, sendo necessário a aplicação de manejo integrado, em que duas ou mais estratégias são utilizadas.³

Apesar dos enormes danos causados pelos nematoides, os agricultores só detectam a infestação nas plantas em estágios avançados, quando elas já apresentam sintomas característicos, comprometendo a colheita da região infectada. As medidas de controle são escolhidas de maneira não específica, ou seja, não levam em consideração a espécie dos nematoides. Dessa maneira, os métodos de controle não são tão efetivos, uma vez que é necessário aplicar uma grande quantidade de nematicida que pode contribuir para que muitas espécies desenvolvam resistência a eles. Atualmente, a identificação dos nematoides é feita ou por análise molecular, utilizando o PCR (do inglês, *polymerase chain reaction*) para a amplificação do DNA e eletroforese em gel de agarose para a identificação das sequências amplificadas³⁻⁴, ou por técnicas de microscopia em que a identificação dos nematoides é feita com base nas características morfométricas de seus exemplares. No entanto, uma vez que essas técnicas demandam aparelhos sofisticados e pessoas especializadas para operá-los, é necessário que elas sejam realizadas em laboratórios, conferindo um tempo maior para a obtenção dos resultados. Nesse sentido, dispositivos *point-of-care* como os biossensores, surgem como uma ferramenta promissora para a detecção e identificação de nematoides de maneira mais simples e rápida, permitindo que as medidas de controle sejam realizadas no estágio inicial da infestação sem que haja a necessidade de aplicar grandes quantidades de pesticidas.

3.2 Biossensores

Biossensores são dispositivos analíticos formados por uma parte transdutora e uma camada de biomoléculas que se ligam seletivamente ao elemento que se deseja detectar. O princípio de funcionamento dos biossensores foi elucidado em 1962 por Leland C. Clark, um bioquímico americano. Ele apresentou o primeiro eletrodo enzimático para detecção e quantificação de glicose através da imobilização da enzima glicose oxidase em eletrodo de platina.²⁶⁻²⁷ Uma vez que a reação glicose-enzima consome oxigênio, é possível determinar de

maneira indireta a quantidade de glicose na amostra através da diminuição da concentração de oxigênio.²⁸ O desenvolvimento desse biossensor permitiu o monitoramento do nível de glicose no sangue, melhorando a qualidade de vida de portadores de diabetes. A partir desse momento, diversos pesquisadores passaram a trabalhar nessa nova área, gerando um enorme avanço nos sistemas de detecção, principalmente na área biomédica, de doenças como câncer,⁷ Alzheimer²⁹ e lúpus.³⁰

Os biossensores são, portanto, dispositivos que permitem a identificação e quantificação de uma molécula de interesse, chamada de analito, a partir de amostras de sangue, água, urina ou solo. Para isso, os dispositivos são formados por uma camada de biorreconhecimento, em que biomoléculas como DNA, enzimas, proteínas e anticorpos, se ligam seletivamente ao analito. A interação biomolécula-analito produz alterações físico-químicas que são transmitidas à parte transdutora do biossensor, formada por um eletrodo. O transdutor converte a alteração físico-química em um sinal eletrônico e o envia a um computador, onde o sinal é processado e convertido a um parâmetro físico, por exemplo, corrente elétrica e impedância.³¹⁻³² A **Figura 3.3** ilustra o princípio de funcionamento de um biossensor.

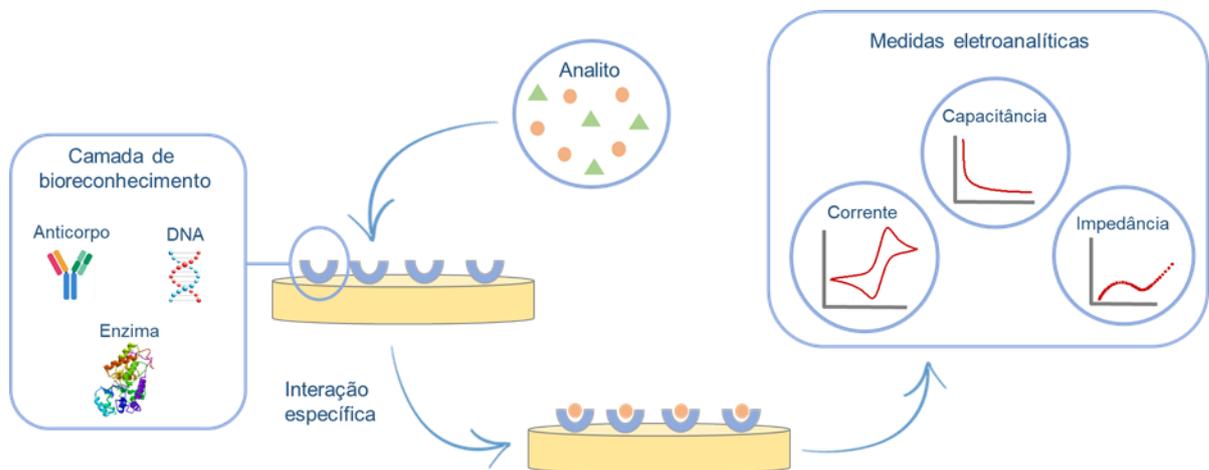


Figura 3.3 - Princípio de funcionamento de um biossensor: um transdutor é modificado com um elemento biológico que forma uma camada de biorreconhecimento. Na presença do analito, há uma interação específica que gera alterações físico-químicas convertidas pelo transdutor e interpretadas por medidas eletroanalíticas.

Fonte: Elaborada pela autora

3.2.1 Genossensores

Importantes devido à capacidade de detectar sequências específicas de DNA, os genossensores são especialmente empregados na área biomédica, uma vez que diversas doenças são causadas por mutações genéticas.³³ Esses biossensores se beneficiam da grande afinidade entre sequências de DNA de fita simples (ss-DNA) complementares, que se ligam em um evento denominado de hibridização, formando a dupla hélice (ds-DNA). A hibridização das fitas gera alterações eletroquímicas que são convertidas pelo transdutor, possibilitando não só a detecção como também a quantificação do DNA alvo.³³⁻³⁴

Nos genossensores, os eletrodos são modificados com sequências de DNA de fita simples, complementares à sequência de DNA alvo (do inglês, *target probe* – TP). A imobilização dessas sequências, denominadas de sequências de captura (do inglês, *capture probe* - CP), pode ser feita de diversas maneiras. A maneira mais utilizada é através da modificação do CP com um grupo tiol (-R-SH) que permite que essas sequências se liguem covalentemente a um eletrodo de ouro. As sequências de CP podem se organizar de maneira desordenada na superfície do eletrodo, dificultando a hibridização com o DNA alvo. Para alinhar o CP e assim favorecer a hibridização, podem ser usados intercalantes moleculares, que também são capazes de remover as ligações inespecíficas de maneira a aumentar a seletividade do biossensor. Alcanotióis como mercaptoetanol e mercaptohexanol são os mais utilizados para essa finalidade.³⁵⁻³⁶ As etapas de imobilização, alinhamento e hibridização de um genossensor são mostradas na **Figura 3.4**.

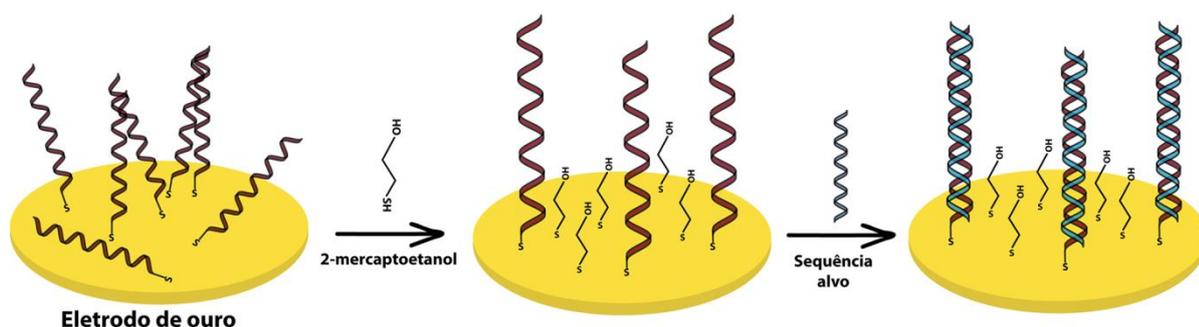


Figura 3.4 - Etapas de construção do genossensor: Primeiro, as sequências de captura são imobilizadas no eletrodo de ouro. Depois, é feita a imobilização de moléculas intercalantes, como o mercaptoetanol, para o alinhamento das sequências de captura. Por último, na presença do DNA alvo, ocorre a hibridização entre as sequências complementares.

Fonte: Elaborada pela autora.

Biossensores de DNA podem ser construídos de duas maneiras: a *label-free*, em que a detecção consiste apenas da hibridização entre o DNA de captura e o DNA alvo, e a *sandwich*, onde se utiliza uma terceira sequência de DNA, complementar a outra parte do DNA alvo, marcada com alguma molécula ou material que permite a amplificação do sinal eletroquímico ou a detecção óptica. Na configuração do tipo *sandwich*, nanomateriais como nanopartículas de ouro e *quantum dots* são comumente utilizados para melhorar o desempenho do biossensor. Esses nanomateriais são previamente modificados com as sequências de DNA complementar, denominadas de sequências *reporter* (do inglês, *reporter probe* - RP), e possibilitam que se obtenha um limite de detecção menor, ou seja, o biossensor nessa configuração é capaz de detectar uma concentração ainda menor de DNA.³⁷⁻³⁸ Para garantir um bom desempenho na detecção, algumas características são importantes para a escolha das sequências de DNA que serão utilizadas. Organismos vivos, especialmente microrganismos, sofrem alterações genéticas para se adaptarem a novos ambientes e garantirem a sobrevivência da espécie, como postulado em 1859 por Charles Darwin em sua teoria da evolução por seleção natural. Um exemplo disso são as bactérias que após serem expostas a grandes dosagens de antibióticos, sofrem mutações genéticas que as tornam resistentes aos seus componentes.³⁹ Assim, é necessário que se escolha uma região do gene em que é menos provável que haja uma mutação genética para ser utilizada como analito pelo biossensor. Regiões do espaçador transcrito externo (do inglês, *internal transcribed spacers* - ITS) no DNA ribossômico são as mais indicadas, uma vez que por serem responsáveis pela síntese de proteínas essenciais, essas regiões são mais conservadas entre exemplares da mesma espécie.⁴⁰

Os genossensores são os biossensores que apresentam maior capacidade para distinção de espécies de microrganismos, devido a interação extremamente específica entre sequências de DNA complementares e a possibilidade de se usar regiões do gene com menor similaridade entre as espécies. No entanto, para que as amostras sejam analisadas pelo biossensor, é necessário que se faça uma etapa de preparação, em que o material genético total é extraído, purificado e submetido a enzimas de restrição que irão reconhecer e se ligar a região de interesse no DNA de fita dupla, rompendo a ligação fosfodiéster que une as duas fitas, de maneira a deixar disponível o ssDNA que será utilizado como TP.⁴⁰⁻⁴¹ Para isso, podem ser usados kits comerciais como o *GenElute Mammalian* da *Sigma-Aldrich* e o *Nematode DNA Extraction & Purification kit* da *ClearDetections*, que são fáceis de usar e garantem melhor qualidade das sequências extraídas. Além disso, em muitos casos, após essa etapa de preparo

da amostra, a quantidade de sequências de DNA disponíveis não é suficiente para que elas sejam detectadas pelos biossensores. Assim, é necessário que seja feita uma etapa adicional de amplificação, onde são geradas milhares de cópias das sequências genéticas selecionadas. O método mais utilizado é o da PCR. Nela, as sequências de DNA fita dupla são aquecidas entre 94-98°C para que haja a desnaturação e a separação em cadeias simples. Em seguida, na etapa de anelamento, a temperatura da reação é reduzida para que sequências de cadeia curta denominadas de *primers*, se liguem as extremidades 3' das sequências. Por último, ocorre a etapa de alongamento, onde a enzima *Taq* polimerase se liga ao primer e sintetiza uma nova cadeia de DNA complementar através da adição de deoxinucleosídeos trifosfatos (do inglês, - *deoxynucleoside triphosphates* – dNTPs). Esse processo é repetido em ciclos até que se obtenha o número necessário de cópias do DNA. Existem algumas variações do PCR, como o RT-PCR (do inglês, *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) em que ao invés da reação já partir de sequências de dsDNA, ela parte de sequências de mRNA que são convertidas pela enzima transcriptase reversa para uma cadeia de DNA complementar (cDNA) em fita dupla que, então, segue para as etapas do PCR convencional. O RT-PCR é um ótimo indicativo de viabilidade celular, uma vez que o mRNA é rapidamente degradado em células mortas, e pode ser usado para estimativas de número de células.^{40,42} Apesar de ser a técnica mais utilizada em análises genéticas, o PCR convencional requer um termociclador, que é um equipamento caro e de difícil transporte, inviabilizando a realização dessa etapa de amplificação *point-of-care*. Assim, técnicas isotérmicas para amplificação de DNA foram desenvolvidas a fim de tornar essa etapa mais simples, como a amplificação isotérmica mediada por *loop* (do inglês, (*loop-mediated isothermal amplification* – LAMP) e a amplificação por polimerase recombinase (do inglês, *recombinase polymerase amplification* – RPA).⁴³⁻⁴⁴ No LAMP, a reação ocorre em temperatura constante entre 60-65°C e faz uso, tipicamente, da *Bst* DNA polimerase, que possui atividade de deslocamento de cadeia, e de 4 *primers* que identificam 6 sítios distintos do DNA alvo. Dessa maneira, além da vantagem de ser uma técnica isotérmica, o LAMP também apresenta maior especificidade e produz uma quantidade maior de cópias em menor tempo, quando comparada com o PCR.⁴⁵⁻⁴⁶ Já na amplificação por RPA, enzimas recombinases são usadas para anelar os *primers* as extremidades 3' do dsDNA, abrindo as sequências. Então, proteínas SSB (do inglês, *Single-strand DNA-binding protein*) estabilizam as fitas simples a fim de impedir que elas voltem a se ligar. Por fim, uma polimerase isotérmica sintetiza as cadeias complementares do DNA. Essa técnica é realizada em temperatura constante entre 37-40°C, menor que a necessária para a amplificação por LAMP, e fornece resultados em menos de 20 minutos.^{44,47}

Uma vez que a amplificação do DNA é imprescindível para muitos genossensores, dispositivos que integram amplificação e detecção têm sido, recentemente, desenvolvidos por alguns grupos. Em 2019, Khater *et al.* desenvolveram um genossensor integrado com amplificação por RPA para detecção *in situ* do *Citrus tristeza virus*, uma doença que causa enormes perdas na citricultura. Para isso, *primers* tiolados capazes de se ligar a uma das extremidades do DNA alvo foram imobilizados em eletrodos de carbono modificados com nanopartículas de ouro. Proteínas SSB, *primers* para a outra extremidade e as enzimas polimerase e recombinase foram adicionados a amostra de análise. Na presença do DNA alvo, ocorria a amplificação do DNA e as sequências hibridizadas permaneciam ligadas ao eletrodo, aumentando a resistência à transferência de cargas que era monitorada pela técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica. O biossensor apresentou boa performance e reprodutibilidade.⁴⁸⁻⁴⁹

Bartosik *et al.* apresentaram em 2018, um dispositivo que integra amplificação do DNA por LAMP, separação magnética e detecção de tipos do papilomavírus humano (do inglês, *Human Papillomavirus* –HPV), que são fatores de risco para o desenvolvimento de câncer cervical. Nesse estudo, o produto do LAMP, sem etapa de purificação, é adicionado a partículas magnéticas funcionalizadas com CP para que haja a hibridização entre as sequências. Com o uso de um ímã, as partículas são separadas dos demais reagentes e colocadas sob o eletrodo que, por sua vez, é submetido a medidas de amperometria. Esses métodos representam avanços significativos para o desenvolvimento de genossensores *point-of-care*.⁵⁰

3.2.2 Imunossensores

A ligação altamente específica entre anticorpo e antígeno que apresenta, em geral, constante de afinidade da ordem de 10^6 M^{-1} , bem como a capacidade de se fazer análises com pouca ou nenhuma preparação das amostras, despertou um grande interesse dos pesquisadores em se utilizar essas biomoléculas como elementos de reconhecimento em biossensores.³² Anticorpos, também conhecidos como imunoglobulinas (Ig), são glicoproteínas produzidas pelo sistema imune de vertebrados contra moléculas, denominadas de antígeno, que o organismo não reconhece como pertencentes a ele. Os anticorpos possuem diferentes isotipos que são classificados de acordo com a sua função biológica. IgG, o isotipo mais abundante, possui estrutura em forma de Y composta por quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias

idênticas de alto peso molecular (~50 kDa) e duas cadeias idênticas de baixo peso molecular (~25 kDa), unidas por ligações dissulfeto. As quatro cadeias possuem regiões constantes e regiões variáveis, C_L e V_L para as de baixo peso molecular e C_H e V_H para as de alto peso molecular, respectivamente. A região variável possui três sub-regiões, denominadas de regiões determinantes de complementariedade (do inglês, *complementarity-determining regions* - CDRs) que são responsáveis pelo reconhecimento antígeno-anticorpo. A estrutura dos anticorpos é também dividida em dois tipos de fragmentos: os fragmentos F_{ab} onde ocorre efetivamente a ligação com o antígeno e o fragmento F_c que se liga aos receptores celulares.^{32,50} A **Figura 3.5** ilustra as regiões típicas de um anticorpo IgG.

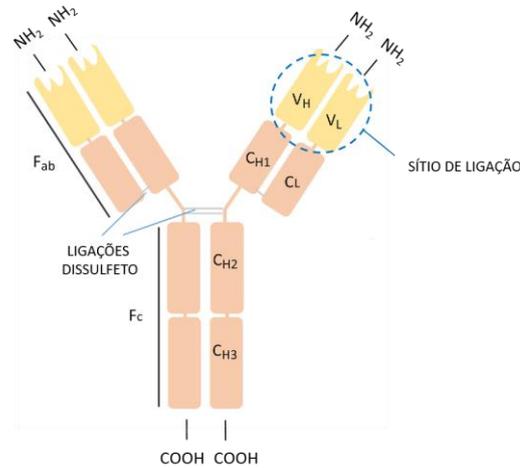


Figura 3.5 - Estrutura típica de um anticorpo IgG: quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias idênticas de alto peso molecular e duas cadeias idênticas de baixo peso molecular, unidas por ligações dissulfeto. As quatro cadeias possuem regiões constantes e regiões variáveis, C_L e V_L para as de baixo peso molecular e C_H e V_H para as de alto peso molecular, respectivamente. A estrutura dos anticorpos é também dividida em dois tipos de fragmentos: os fragmentos F_{ab} onde ocorre efetivamente a ligação com o antígeno e o fragmento F_c que se liga aos receptores celulares.

Fonte: Elaborada pela autora

A produção de anticorpos pode ser feita através de um procedimento conhecido como imunização, onde pequenas doses sub-letais de antígeno são injetadas em animais hospedeiros como coelhos, ratos ou galinhas. Dessa forma, é possível produzir anticorpos contra moléculas de interesse para serem utilizados em suas detecções. Os anticorpos produzidos podem ser monoclonais, capazes de reconhecer apenas um alvo, por exemplo, uma proteína específica, ou policlonais, compostos por imunoglobulinas heterogêneas que reconhecem um conjunto de moléculas, como uma mistura de diferentes proteínas.³² Empresas de biotecnologia já produzem e comercializam anticorpos em larga escala para antígenos conhecidos como a proteína NS1, biomarcadora da dengue, e a proteína β -amilóide, associada

a doença de Alzheimer. Esses anticorpos comerciais têm sido amplamente utilizados no desenvolvimento de biossensores como mostrado no trabalho de Wasik et al.⁵²

Devido às diferentes regiões que compõem os anticorpos, existem várias maneiras de imobilizá-los em eletrodos para a fabricação de biossensores. A seguir são apresentadas as principais estratégias de imobilização:

Imobilização não-covalente

Algumas proteínas encontradas na parede celular como as proteínas A e G, apresentam domínios de ligação específicos para a região F_c dos anticorpos IgG e podem ser usadas como mediadores para a imobilização não-covalente destes. Nessa estratégia, a imobilização é dita orientada, uma vez que o anticorpo fica ancorado através da sua região F_c , deixando os sítios de ligação acessíveis. A imobilização mediada por proteína é, portanto, a que apresenta maior eficiência no reconhecimento do antígeno, no entanto, é uma estratégia de custo elevado, encarecendo o produto final.^{6,51}

Também é possível ancorar os anticorpos diretamente em eletrodos de ouro, através das ligações dissulfeto existentes entre suas cadeias polipeptídicas. Para isso, é preciso reduzir as ligações dissulfeto através de reações químicas com agentes redutores ou com a aplicação de luz ultravioleta, gerando grupos tióis reativos que se ligam ao ouro. Nessa estratégia, os anticorpos são imobilizados em fragmentos, de maneira não-orientada. Apesar da orientação aleatória, um estudo de *Kausaite-Minkstimiene* et al. em 2010 mostrou que os fragmentos dos anticorpos ainda apresentam uma alta capacidade de ligação com o antígeno, apontando essa estratégia como promissora para o desenvolvimento de biossensores de baixo custo. Além disso, anticorpos com tióis livres podem ser também ancorados em substratos funcionalizados com maleimida através da ligação tioéter.^{51,53}

Imobilização covalente

Grupos carboxílicos e aminas primárias abundantes nos anticorpos permitem a imobilização covalente dessas biomoléculas em substratos funcionalizados, que pode ser de maneira orientada ou aleatória, de acordo com a estratégia utilizada. Para ambas as orientações, é utilizada a reação de ativação EDC/NHS, em que uma solução contendo carbodiimida (EDC) e N-Hidroxissuccinimida (NHS) é adicionada aos grupos carboxílicos gerando uma molécula intermediária parcialmente estável (éster NHS). Na presença de uma amina primária, ocorre, então, a conjugação com o ácido carboxílico ativado, gerando um

grupo amida, como mostrado na **Figura 3.6**. Dessa maneira, é possível adicionar a solução EDC/NHS diretamente aos anticorpos, ativando os grupos carboxílicos presentes na região F_c . Nessa estratégia, os substratos são funcionalizados com moléculas que possuem grupos amina, imobilizando os anticorpos de maneira orientada. Em substratos de ITO (do inglês, *Indium-Tin Oxide*) a funcionalização com moléculas de APTES (do inglês, *3-Aminopropyltriethoxysilane*) é a mais utilizada, enquanto que para eletrodos de ouro, moléculas contendo um grupo tiol adicional, como a cisteamina, são as mais indicadas. No entanto, apesar dessa técnica produzir a imobilização orientada dos anticorpos através de uma ligação covalente estável, durante a reação do EDC/NHS com os anticorpos, é possível que haja a formação de redes, onde os grupos carboxílicos de um anticorpo se ligam aos grupos amina de anticorpos vizinhos, o que pode dificultar o acesso do antígeno aos seus sítios de ligação.^{6,51,54}

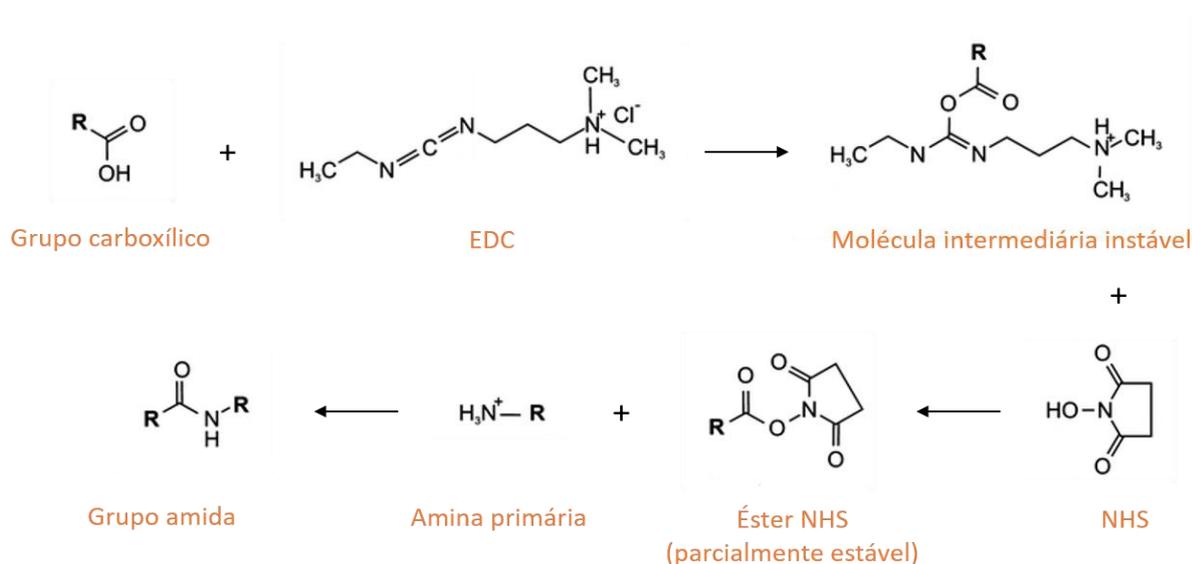


Figura 3.6 - Ativação EDC/NHS de grupos carboxílicos para ligação covalente com amina primária.
Fonte: Elaborada pela autora.

Por outro lado, os substratos podem ser funcionalizados com moléculas contendo grupos carboxílicos, que são ativados com a solução de EDC/NHS. Assim, os anticorpos são acoplados por meio de seus grupos amina presentes principalmente na região F_{ab} . Para eletrodos de ouro, são comumente utilizadas as moléculas de ácido mercaptopropiônico (MPA) e ácido 11-mercaptopundecanóico (MUA). Nessa estratégia de imobilização os anticorpos se orientam de maneira aleatória, no entanto, é uma técnica bastante empregada uma vez que produz resultados satisfatórios utilizando reagentes de baixo custo.⁵⁵⁻⁵⁶

3.2.3 Biossensores comerciais

Apesar dos resultados promissores que os biossensores apresentaram para a detecção de diferentes analitos, a comercialização desses dispositivos ainda enfrenta dificuldades. Algumas características são importantes para a viabilização da produção dos biossensores em larga escala e da aplicação *point-of-care*, dentre elas a utilização de eletrodos descartáveis, de baixo custo e de fácil manuseio. Os biossensores comerciais mais conhecidos são os glicosímetros, amplamente utilizados por portadores de diabetes para acompanhar o nível de glicose no sangue, e os testes de gravidez, em que através da detecção e quantificação do hormônio gonadotrofina coriônica humana (hCG) é possível determinar não só a gravidez, mas também o número de semanas de gestação. Atualmente, são comercializados biossensores para a detecção de doenças como imunodeficiência humana (do inglês, *human immunodeficiency virus* - HIV), malária e tuberculose. Também estão disponíveis no mercado biossensores para a detecção das bactérias *Escherichia coli O157* e *Helicobacter pylori* que são patógenos de doenças gastrointestinais comumente encontrados na população.⁵⁷

3.3 Técnicas eletroanalíticas

Os métodos eletroanalíticos podem ser empregados para estudar as alterações físico-químicas decorrentes do biorreconhecimento. De maneira geral, esses métodos baseiam-se no uso de células eletroquímicas, em que eletrodos são mergulhados em uma solução eletrolítica, que permite monitorar as alterações físico-químicas do sistema. Os biossensores são constituídos, tipicamente, por três eletrodos: de trabalho, de referência e contra-eletrodo. O biorreconhecimento ocorre na superfície do eletrodo de trabalho, sendo este, portanto, responsável pela transdução da reação bioquímica. A corrente gerada pelo sistema flui entre o eletrodo de trabalho e contra-eletrodo, que deve apresentar uma elevada área superficial. Para monitorar o potencial do eletrodo de trabalho, utiliza-se, então, o eletrodo de referência, que deve ser mantido a um potencial fixo conhecido. Alguns métodos, no entanto, podem ser realizados em sistemas de apenas dois eletrodos.

Existem diversas técnicas eletroanalíticas com princípios de funcionamento distintos. Destacam-se as medidas amperométricas, voltamétricas, potenciométricas e impedimétricas. Em medidas amperométricas, aplica-se um potencial fixo no eletrodo de referência e mede-se a corrente gerada pela reação de oxirredução das espécies eletroativas entre o eletrodo de

trabalho e o contra-eletrodo.⁵ Quando a corrente é medida durante variações controladas do potencial, a técnica é denominada de voltametria. Já nas medidas potenciométricas, mede-se a diferença de potencial entre os eletrodos de trabalho e de referência, resultante do acúmulo de cargas na superfície do eletrodo de trabalho. Por fim, as impedimétricas consistem na aplicação de um potencial fixo e na medida da impedância do sistema.⁵

Os parâmetros obtidos por essas técnicas são dependentes dos eventos que ocorrem na superfície do eletrodo de trabalho e, por esse motivo, permitem determinar a presença da molécula alvo na amostra.

3.3.1 Voltametria cíclica (CV)

Medidas voltamétricas consistem na aplicação de um potencial que varia com o tempo. A maneira como ocorre a variação do potencial no eletrodo de trabalho em relação ao potencial fixo do eletrodo de referência define o tipo de voltametria. Voltametria de onda quadrada, voltametria de pulso diferencial e voltametria cíclica são alguns exemplos de técnicas voltamétricas.

A voltametria cíclica é um dos métodos mais utilizados para análises eletroquímicas pois fornece informações sobre o potencial redox das espécies eletroativas e a corrente gerada por essas reações. Para isso, aplica-se uma onda triangular que varre linearmente uma faixa de potencial. Ao atingir um potencial estipulado, o sentido de varredura é invertido, variando o potencial até que se complete o ciclo, como mostrado na **Figura 3.7A**. Durante a varredura em direção ao potencial mais positivo, a espécie eletroativa é oxidada em um potencial E_{pa} , com corrente anódica I_{pa} . No sentido inverso, a espécie é reduzida em um potencial E_{pc} , com corrente catódica I_{pc} , conforme **Figura 3.7B**. O gráfico gerado pelas medidas de voltametria é denominado de voltamograma.

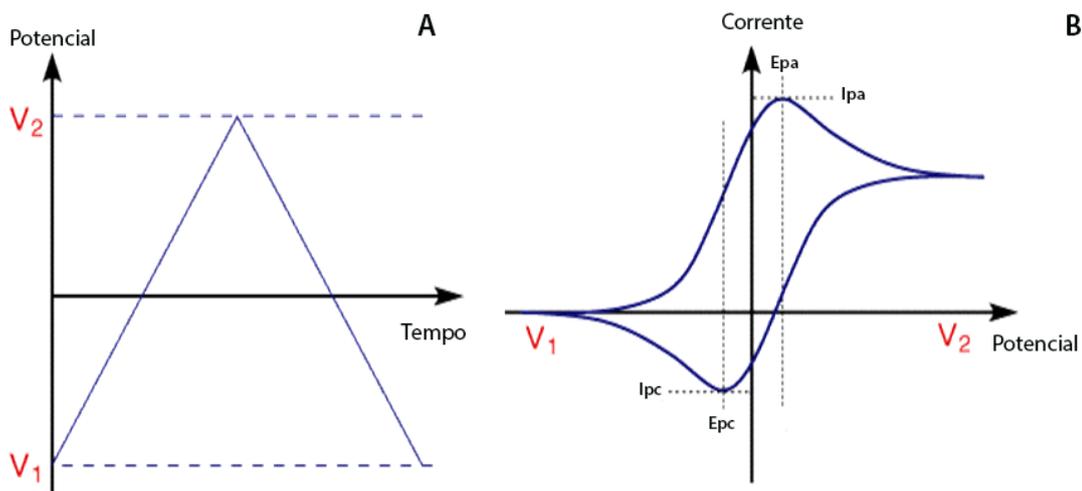


Figura 3.7 - Técnica de voltametria cíclica: **A-** onda triangular utilizada para varrer o potencial entre dois valores e **B-** voltamograma típico de uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, mostrando os picos de oxidação (E_{pa} , I_{pa}) e de redução (E_{pc} , I_{pc}), com $V_2 > V_1$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em sistemas reversíveis, as correntes de oxirredução (I_p) são proporcionais à velocidade de varredura do potencial (v), área eletroativa do eletrodo (A), número de elétrons envolvidos na reação (n), concentração das espécies eletroativas (C) e coeficiente de difusão (D), como descrito pela equação de Randles-Sevcik⁵⁸⁻⁵⁹:

$$I_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad (1)$$

A variação do potencial redox e da corrente gerada podem ser indicativos da presença do analito e de sua concentração, fazendo com que essa técnica possa ser utilizada tanto como método qualitativo quanto quantitativo.⁵

3.3.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS)

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica fornece informações sobre as propriedades elétricas na superfície do eletrodo ao variar a frequência de uma onda senoidal de baixa amplitude. A onda de excitação pode ser tanto um potencial alternado quanto uma corrente alternada, de maneira que um dos parâmetros seja controlado e o outro medido. Então, em sistemas pseudo-lineares, como é o caso de uma célula eletroquímica, a aplicação de um potencial senoidal resulta em uma corrente senoidal que oscila na mesma frequência.⁶⁰ No entanto, os componentes do sistema eletroquímico causam um deslocamento de fase e de amplitude entre essas duas ondas. A impedância do sistema, ou seja, a resistência

em um sistema de corrente alternada, é calculada como sendo a razão entre o potencial senoidal e a corrente resposta.⁶⁰⁻⁶¹ No método Faradaico, as medidas são realizadas em condições de corrente contínua utilizando mediadores redox, de maneira que as reações de oxirredução entre eles sejam monitoradas. O par redox ferricianeto de potássio ($K_3Fe(CN)_6$) e ferrocianeto de potássio ($K_4Fe(CN)_6$) é o mais utilizado para essa finalidade. Esse método de EIS é assim denominado porque a corrente gerada pelas reações eletroquímicas obedece a lei de Ohm, ou seja, é diretamente proporcional ao número de elétrons envolvidos na reação redox (n), à constante de Faraday (F), à área superficial do eletrodo (A) e ao fluxo das moléculas eletroativas (j), como mostrado na equação 2⁶²⁻⁶³:

$$I = nFAj \quad (2)$$

As medidas de impedância eletroquímica podem ser representadas pelo diagrama de Bode, em que os valores absolutos da impedância ou do ângulo de fase são plotados em função da frequência, ou pelo diagrama de Nyquist, onde os valores reais da impedância são dados em função de seus respectivos valores imaginários em um plano complexo.⁶⁴ A análise dos diagramas de Nyquist permite que se obtenha informações sobre os componentes do sistema eletroquímico, como a capacitância da dupla camada (C_{dl}), a resistência à transferência de carga (R_{ct}), a resistência da solução (R_{Ω}) e a impedância de Warburg (Z_w). Todos esses componentes formam um circuito elétrico no sistema eletroquímico que pode ser determinado através de modelos teóricos. Um circuito equivalente comumente encontrado em biossensores eletroquímicos e modelado por John Randles, é representado na **Figura 3.8A**. Para essa configuração, o gráfico de Nyquist é dividido em três regiões, conforme a frequência da onda de excitação. Em altas frequências, a impedância do capacitor é ínfima, de maneira que o sistema pode ser aproximado como sendo um circuito aberto, cuja impedância é dada apenas pela resistência da solução. Na região de frequências intermediárias, processos de transferência de cargas são predominantes. Dessa forma, observa-se um semicírculo cujo diâmetro (R_{ct}) corresponde a resistência à transferência de cargas entre o eletrólito e o eletrodo. Este parâmetro é dependente da configuração da camada de biorreconhecimento e, por esse motivo, é bastante utilizado para descrever os processos que nela ocorrem. Por fim, em regiões de baixa frequência, a impedância do sistema é governada pela difusão das espécies eletroativas (Z_w) e pela capacitância da dupla camada (C_{dl}), cujo comportamento é representado no espectro por uma reta inclinada, como mostrado na **Figura 3.8B**.^{60,64}

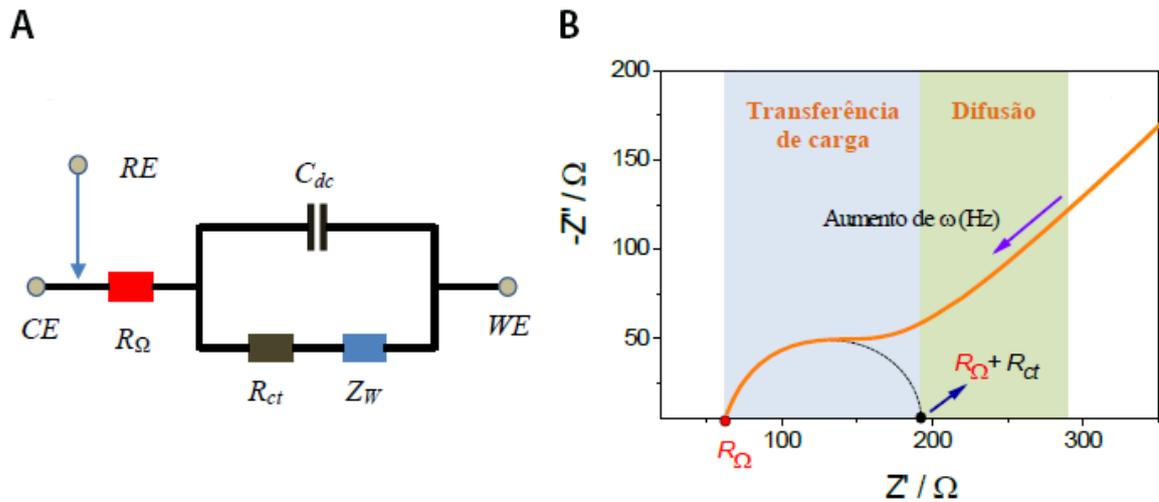


Figura 3.8 - Técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica: circuito equivalente comumente encontrado em biossensores eletroquímicos (A) e diagrama de Nyquist representando a impedância em um plano complexo em função da frequência ω (B). CE: contra-eletrodo; WE: eletrodo de trabalho; RE: eletrodo de referência.

Fonte: Adaptada de FARIA.⁶⁵

3.3.3. Espectroscopia de impedância não-Faradaica

A técnica de espectroscopia de impedância não-Faradaica consiste na aplicação de uma diferença de potencial entre duas placas metálicas (eletrodos), formando um capacitor. Biossensores operados por essa técnica também são denominados de biossensores capacitivos. O método não-Faradaico é realizado utilizando apenas uma solução eletrolítica como KCl e PBS, descartando a necessidade de mediadores redox. Em biossensores capacitivos, os eventos que acontecem na camada de reconhecimento causam alterações na constante dielétrica do meio (ϵ) que impactam diretamente no valor da capacitância do sistema, como descrito na equação 3:

$$C = \epsilon \epsilon_0 A / d \quad (3)$$

onde ϵ_0 é a constante dielétrica no vácuo (dada pelo valor 8.85419 pF/m), A é a área das placas e d é a distância entre elas. Além disso, a geometria dos eletrodos reflete na capacidade de detecção desses dispositivos, uma vez que quanto maior for o fator $\epsilon_0 A / d$, maior será a alteração na capacitância em função do ϵ .^{63,66-67} Assim, para a detecção de biomoléculas, é importante que o eletrodo apresente placas paralelas muito próximas e com grande área geométrica. Nesse sentido, eletrodos interdigitados (do inglês, *interdigitated electrode* - IDE) são os mais utilizados para biossensores capacitivos. Na configuração típica de um IDE,

inúmeras placas metálicas denominadas de *fingers* são colocadas em paralelo, cada par formando um capacitor, como ilustrado na **Figura 3.9A**. Com essa configuração, os capacitores são associados em paralelo, de tal forma que a capacitância total do sistema (C_t) é dada pela soma das capacitâncias individuais (C_1, C_2, \dots) conforme descrito pela equação 4:

$$C_t = C_1 + C_2 + \dots \quad (4)$$

Por sua vez, a capacitância individual é dada pela capacitância na superfície de cada um dos *fingers* que formam o par, somada a capacitância lateral (entre eles). A alteração na constante dielétrica dependerá da estratégia de imobilização escolhida para as biomoléculas receptoras. Em algumas estratégias, as biomoléculas podem se ligar apenas ao substrato isolante (entre os *fingers*) enquanto que em outras, as biomoléculas se ligam a superfície metálica. A **Figura 3.9B** ilustra o corte transversal de um IDE modificado com anticorpos, ligados apenas ao ouro.^{63,66,68-69} Após a interação com a proteína alvo, ocorre a alteração da capacitância na superfície e na lateral dos capacitores, mensurada através da variação da frequência da onda aplicada. O gráfico típico de uma medida elétrica é apresentado na **Figura 3.9C**.

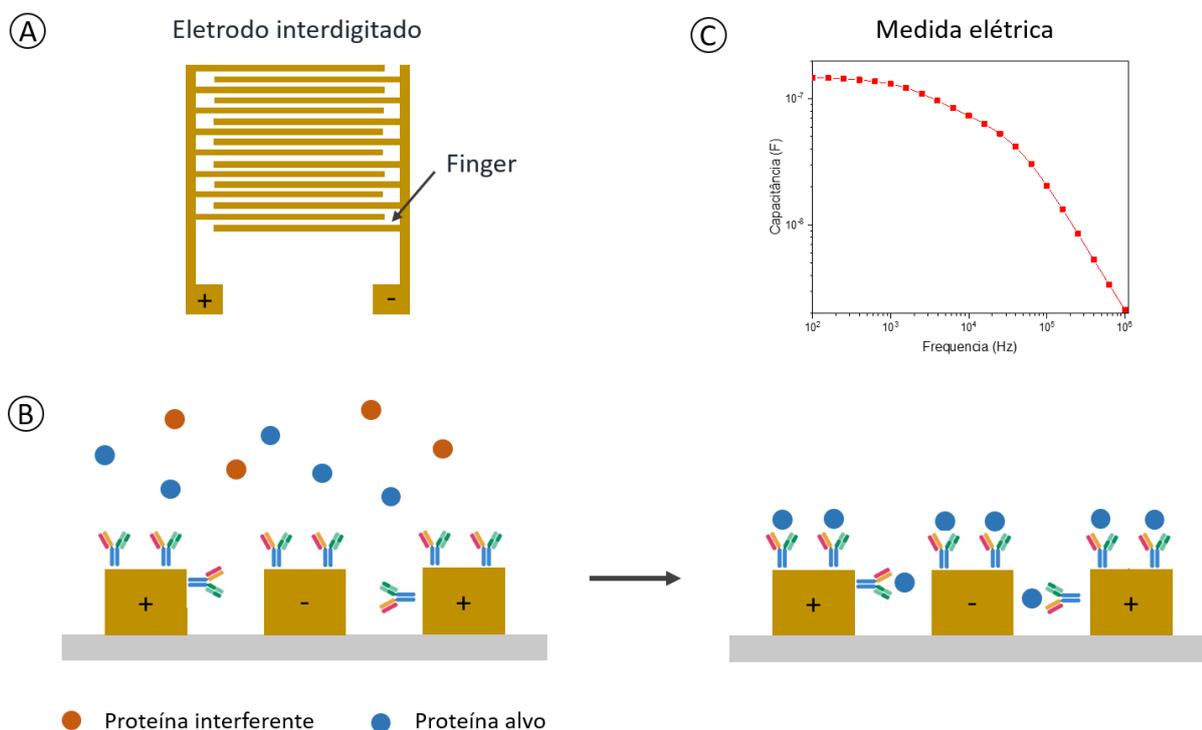


Figura 3.9 - Modelo esquemático de um biossensor capacitivo: **A-**) Eletrodo de ouro interdigitado **B-**) Visão lateral de um eletrodo interdigitado modificado com anticorpos quando colocado em uma amostra a ser analisada **C-**) Gráfico típico de uma medida de capacitância.

Fonte: Elaborada pela autora

Eletrodos interdigitados são normalmente fabricados com o uso de litografia e de técnicas de deposição, por exemplo, *sputtering*, em que metais são depositados na configuração que se deseja em substratos isolantes como o vidro e o silício.

Para dispositivos *point-of-care*, a espectroscopia de impedância não-faradaica é mais vantajosa do que a técnica de EIS porque requer uma eletrônica mais simples e não precisa de mediadores redox para a realização das análises.⁶³ Thapa et al. desenvolveram um imunossensor capacitivo em eletrodos interdigitados para a detecção da glicoproteína CA 19-9, um biomarcador do câncer pancreático. O biossensor apresentou boa sensibilidade com limite de detecção de 0,35 U/mL.⁷⁰ Utilizando eletrodos interdigitados modificados com aptâmeros, Arya et al. desenvolveram um biossensor capaz de detectar proteínas HER2, encontradas em níveis elevados no soro de pacientes com câncer de mama. As medidas de capacitância foram realizadas para uma única frequência (1 Hz) onde foi possível detectar concentrações na faixa de 1 pM a 100 pM.⁷¹

3.4 Método estatístico multivariado

Métodos estatísticos multivariados são empregados na análise de amostras compostas por diversas variáveis a fim de identificar correlações entre elas e a influência exercida por cada uma na discriminação de conjuntos amostrais. As técnicas compreendidas pela análise multivariável distinguem-se na maneira como os dados são tratados, em que são considerados aspectos como a existência de variáveis independentes e se são quantitativas (numéricas) ou qualitativas (categóricas).⁷²⁻⁷³ A análise de componentes principais (do inglês, *Principal component analysis* – PCA) é um dos métodos estatísticos mais utilizados para amostras com múltiplas variáveis e será discutido na próxima seção.

3.4.1 Análise de componentes principais (PCA)

Em um conjunto amostral multivariado, cada variável é representada como uma coordenada no espaço de dados com dimensão equivalente ao número de variáveis. Por exemplo, uma amostra contendo cinco variáveis forma um espaço de dados com cinco dimensões. O PCA é um método estatístico muito vantajoso na análise de amostras multivariadas porque tratamentos matemáticos aplicados por ele reduzem a dimensionalidade dos dados. Combinações lineares das variáveis iniciais correlacionadas geram um número

reduzido de variáveis não correlacionadas, denominadas de componentes principais. Tais combinações são efetuadas de forma a maximizar a variância entre os dados, importante para a discriminação de grupos amostrais distintos. As componentes principais são classificadas de acordo com a variância resultante delas (*score*) de tal forma que a componente principal 1 (PC1) seja a de maior *score* e, portanto, a que melhor discrimina as amostras. Para que sejam geradas as combinações lineares, é preciso construir uma matriz de covariância a partir dos dados que se deseja analisar. Para exemplificar, vamos considerar amostras de rios que possuem variáveis como pH, temperatura, quantidade de nitrogênio e quantidade de fósforo. Essas variáveis apresentam unidades de medida distintas e precisam primeiro ser padronizadas para que sejam representadas na mesma escala relativa. Aos dados brutos é subtraído a média amostral de cada variável e, então, divide-se pelo seu desvio padrão. Dessa forma, as componentes principais não serão dominadas pelas variáveis com maior unidade de medida.⁷²⁻⁷⁴ Em seguida, gera-se a matriz de covariância, ilustrada na **Figura 3.10**.

	pH	Temperatura	Nitrogênio	Fósforo
Amostra 1	-1.3	-1.7	0.2	0.6
Amostra 2	-0.9	-1.2	0.3	0.4
Amostra 3	-1.1	-1.9	0.2	0.7

Figura 3.10 – Exemplo de matriz de covariância para três amostras com quatro variáveis distintas.
Fonte: Elaborada pela autora

Seja **R** a matriz de covariância, existe uma matriz ortogonal **A**, que satisfaz a relação $A'RA = D$, onde **D** é um matriz diagonal. Então, a matriz de covariância pode ser decomposta em autovalores, elementos diagonais de **D**, e autovetores que são as colunas de **A**. A Figura **3.11** ilustra uma matriz ortogonal com dois dos seus autovetores em destaque.

$$\mathbf{A} = \begin{array}{c} \text{Autovetor 1} \qquad \qquad \qquad \text{Autovetor 3} \\ \left[\begin{array}{cc|cc} \textcircled{0,3} & 0,2 & \textcircled{0,2} & 0,4 \\ \textcircled{0,2} & 0,4 & \textcircled{0,5} & 0,4 \\ \textcircled{0,1} & 0,1 & \textcircled{0,7} & 0,6 \\ \textcircled{0,3} & 0,5 & \textcircled{0,7} & 0,2 \end{array} \right] \end{array}$$

Figura 3.11 - Exemplo de uma matriz ortogonal que diagonaliza a matriz de covariância. Cada coluna dela corresponde a um autovetor.

Fonte: Elaborada pela autora

As componentes principais para cada amostra são obtidas pela multiplicação da matriz R pela matriz A. A primeira linha da matriz de dados multiplicada pelo autovetor 1 gera a componente principal Z_1 para a amostra 1. Cada componente do autovetor representa um peso dado a variável, denominado de *loading*. Usando os dados amostrais da **Figura 3.10** e os valores do autovetor 1 (**Figura 3.11**) temos, como exemplo:

$$Z_1 = (0,3 \times -1,3) + (0,2 \times -1,7) + (0,2 \times 0,1) + (0,6 \times 0,3)$$

$$Z_1 = -1,69$$

onde -1,69 é o *score* atribuído a Z_1 para a amostra 1.

Para quatro variáveis serão geradas quatro componentes principais. No entanto, os gráficos de *score* normalmente apresentam apenas as duas mais importantes – PC1 e PC2. Nesse tipo de análise, usa-se também o gráfico de *loadings* para apresentar o peso de cada variável. Através dele, é possível determinar quais são as variáveis que mais contribuem na distinção das amostras.

Muitos trabalhos já integram o método de PCA com plataformas biossensoras, como a língua eletrônica, para a discriminação de amostras. *Medina-Plaza, Saja e Rodriguez-Mendez* reportaram um biossensor enzimático para avaliação de seis compostos fenólicos em uvas. Neste sistema multissensorial, os valores de voltametria cíclica para cada amostra eram registrados e submetidos a análise de PCA. Utilizando essa integração, o biossensor foi capaz de discriminar uvas de diferentes variedades.⁷⁵ Também utilizando voltametria cíclica e PCA, *Salvo-Comino* e colaboradores, desenvolveram um biossensor eletroquímico capaz de distinguir amostras de leite com base no teor de lactose.⁷⁶ Em 2019, *Milovanovic e* colaboradores apresentaram uma língua eletrônica para a classificação de vinhos através da

quantificação de ácidos carboxílicos nas amostras. Para isso, eletrodos de platina do tipo *screen-printed* foram modificados com enzimas sarcosina oxidase. Ácidos carboxílicos específicos, como o ácido láctico, interagem com essas enzimas, inibindo-as, de maneira que o H_2O_2 produzido pela interação enzima-substrato diminua. A quantificação do H_2O_2 , feita por medidas amperométricas, foi registrada e analisada por PCA. Os resultados mostraram que os ácidos láctico e maleico eram os principais responsáveis pela discriminação das amostras, indicando que a fermentação malolática tem grande influência nos vinhos.⁷⁷

Portanto, métodos estatísticos multivariados, como o PCA, contribuem significativamente na interpretação dos dados gerados pelas plataformas biossensoras, especialmente, na identificação de grupos amostrais.

4 Materiais e métodos

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes

Foram adquiridos da *Sigma-Aldrich* os seguintes reagentes: fosfato de sódio monobásico $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), 6-mercaptop-1-hexanol (MCH), 2-mercaptopetanol (MCE), ácido 3-mercaptopropiônico (MPA), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), ácido sulfúrico (H_2SO_4), cloreto de sódio (NaCl), hidróxido de potássio (KOH), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), ditioneitol (DTT), ferricianeto de potássio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) e ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$). Os reagentes Tris HCl e Tris base são provenientes da marca *Hexapur Bio Lab* e as sequências genômicas são da *Integrated DNA Technologies (IDT)*. As sequências de captura sintéticas adquiridas possuem em sua extremidade 5' um espaçador contendo seis carbonos, seguido de um grupo tiol. A coluna de exclusão molecular *Sephadex*TM *NAP*TM-5 usada na etapa de purificação do DNA de captura foi adquirida da *GE Healthcare* (UK).

4.1.2 Soluções

Tampão Tris-EDTA (TE): 10 mmol/L de Tris-HCl + 1 mmol/L de EDTA + 0,1 mol/L de NaCl (pH= 7,4).

Tampão fosfato salino (1X PBS, pH 7,4): 10 mmol/L de PO_4^{-3} + 0,1 mol/L de NaCl.

Tampão fosfato (10X PB, pH 8,3): 100 mmol/L de PO_4^{-3}

Solução de MCH: 1 mmol/L de MCH em água Milli-Q.

Solução de MCE: 1 mmol/L de MCE em água Milli-Q.

Solução de MPA: A solução estoque é preparada a 100 mmol/L em etanol e depois diluída para 1 mmol/L em Milli-Q.

Solução de EDC/NHS: 2 mmol/L de EDC + 5 mmol/L de NHS em Milli-Q

Solução $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$: 5 mmol/L de ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) + 5 mmol/L de ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$) em 0,1 mol/L de KCl, pH 7,4.

Solução DTT: 100 mmol/L de DTT em 1X PB (pH= 8,3).

Solução de KOH: 2% (m/V) em etanol

4.2 Métodos

4.2.1 Fabricação eletrodos descartáveis

Para a construção de um biossensor eletroquímico capaz de detectar até quatro analitos em uma mesma amostra, foi desenvolvida uma nova configuração de dispositivo multiplex, contendo um contra-eletródo, quatro eletrodos de trabalho e dois eletrodos de referência – um para os dois eletrodos de trabalho localizados do lado direito e outro para os eletrodos de trabalho do lado esquerdo a fim de manter a mesma distância entre eles. Eletrodos de trabalho e referência apresentam 2 mm de diâmetro e área geométrica igual a $3,14 \text{ mm}^2$; contra-eletródo possui área geométrica igual a 70 mm^2 . A **Figura 4.1A** ilustra a configuração descrita. Já para o biossensor elétrico, os eletrodos interdigitados desenvolvidos possuem 150 fingers (75 pares) separados por $10 \mu\text{m}$, conforme configuração apresentada na **Figura 4.1B**.

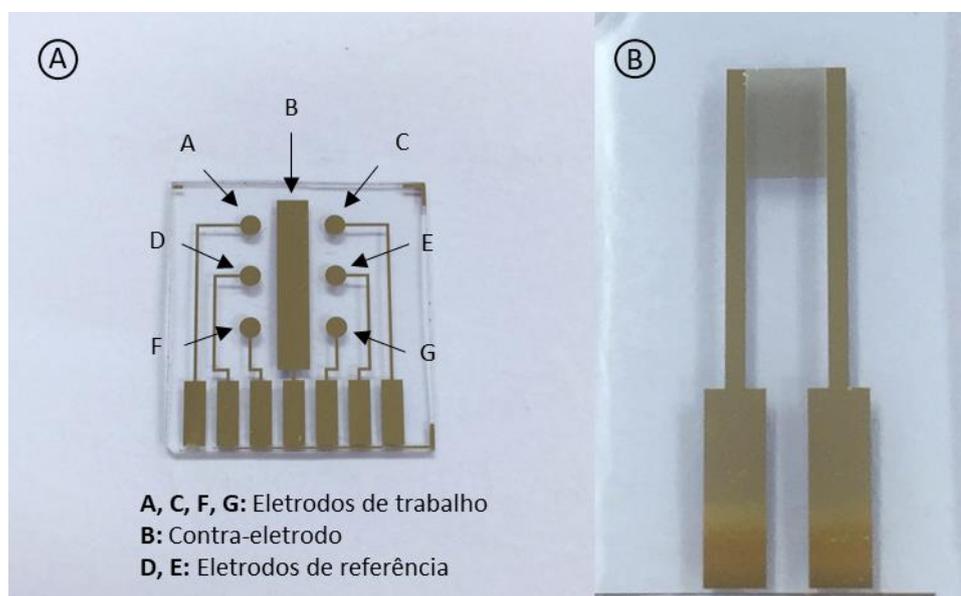


Figura 4.1 - Eletrodos descartáveis fabricados em substrato de vidro pelas técnicas de fotolitografia e sputtering: **A-**) multiplex e **B-**) interdigitado.

Fonte: Elaborada pela autora

Os eletrodos descartáveis multiplex e interdigitados foram fabricados pela técnica de fotolitografia com metalização por *sputtering*. Na primeira etapa do processo, os substratos (vidro BK7 e BOPET para eletrodos multiplex e apenas vidro BK7 para os interdigitados)

foram modificados com um filme fotossensível, chamado de fotorresiste, pela técnica de *spin coating* e deixados por 10 min em chapa aquecedora a 90°C para a cura do fotorresiste. Na etapa seguinte, os substratos foram expostos a luz ultravioleta através de uma máscara óptica contendo a configuração desejada para o dispositivo. Nesse caso, foi usado fotorresiste positivo, em que as regiões expostas a luz foram removidas pela solução química reveladora (solução aquosa de hidróxido de potássio). Após a etapa de fotolitografia, os substratos foram submetidos a limpeza com plasma de oxigênio para a remoção de resíduos orgânicos.

A metalização foi conduzida em uma câmara de vácuo e a espessura medida por cristal de quartzo. Para os eletrodos interdigitados, primeiro depositou-se uma camada de cromo de 15 nm para adesão no substrato, depois foi depositada uma camada de ouro com 120 nm de espessura. Para os eletrodos multiplex, a camada de adesão foi construída com a deposição de titânio com 20 nm de espessura e, sobre ela, depositou-se 140 nm de ouro. Nesse caso, utilizou-se titânio para a camada de adesão porque durante a limpeza eletroquímica em solução de ácido sulfúrico –necessária para uma imobilização mais eficiente de moléculas tioladas- o cromo é oxidado antes do ouro, danificando o eletrodo.

4.2.2 Limpeza eletrodos

Eletrodo interdigitado

Para a limpeza desses eletrodos foram testados dois procedimentos. No primeiro, nomeado de KOH, os eletrodos eram imersos na solução de KOH 2% (m/V) e deixados em banho de ultrassom por 5 min. Em seguida, era realizado o mesmo procedimento imergindo os eletrodos em etanol e depois em Milli-Q. No segundo procedimento, nomeado de etOH, os eletrodos eram limpos apenas em etanol e Milli-Q, também por 5 min em banho de ultrassom.

Eletrodo multiplex

Eletrodos com essa configuração foram previamente limpos com etanol seguido de Milli-Q. Então, realizou-se a limpeza eletroquímica em solução de H₂SO₄ 0,5 mol/L. Cada eletrodo de trabalho foi submetido a 5 ciclos de voltametria cíclica a 100 mV s⁻¹ na faixa de potencial de -0,3 a 1 V. Esse procedimento foi realizado três vezes, trocando a solução ácida entre elas.

Eletrodo de ouro (barra)

A primeira etapa de limpeza dos eletrodos de ouro foi feita submergindo-os em solução piranha. Em seguida, os eletrodos foram submetidos à voltametria cíclica em 0,5 mol/L de H₂SO₄, para que fosse realizada a limpeza eletroquímica. Nesta segunda etapa, foram realizados 50 ciclos a 250 mV s⁻¹ e 30 ciclos a 100 mV s⁻¹ em um intervalo de 0 a 1,8 V.

4.2.3 Planejamento sequências de DNA

A primeira etapa do planejamento das sequências de DNA foi avaliar quais espécies de nematoides parasitas de plantas causavam maior impacto econômico e eram, portanto, potenciais alvos para detecção. Dessa forma, foram selecionadas três espécies: *Meloidogyne incógnita*, *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus brachyurus*.

Com o auxílio do banco de dados GenBank, foram escolhidas, para cada espécie, regiões do genoma responsáveis por codificar proteínas, a fim de evitar que mutações genéticas nas regiões escolhidas pudessem inviabilizar a detecção. Na etapa posterior, utilizando o software CLUSTAL X, as regiões genômicas das cinco espécies foram alinhadas para que fossem selecionadas sub-regiões de menor similaridade entre elas. Dentro dessas sub-regiões foram escolhidas as sequências alvo e de captura com o auxílio do software *PrimerQuest Tool* (IDT DNA Technologies), levando em consideração parâmetros desejados como tamanho das sequências. Nessa etapa, também foram escolhidos valores apropriados para a temperatura de *melting* e para a porcentagem de bases GC a fim de favorecer a hibridização entre as sequências alvo e de captura.

Por fim, as sequências de captura escolhidas para cada espécie ainda foram alinhadas com sequências de espécies do mesmo gênero para garantir seletividade ao método. Por exemplo, a sequência escolhida da espécie *Pratylenchus brachyurus*, foi também alinhada com as sequências genômicas das espécies *Pratylenchus neglectus* e *Pratylenchus coffeae*.

As sequências obtidas por esse trabalho de bioinformática são apresentadas na **Tabela 4.1**.

Tabela 4.1 - Relação das sequências alvo e de captura projetadas neste trabalho para cada uma das espécies selecionadas. As sequências de captura apresentam grupo tiol na extremidade 5' para ligação nos eletrodos de ouro e são complementares à região em negrito das sequências alvo.

Sequência (5' - 3')	
<i>Meloidogyne incognita</i>	
Sequência alvo	CCGTTGCATTGCTGCCAGGATGGGTTATTCCGTGATGAAG
Sequência de captura	SH-(CH ₂) ₆ -CTTCATCACGGAATAACCCATCC
<i>Meloidogyne javanica</i>	
Sequência alvo	AGCAACCTCCCAGCTTTGGATATGGCTTCGATTCTGATG
Sequência de captura	SH-(CH ₂) ₆ -CATCAGGAATCGAAGCCATATCC
<i>Pratylenchus brachyurus</i>	
Sequência alvo	GACGGCTAACGCTGGCGTCTGTATGTTGTTGAGCAATTGT
Sequência de captura	SH-(CH ₂) ₆ -ACAATTGCTCAACAACATACAGACG

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.4 Redução, purificação e quantificação das sequências de DNA

As sequências de DNA de captura modificadas com grupo tiol na extremidade 5' são enviadas pelo fabricante na sua forma protegida, ou seja, o enxofre pertencente ao grupo tiol participa de uma ligação dissulfeto com uma pequena cadeia carbônica adicional. Esse procedimento é importante para evitar que grupos tíois de dois oligonucleotídeos adjacentes se liguem formando dímeros, haja vista que nessa condição eles não estariam disponíveis para

se ligarem ao ouro na superfície do eletrodo. Para romper a ligação dissulfeto e disponibilizar os grupos tíóis para formarem a ligação tiol-ouro, realiza-se um procedimento de redução utilizando um agente redutor, por exemplo, o DTT.⁷⁸

Assim, sequências de DNA de captura liofilizadas foram ressuspensas em solução de DTT 100 mmol/L em pH 8,3 e incubadas em um shaker sob agitação de 300 rpm por 2 h a 25°C. Esse pH é necessário para que os grupos tíóis do DTT estejam na forma oxidada e sejam capazes de reduzir a ligação dissulfeto. A reação completa é apresentada na **Figura 4.2**.

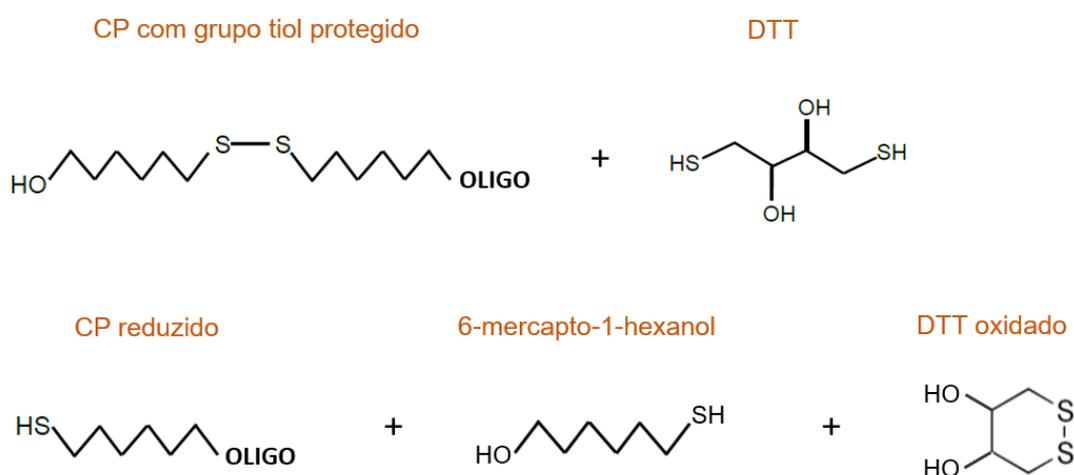


Figura 4.2 – Reação de redução do DNA de captura (CP) com grupo tiol protegido, utilizando o DTT como agente redutor.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após a etapa de redução, realizou-se a purificação das sequências de DNA por meio de filtração em gel utilizando a coluna de exclusão molecular *Sephadex*TM NAPTM-5. Nesse procedimento, a coluna foi equilibrada inicialmente com 10 mL de tampão TE e, em seguida, adicionou-se a solução contendo o DNA. Após a completa penetração no gel, foi feita a eluição com tampão TE em volume apropriado, de maneira a se obter as alíquotas contendo as sequências de DNA reduzidas e purificadas. A concentração final desses oligonucleotídeos foi determinada por medidas de absorvância em 260 nm utilizando-se o espectrofotômetro Nanodrop One. Durante esse procedimento, também foram avaliadas possíveis contaminações com proteínas através da razão entre as absorvâncias em 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}), cujo valor próximo a 1,8 indica que o DNA está puro. Similarmente, a razão entre 260 e 230 nm

(A260/230) foi medida a fim de avaliar contaminação por outros compostos, como fenóis e carboidratos. Neste caso, valores entre 2,0-2,2 são considerados ideais.

4.2.5 Extração de proteínas dos nematoides e produção de anticorpos

Para a construção dos imunossensores, foi necessária a extração de proteínas dos nematoides para serem utilizadas como antígenos na produção de anticorpos específicos e para os testes com os biossensores, uma vez que não são comercializados, até o momento, pares antígeno-anticorpo de nematoides parasitas de plantas. Dessa forma, amostras das três espécies selecionadas contendo ovos e juvenis foram coletadas de solos por nematologistas. A **Figura 4.3A** ilustra a amostra recebida da espécie *Pratylenchus brachyurus*. Em nosso laboratório foi realizada, primeiramente, a etapa de remoção de resíduos do solo. Esse processo é imprescindível para que as proteínas obtidas ao final do processo sejam provenientes apenas de nematoides e, assim, garantir a especificidade dos anticorpos. Para isso, utilizou-se o método de centrifugação em solução de sacarose, em que as amostras em solução aquosa foram centrifugadas em uma primeira etapa por 10 min a 2000 rpm, de maneira que os nematoides e os resíduos de solo ficassem depositados no fundo do tubo falcon. Os sobrenadantes foram retirados e adicionou-se uma solução de sacarose 40 g/75 mL; as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por 10 min a 650 g de rotação. Após essa segunda centrifugação, os nematoides (ovos e juvenis) ficaram em suspensão no sobrenadante enquanto os resíduos formaram precipitados, em razão da densidade da sacarose ser superior à densidade dos nematoides. Os sobrenadantes contendo os nematoides foram coletados e filtrados em uma peneira granulométrica de 500 mesh (abertura da malha de 0,025 mm). Nesse procedimento os nematoides ficam retidos na malha e para serem coletados, a peneira foi invertida e enxaguada com volume apropriado de água. Por fim, as soluções foram analisadas em microscópio ótico com lente de aumento de 40X para conferir se as amostras finais continham uma quantidade significativa de nematoides e se os resíduos de solo tinham sido removidos.

Após a remoção de resíduos, realizou-se a extração das proteínas. As amostras contendo nematoides foram processadas em um homogeneizador do tipo Turrax por 15 s, três vezes, conforme mostrado na **Figura 4.3B**. Em seguida, para romper as membranas celulares e extrair as proteínas, as amostras foram sonicadas em sonicador de ponta por 1 h com 20% de amplitude. Como durante esse processo ocorre o aquecimento da amostra, elas foram

imersas em gelo, que era trocado a cada 20 min de sonicação. O homogenato contendo as proteínas é apresentado na **Figura 4.3C**.



Figura 4.3 – Extração de proteínas de nematoides: Amostras coletadas em solo antes da remoção de resíduos (A), processamento em turrax (B) e homogenato contendo as proteínas (C).

Fonte: Elaborada pela autora

As proteínas contidas no homogenato foram quantificadas pelo método colorimétrico de Bradford,⁷⁹ que faz uso do corante *Coomassie brilliant blue* BG-250. Ao interagir com proteínas, o BG-250 assume sua forma aniônica de maneira que o seu máximo de absorção, que na forma livre ocorre em 465 nm, é deslocado para 595 nm. A intensidade de absorção em 595 nm é linearmente dependente da concentração de proteínas, ou seja, quanto mais proteínas tiver, maior será a absorção. Para determinar a quantidade de proteínas totais em uma amostra, utiliza-se como referência uma curva-padrão construída com concentrações conhecidas de uma proteína, tipicamente, albumina de soro bovino (BSA). Em nosso experimento, preparamos soluções de BSA em PBS 1X nas concentrações 0, 0,0625, 0,125, 0,250, 0,5 e 1 mg/mL. Utilizando uma placa de 96 poços, adicionamos 10 μ L de cada solução a 250 μ L de BG-250, todas em triplicata; mantivemos a placa protegida da luz e aguardamos 10 min. Em espectrofotômetro UV-Vis fizemos a leitura da absorbância em 595 nm; dos valores obtidos para as soluções de BSA, subtraiu-se a absorção do solvente utilizado (PBS) e calculou-se a média das triplicatas. A partir desses resultados, construímos um gráfico com a absorbância no eixo y e a concentração de BSA no eixo x; fizemos uma regressão linear e geramos a nossa curva-padrão, considerando como válidas aquelas com $R^2 > 0,95$. O mesmo procedimento de medida com o corante BG-250 foi realizado para os homogenatos dos

nematoides. Utilizou-se a equação da reta ($y = a x + b$) obtida pela curva-padrão, com os valores dos coeficientes a e b determinados, para quantificar as proteínas totais substituindo o y pela absorbância medida em cada réplica.

Uma vez extraídas e quantificadas as proteínas, alíquotas contendo volumes apropriados das amostras de cada espécie de nematoide foram enviadas para a empresa de biotecnologia *Proteimax*, responsável pela produção dos anticorpos policlonais em coelhos. No protocolo adotado, antes de iniciar as imunizações, retira-se o soro pré-imune dos animais para teste imunoenzimático (ELISA) contra o antígeno. Caso não haja anticorpos específicos contra ele, realiza-se a imunização sequenciada, em que o antígeno é aplicado 4 vezes respeitando o intervalo de 15 dias entre cada aplicação.

O soro imunizado contendo os anticorpos foi utilizado para a construção da camada de biorreconhecimento do imunossensor elétrico. As proteínas extraídas foram utilizadas como controles positivos e negativos na etapa de detecção.

4.3 Caracterização química e morfológica dos eletrodos

4.3.1 Microscopia de força atômica (AFM)

A microscopia de força atômica foi utilizada para a caracterização morfológica dos eletrodos de trabalho. Em um microscópio FLEXAAFM (*Nanosurf*) operado no modo contato intermitente foram coletadas imagens utilizando cantiléver de silício com frequência de ressonância 300 kHz e constante de força 40 N/m. Para a análise de rugosidade foram utilizadas as imagens de $10 \mu\text{m}^2$ com resolução de 512 pixels e processadas com o auxílio do software *Gwyddion*.

4.3.2 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS)

A fim de avaliar a eficiência da limpeza eletroquímica, utilizou-se a técnica de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X na análise da composição química de eletrodos multiplex com e sem limpeza eletroquímica, descrita na seção 4.2.2. As medidas foram realizadas em espectrômetro ScientaOmicron ESCA+ com fonte de excitação monocromática Al $K\alpha$ ($h\nu = 1486,7 \text{ eV}$) e 125 canais de detecção. A pressão da câmara foi

mantida a 2×10^{-9} mbar e os espectros foram adquiridos com passo de energia de -0,5 eV. Para evitar o carregamento da amostra durante as medidas, utilizou-se um neutralizador de cargas.

4.4 Técnicas eletroanalíticas

Na caracterização eletroquímica dos eletrodos multiplex foram utilizadas as técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. Para realizar as medidas, fabricamos um suporte composto por uma base de teflon e um cabeçote de acrílico flexível contendo 7 pinos de ouro que fazem o contato elétrico com os eletrodos. Na parte superior dos pinos saem fios de condução que são conectados ao potenciostato, conforme **Figura 4.4A**. A fim de delimitar a área coberta pela solução eletrolítica e manter as soluções usadas na construção da camada de biorreconhecimento em cima dos eletrodos de trabalho, foram usados adesivos isolantes, como mostrado na **Figura 4.4B**. As medidas de CV e EIS foram realizadas com solução eletrolítica de 5 mmol/L de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ em 0,1 mol/L de KCl.

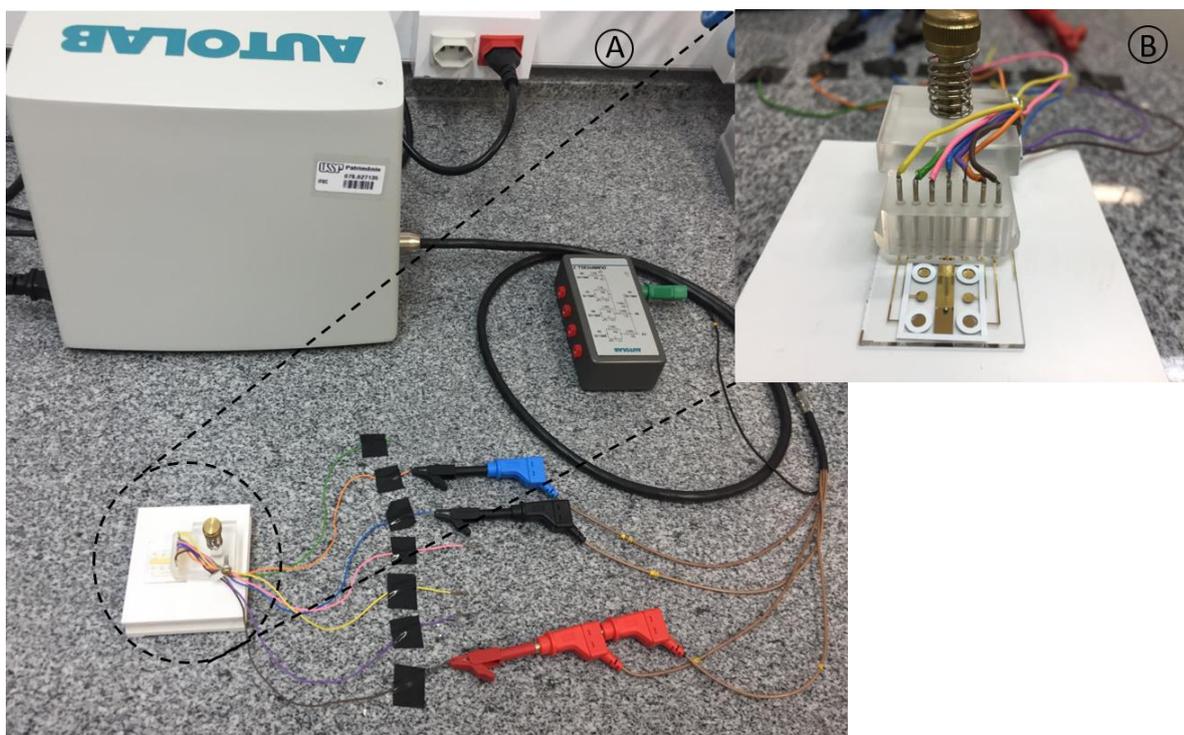


Figura 4.4 – Montagem do sistema para medidas eletroquímicas: Suporte de contato acoplado ao potenciostato (A) e no detalhe, eletrodo com adesivos para delimitar a área disponível para a solução eletrolítica (B).

Fonte: Elaborada pela autora

Para o biossensor elétrico, utilizou-se a técnica de espectroscopia de impedância elétrica. As medidas foram realizadas com o auxílio de um suporte de teflon de 3 contatos, embora usássemos apenas 2, e com adesivo isolante para delimitar a área coberta pelas soluções. A **Figura 4.5** apresenta o sistema elétrico descrito.



Figura 4.5 – Montagem do sistema para medidas elétricas: Eletrodo interdigitado, com área delimitada por adesivo isolante, é inserido em um suporte de três contatos conectados por dois cabos ao espectrômetro.

Fonte: Elaborada pela autora

4.4.1 Voltametria cíclica (CV)

A técnica de voltametria cíclica foi utilizada para a caracterização dos eletrodos. Os voltamogramas foram coletados em Potenciostato/Galvanostato *Autolab* PGSTAT204 com módulos FRA32M utilizando o software NOVA 2.0. Foram realizados 3 ciclos no intervalo de potencial de -0,5 a 0,6 V, a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

4.4.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS)

Após a ativação dos eletrodos com as medidas de CV, foram colhidos os espectros de impedância eletroquímica em potencial de circuito aberto. As medidas foram realizadas na janela de frequência de 10^{-1} Hz a 10^3 Hz , com amplitude AC de 10 mV. Utilizando o *software* NOVA 2.0, determinou-se o circuito elétrico equivalente e os valores das resistências da solução (R_S) e da transferência de cargas (R_{CT}).

4.4.3 Espectroscopia de impedância elétrica

As medidas de impedância elétrica (não-Faradaica) foram realizadas em um espectrômetro Solartron 1260, com a aplicação de uma tensão AC de 10 mV. A capacitância do eletrodo interdigitado foi medida na faixa de frequência de 10^2 Hz a 10^6 Hz, com a aquisição de 5 pontos por década. Para caracterizar as modificações no eletrodo, os espectros foram coletados em solução PBS 1X após 5 min, tempo de espera para a organização da dupla camada elétrica.

5 Resultados e discussão

5.1 Genossensor eletroquímico em eletrodos de barra

O desenvolvimento de um biossensor em eletrodos descartáveis requer uma etapa prévia de validação da metodologia em eletrodos de barra utilizando uma célula eletroquímica, considerados como modelo. Esse procedimento é importante para verificar se problemas na detecção são provenientes do sistema transdutor usado (eletrodo) ou do reconhecimento biológico. O eletrodo de barra e a célula eletroquímica, composta ainda por um contra-eletrodo de platina (0,5 cm x 1,0 cm) e um eletrodo de referência Ag/AgCl (com solução interna de KCl 3 mol/L), são ilustrados nas **Figuras 5.1A e 5.1B**.

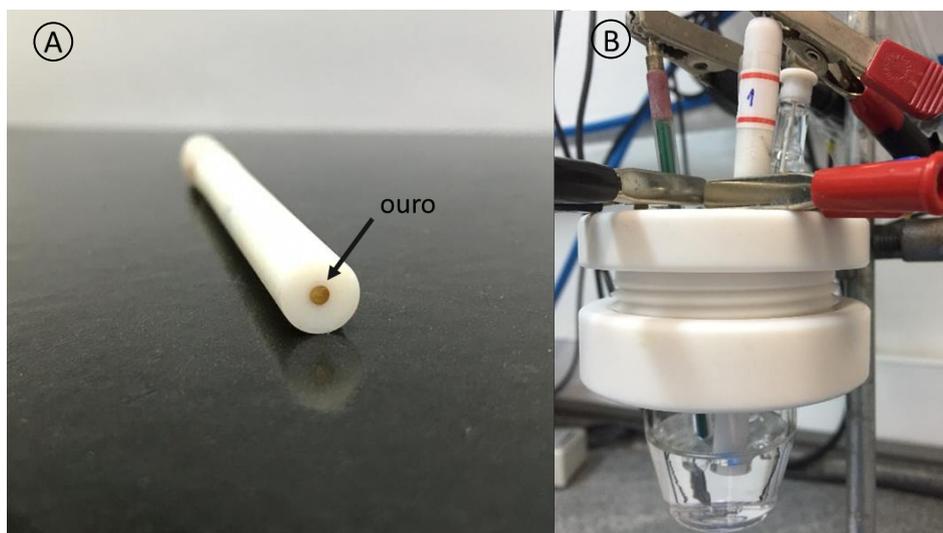


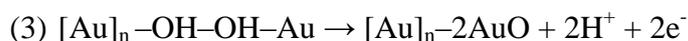
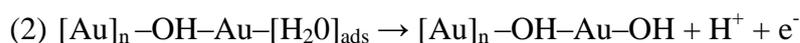
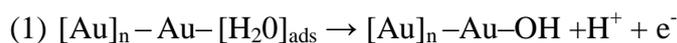
Figura 5.1 – Sistema eletroquímico utilizado como modelo: (A) eletrodo de ouro tipo barra e (B) célula eletroquímica composta também por contra-eletrodo de platina e eletrodo de referência Ag/AgCl.

Fonte: Elaborada pela autora

5.1.1 Cálculo da área eletroativa dos eletrodos

Sabe-se que a superfície de eletrodos sólidos não é totalmente plana, apresentam depressões e aclives, de forma que a área real é maior do que a área geométrica deles. A determinação da área eletroativa ou área da superfície real é fundamental para que se compare os parâmetros obtidos durante os processos eletroquímicos, como corrente elétrica e resistência à transferência de cargas, em eletrodos diferentes, uma vez que a RSA implica no número de sítios ativos disponíveis. Tal procedimento é especialmente importante quando os

biossensores são construídos em eletrodos descartáveis porque é preciso garantir que a RSA não seja muito distinta entre eles. Existem diversos métodos para determinar a área eletroativa de eletrodos, dentre eles, adsorção de hidrogênio, capacitância da dupla camada elétrica e adsorção de oxigênio. Trasatti e Petrii, em 1991, apresentaram um artigo de revisão desses métodos, apontando vantagens e desvantagens de cada um.⁸⁰ Nesse trabalho, optamos por determinar a RSA a partir da adsorção de oxigênio. A monocamada de óxido é formada pela realização de voltametria cíclica em meio ácido e ocorre em três processos sequenciais: (1) moléculas de água adsorvidas na superfície do ouro são oxidadas resultando na transferência de um elétron e na formação de radicais hidroxilas; (2) as hidroxilas rotacionam para baixo da última camada metálica e novas moléculas de água adsorvem na superfície e oxidam, transferindo mais um elétron; (3) as hidroxilas formadas na segunda etapa também rotacionam e formam óxidos de ouro que resultam na transferência de dois elétrons, conforme a seguir⁸¹:



O voltamograma apresenta três picos de oxidação, relativos a cada etapa do processo, conforme mostrado na **Figura 5.2** obtida no último ciclo de limpeza do eletrodo de barra. Após completar a última etapa e o sentido do potencial ser invertido, a camada de ouro superficial sofre rapidamente rotação, de forma que os átomos de oxigênio anteriormente inseridos na estrutura do metal são expostos e ocorre a redução do óxido de ouro, gerando um único pico bastante intenso.

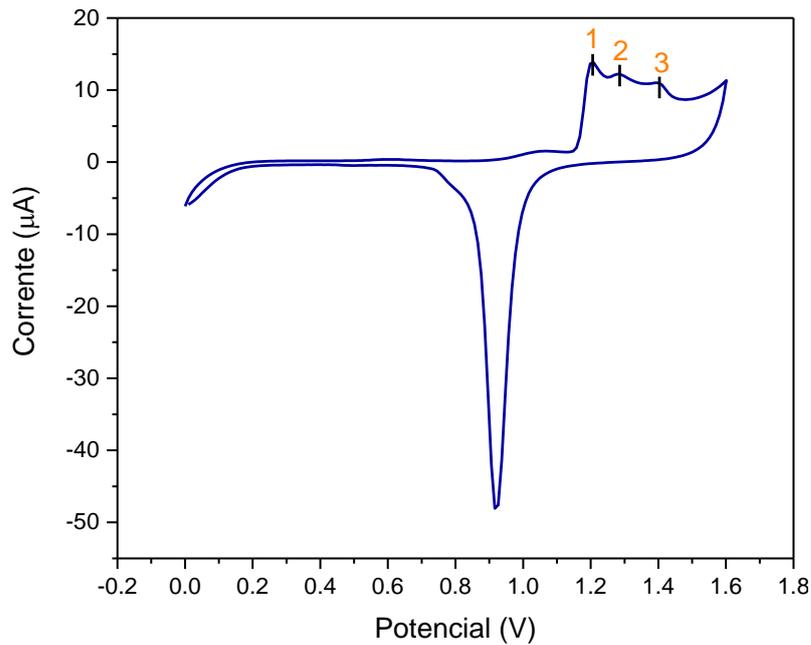


Figura 5.2 – Voltamograma do último ciclo de limpeza do eletrodo de barra utilizado para o cálculo da área eletroativa: presença de três picos de oxidação relativos as etapas da formação da monocamada de óxido de ouro e um pico de redução.

Fonte: Elaborada pela autora

Para o processo descrito, infere-se que a carga necessária para reduzir a monocamada de óxido de ouro (Q_R) é proporcional a área eletroativa do eletrodo (A_{ele}), descrita pela seguinte equação:

$$A_{ele} = \frac{Q_R}{e \cdot d_{as}}$$

onde e é a carga elementar e d_{as} corresponde a densidade atômica superficial do ouro. A partir do estudo realizado por Trasatti e Petrii, em que foi calculado o número médio de átomos de ouro por área da superfície, sugere-se para o ouro policristalino o fator $e \cdot d_{as}$ no valor de $390 \mu C/cm^2$. No entanto, é preciso descontar a carga que pode se acumular na dupla camada elétrica (Q_{dc}), de forma que a equação fique:

$$A_{ele} = \frac{Q_R - Q_{dc}}{390 \mu C/cm^2}$$

A partir do voltamograma obtém-se o valor de Q_R pela integração do pico de redução e de Q_{dc} pela área do gráfico menos as áreas dos picos de oxidação e redução. Para os eletrodos de barra utilizados nesse trabalho, o valor médio de $Q_R - Q_{dc}$ calculado foi de $20,5 \pm$

1,9 μC , resultando em uma área eletroativa média de $5,2 \pm 0,4 \text{ mm}^2$ que é maior 1,65 vezes do que a área geométrica deles de $3,14 \text{ mm}^2$.

5.1.2 Estudo do uso de intercalantes na eficiência de hibridização

Para avaliar a influência dos intercalantes na organização da monocamada auto-montada (SAM), eletrodos modificados previamente com 1 $\mu\text{mol/L}$ de CP (sequências da espécie *M. incognita*, imobilização por 15 h) foram colocados em soluções contendo 1 mmol/L de MCE ou de MCH, intercalantes com 2 e 6 carbonos, respectivamente. A incubação ocorreu durante 1h a 25°C , em atmosfera úmida. Após essa etapa, os eletrodos foram caracterizados por CV e EIS.

Os resultados apresentados na **Figura 5.3** mostram o comportamento distinto do MCE e do MCH na organização das SAMs. A incubação do eletrodo na solução de MCE causou decréscimo no R_{ct} , como mostrado na **Figura 5.3A**, enquanto que o eletrodo colocado na solução de MCH apresentou um aumento de R_{ct} , **Figura 5.3B**. Para interpretação dos resultados, é necessário considerar dois efeitos causados pela adição de moléculas intercalantes: o bloqueio da superfície conferido por elas e o alinhamento das sequências de CP. As cargas negativas dos grupos fosfatos presentes nas sequências de captura são atraídas eletrostaticamente pelas cargas positivas do eletrodo polarizado, fazendo com que as sequências se organizem paralelamente ao eletrodo, bloqueando a sua superfície. Quando as sequências são alinhadas, a superfície do eletrodo fica mais disponível e, assim, a transferência de cargas é facilitada. No entanto, quando o alinhamento é feito com a adição de moléculas intercalantes, a superfície do eletrodo que estava disponível é ocupada por essas moléculas, causando novamente o bloqueio da superfície. Uma vez que a sequência de MCH é maior do que a sequência de MCE, espera-se que o R_{ct} seja maior para o MCH. Então, a soma dos dois efeitos produziria aumento no R_{ct} para ambas moléculas intercalantes, porém o aumento seria maior para o MCH.

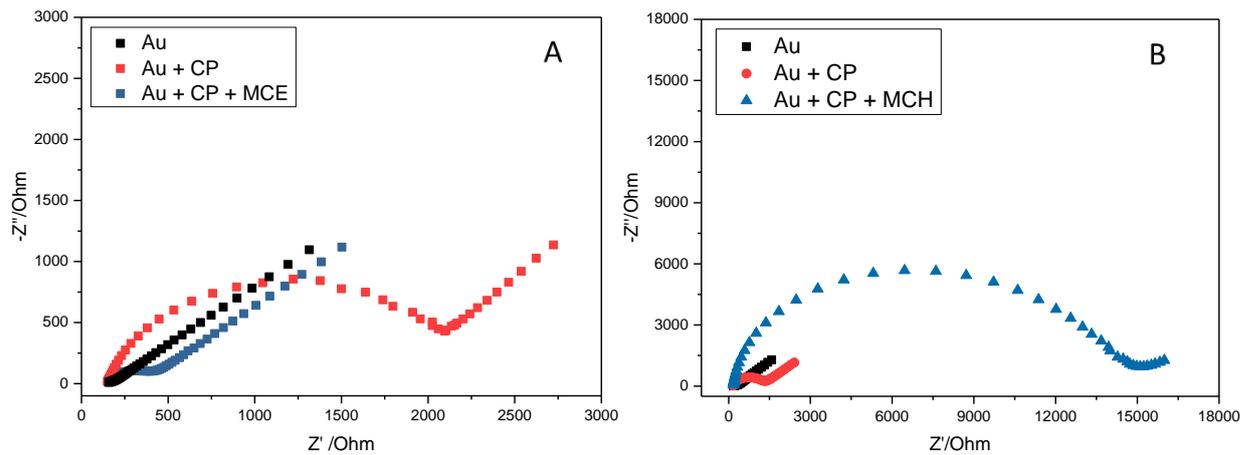


Figura 5.3 - Diagramas de Nyquist representando as etapas de construção da camada de biorreconhecimento com o uso de MCE (A) e de MCH (B) como moléculas intercalantes. As curvas azuis mostram o comportamento distinto delas: após a modificação com MCH ocorre o aumento do R_{CT} e para o MCE, a diminuição.

Fonte: Elaborada pela autora.

O comportamento exibido pelo eletrodo incubado em MCE indica que para essa concentração e tempo as moléculas de MCE passam a remover as sequências de CP imobilizadas. Isso ocorre porque a ligação Au-MCE é mais favorável energeticamente do que a ligação Au-CP. Para os experimentos subsequentes em eletrodo de barra, optou-se por usar o MCH como molécula intercalante.

5.1.3 Otimização do tempo de imobilização

Como parte da otimização da construção do biossensor, analisou-se o tempo de imobilização de sequências de captura da espécie *M. incognita* na concentração de $0,5 \mu\text{mol/L}$. A modificação dos eletrodos foi monitorada em um intervalo de 1 a 15 h e a resistência à transferência de cargas foi medida antes ($R_{CT \text{ LIMPO}}$) e após a incubação ($R_{CT \text{ IMOB}}$). Essa etapa permite que se determine qual o tempo apropriado para a modificação dos eletrodos com as sequências tioladas. A **Figura 5.4** apresenta o gráfico da variação do R_{CT} ($R_{CT \text{ IMOB}} - R_{CT \text{ LIMPO}}$) em função do tempo de incubação.

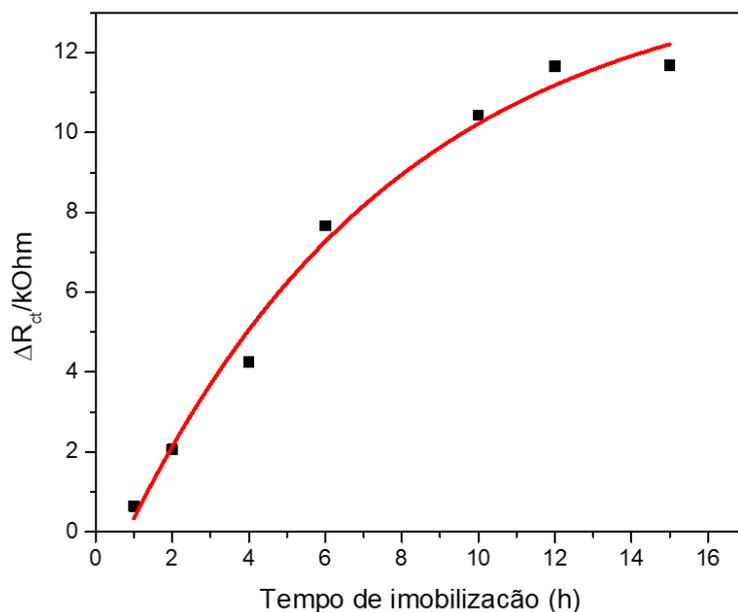


Figura 5.4 - Estudo sobre o efeito do tempo de imobilização de sequências de captura a 0,5 $\mu\text{mol/L}$ na variação do R_{CT} , onde $\Delta R_{CT} = R_{CT \text{ IMOB}} - R_{CT \text{ LIMPO}}$. Observa-se um aumento do ΔR_{CT} até 12 h de incubação. Entre 12 e 15 h não houve variação, indicando que houve a saturação do eletrodo.

Fonte: Elaborada pela autora

Observa-se um aumento gradual do ΔR_{CT} até 12 h, mostrando que nessa faixa quanto maior o tempo de incubação, maior é a quantidade de sequências de captura imobilizadas. No entanto, não houve variação no ΔR_{CT} para medidas realizadas após esse período. Podemos inferir que ocorre a saturação do eletrodo e que a imobilização em tempos maiores não resulta em acréscimo de ligação de oligonucleotídeos. Esses resultados sugerem que o tempo de incubação de 12 h é o mais indicado para a imobilização de CP nos eletrodos estudados.

5.1.4 Estudo de seletividade

Uma vez construída a camada de biorreconhecimento, realizou-se a etapa de hibridização e os testes de detecção. Nessas etapas é importante avaliar a seletividade do biossensor. O sinal elétrico resultante do reconhecimento da sequência alvo (TP) deve ser diferente daquele proveniente de sequências de DNA não complementares (NC), para evitar resultados errôneos como falso positivo e falso negativo. Foram usadas como TP as sequências de *M. incognita*, complementares às sequências de captura imobilizadas, e como NC, sequências da espécie *M. javanica*. Nesse ponto, vale ressaltar que os oligonucleotídeos TP e NC são parte da sequência genômica de nematoides do mesmo gênero, portanto, bastante similares. Para a detecção, as sequências na concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$ foram

aquecidas a 95°C por 5 min e, em seguida, resfriadas em banho de gelo por mais 5 min. Esse procedimento é realizado com o propósito de desnaturar o DNA, ligações de hidrogênio intramoleculares entre pares de bases são rompidas, e favorecer a hibridização com a sequência complementar. Eletrodos modificados foram imersos nas soluções contendo TP ou NC e deixados em incubação por 1 h a 25°C. A **Figura 5.5** apresenta a caracterização das etapas de construção do biossensor e a detecção comparativa com TP (**Figura 5.5A**) e com NC (**Figura 5.5B**).

Os resultados mostraram que o biossensor foi capaz de reconhecer a sequência alvo, produzindo alteração significativa na resistência a transferência de cargas. Observa-se na análise comparativa que para o eletrodo imerso em TP, ocorre o aumento do R_{CT} , enquanto para a solução de NC na mesma concentração, há a diminuição desse parâmetro. Esse resultado aponta o biossensor como seletivo, uma vez que seu comportamento foi distinto entre as sequências.

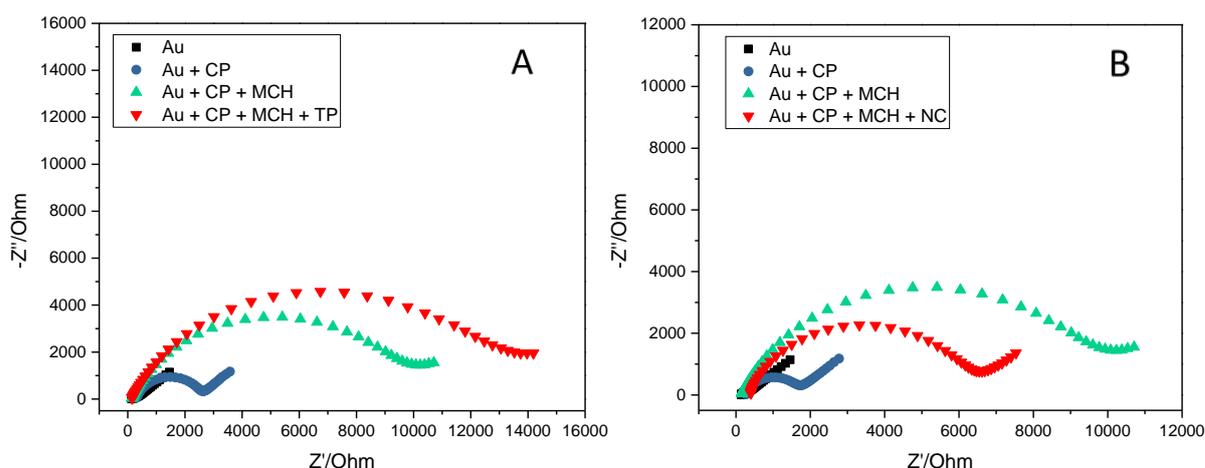


Figura 5.5 – Diagramas de Nyquist para análise de seletividade do biossensor em eletrodo de barra: etapa de detecção em (A) com sequências da espécie *M. incognita* (TP) e em (B) com sequências da *M. javanica* (NC) na concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$.

Fonte: Elaborada pela autora

Haja vista que os eletrodos apresentam áreas eletroativas ligeiramente diferentes e que a formação da SAM não ocorre de maneira idêntica, a análise quantitativa que considera a variação percentual do R_{CT} é mais representativa. Para os resultados apresentados na **Figura 5.5**, o ΔR_{CT} em porcentagem para a etapa de detecção foi calculado pela diferença entre o R_{CT} após e antes a hibridização, subtraído pelo valor de antes, como mostrado na equação a seguir:

$$\frac{R_{CT} \text{ APÓS HIB} - R_{CT} \text{ ANTES HIB}}{R_{CT} \text{ ANTES HIB}} \times 100 \quad (5)$$

A hibridização com as sequências complementares (TP) produziu um acréscimo de 27% no R_{CT} , devido ao aumento na superfície do eletrodo de sequências carregadas negativamente. Para o eletrodo incubado em solução contendo NC, observou-se uma diminuição de cerca de 44%, conforme mostrado na **Figura 5.6**.

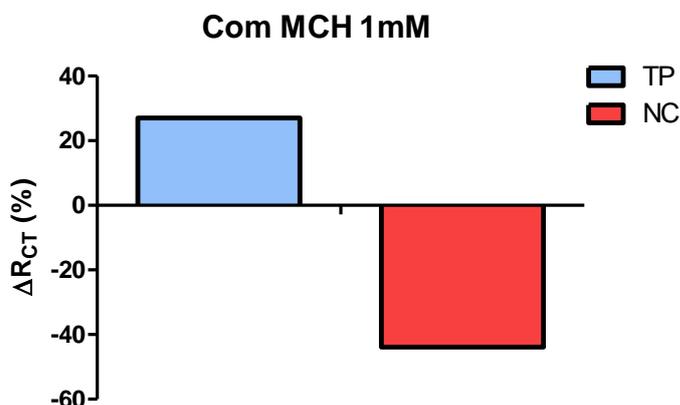


Figura 5.6 - Gráfico de barras representando a porcentagem de variação do R_{CT} após a incubação com as sequências de TP (em azul) e NC (em vermelho).

Fonte: Elaborada pela autora

Os testes iniciais realizados em eletrodo de barra validam a metodologia usada para a construção da monocamada automontada em superfície de ouro e de sua capacidade de reconhecer de maneira seletiva a sequência alvo.

5.2 Genossensor eletroquímico em eletrodos descartáveis multiplex

5.2.1 Caracterização morfológica dos eletrodos

A rugosidade dos eletrodos é um parâmetro muito importante para a construção da camada de biorreconhecimento pelo método de monocamadas auto-organizadas (do inglês, *self-assembled monolayers* – SAM). Estudos mostram que o aumento da rugosidade do substrato gera defeitos na SAM que, por sua vez, alteram a maneira como ocorre a transferência de cargas⁸². Através de imagens de AFM topográficas em 10 μm x 10 μm , determinamos a rugosidade por área (R_a) e a rugosidade quadrática média (R_q) de eletrodos multiplex em substratos de vidro e de PET, comparando os valores obtidos antes e após a limpeza eletroquímica. O perfil topográfico em 2D e 3D do eletrodo em substrato de vidro

antes da limpeza é apresentado nas **Figuras 5.7A e 5.7B**, respectivamente. Observa-se regiões uniformes e alguns picos, com altura máxima de 82 nm. A rugosidade calculada para essas imagens foi de 1,4 nm para R_a e de 2,38 nm para R_q . As imagens tomadas em $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$ mostram que a camada de ouro depositada é composta por pequenas nanopartículas que formam um filme bastante uniforme, com altura máxima de 23 nm, conforme as **Figuras 5.7C em 2D e 5.7D em 3D**.

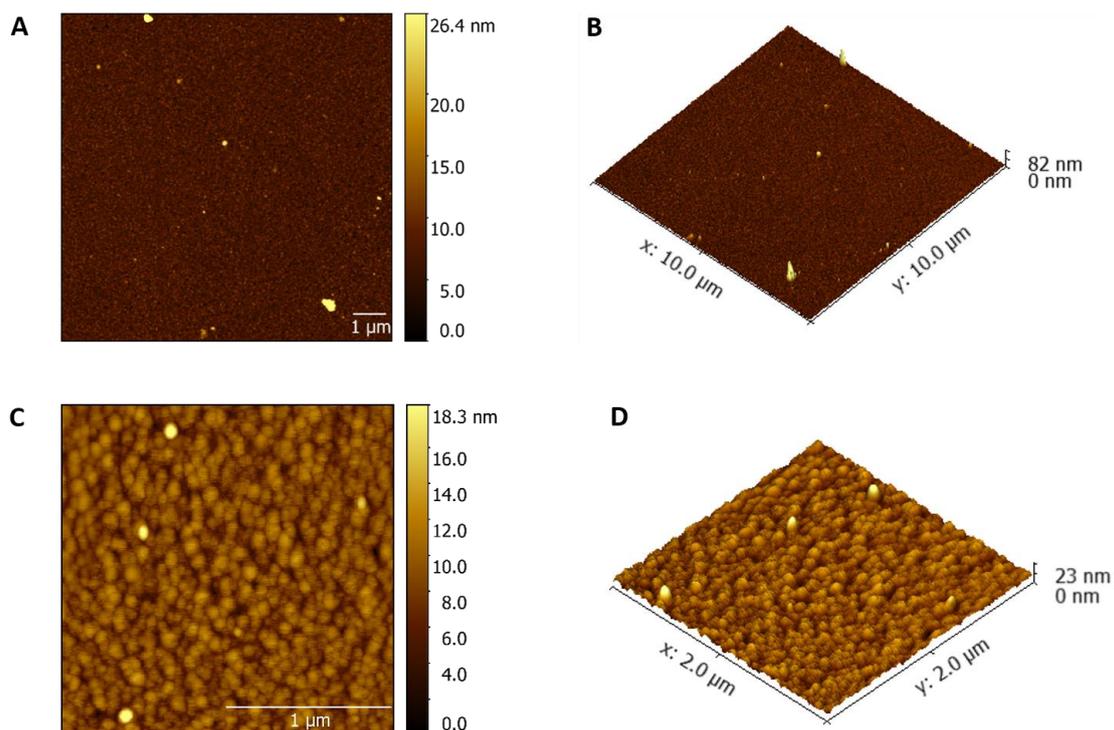


Figura 5.7 – Perfil topográfico obtido por AFM de eletrodo multiplex em substrato de vidro antes da limpeza: imagens $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ em 2D (**A**) e 3D (**B**) apresentam rugosidade por área (R_a) de 1,4 nm e rugosidade quadrática média (R_q) de 2,38 nm. Nas imagens tomadas em $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$ para 2D (**C**) e 3D (**D**) observa-se que o filme de ouro depositado é formado por pequenas nanopartículas de ouro, apresentando altura máxima de 23 nm.

Fonte: Elaborada pela autora

Após a limpeza eletroquímica, os eletrodos foram novamente caracterizados por AFM. As imagens em 2D e 3D para $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ nas **Figuras 5.8A e 5.8B**, respectivamente, apresentaram diminuição de 3 nm no pico máximo, comparado ao valor obtido antes da limpeza. Também houve diminuição de cerca de 24% na rugosidade por área, com valor de 1,07 nm, e de 17% na rugosidade quadrática média, com valor de 1,98 nm. As imagens tomadas em uma área menor, de $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$, possuem altura máxima em 11,1 nm, 11,9 nm menor que a imagem obtida antes da limpeza, conforme **Figura 5.8C em 2D e Figura 5.8D em 3D**. Esses resultados indicam que a limpeza eletroquímica é muito importante para o polimento do eletrodo, deixando-o menos rugoso e removendo possíveis contaminantes. As

imagens de AFM mostram, ainda, o recobrimento completo do substrato pela deposição do ouro, comprovando a eficiência da metodologia adotada para a fabricação dos eletrodos.

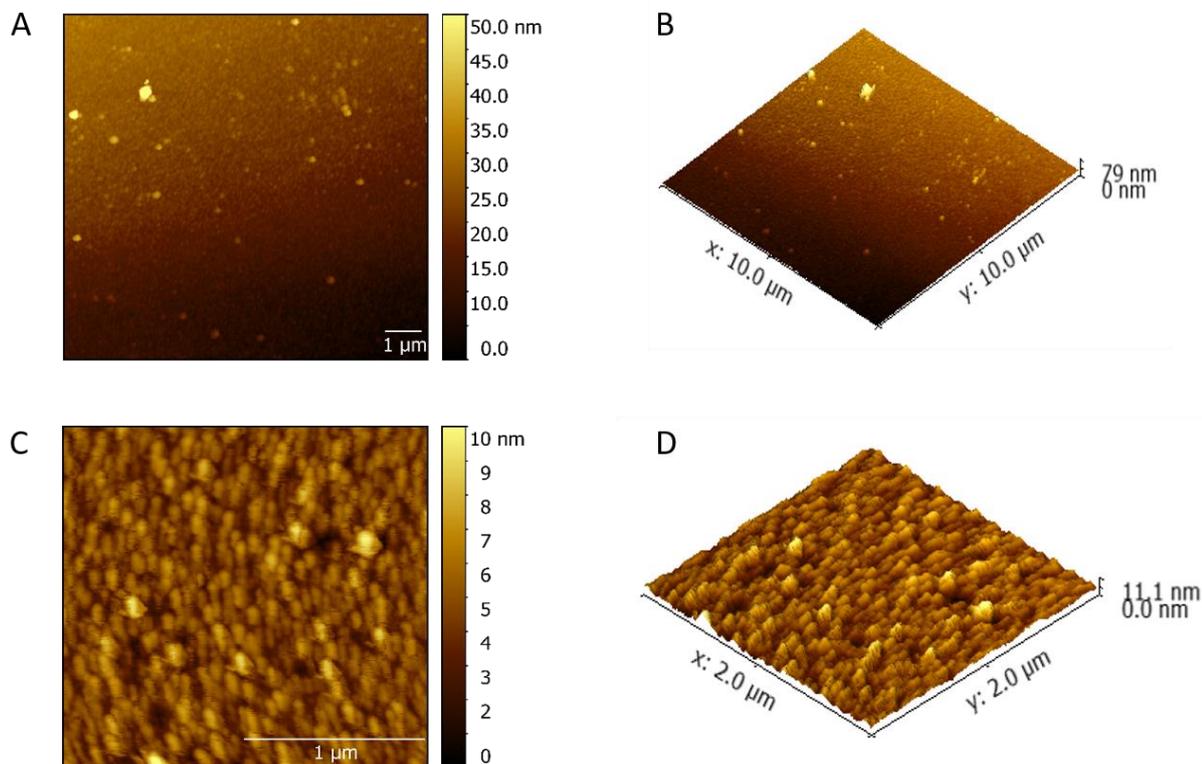


Figura 5.8 - Caracterização por AFM de eletrodo multiplex em substrato de vidro após a limpeza: imagens de $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ em 2D (**A**) e 3D (**B**) mostram uma diminuição na rugosidade após a limpeza eletroquímica, $R_a = 1,07\ \text{nm}$ e $R_q = 1,98\ \text{nm}$. Observa-se nas imagens com dimensão $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$ em 2D (**C**) e 3D (**D**) que a altura máxima do filme é de $11,1\ \text{nm}$, indicando uma ótima uniformidade na deposição do ouro.

Fonte: Elaborada pela autora

Nos eletrodos multiplex metalizados em substrato de PET, a caracterização topográfica por AFM mostrou um perfil mais rugoso. A imagem em 3D com dimensão $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ tomada antes da limpeza (**Figura 5.9A**) apresentou $R_a = 4,16\ \text{nm}$ e $R_q = 5,99\ \text{nm}$, valores quase 3 vezes maiores do que os exibidos pelos eletrodos em vidro, e altura máxima em $170\ \text{nm}$. A **Figura 5.9B** mostra a topografia para uma área menor ($4\ \mu\text{m}^2$), em que o pico máximo ocorre em $27\ \text{nm}$. No entanto, de maneira oposta ao encontrado para o substrato em vidro, após a limpeza eletroquímica houve o aumento da rugosidade do filme metálico, com $R_a = 5,3\ \text{nm}$ e $R_q = 8,18\ \text{nm}$. Apesar disso, as **Figuras 5.9C** e **5.9D** mostram que a altura máxima para as duas áreas consideradas, $10\ \mu\text{m}^2$ e $4\ \mu\text{m}^2$, diminuiu em relação aos valores encontrados anteriormente.

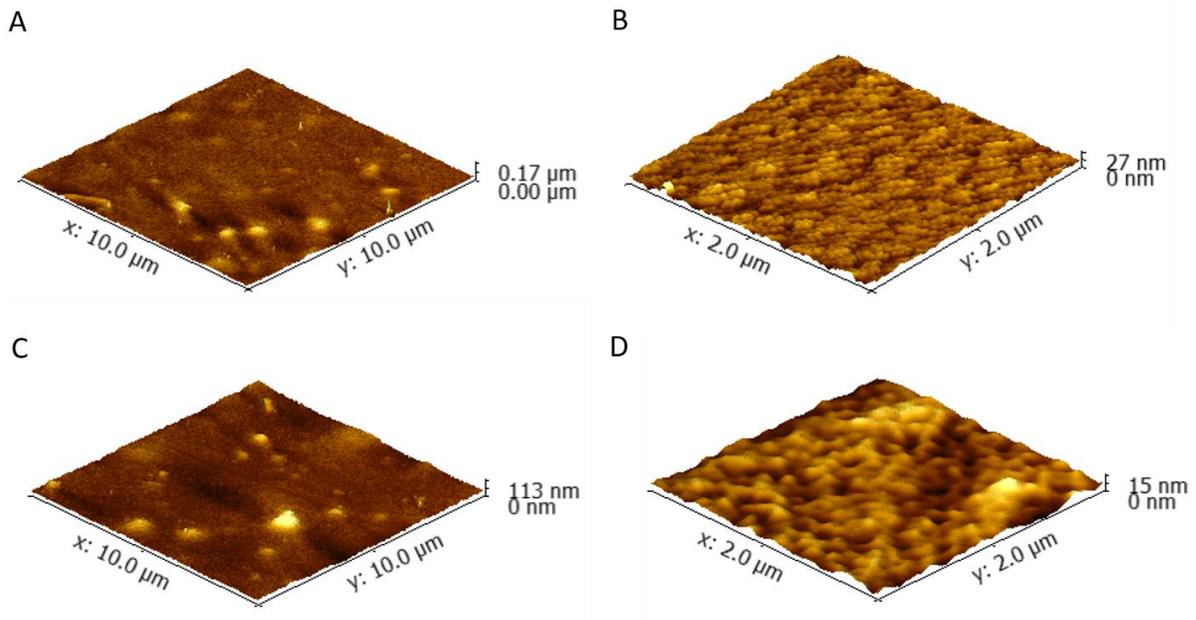


Figura 5.9 - Caracterização por AFM de eletrodo multiplex em substrato de PET: imagens de $10 \mu\text{m}^2$ antes (A) e depois da limpeza (C) mostram uma superfície com rugosidade superior aos eletrodos em vidro. Nas microscopias tomadas em $4 \mu\text{m}^2$ antes (B) e após a limpeza (D), observa-se a diminuição da altura máxima do filme. No entanto, em (D) observa-se um filme menos uniforme, com a formação de vales.

Fonte: Elaborada pela autora

A **Tabela 5.1** exibe os valores de rugosidade encontrados para os substratos de vidro e PET.

Tabela 5.1 – Valores de rugosidade por área (R_a) e rugosidade quadrática média (R_q) para os eletrodos estudados

	R_a (nm)	R_q (nm)
Eletrodo em vidro antes da limpeza	1,4	2,38
Eletrodo em vidro após a limpeza	1,07	1,98
Eletrodo em PET antes da limpeza	4,16	5,99
Eletrodo em PET após a limpeza	5,3	8,18

Fonte: Elaborada pela autora

Esses resultados indicam que durante a limpeza eletroquímica de eletrodos metalizados em superfícies bastante rugosas, como o PET, apesar de ocorrer o polimento das regiões mais altas, que resultam na diminuição da altura do maior pico, há uma corrosão acentuada nas regiões mais baixas, formando vales, de maneira que a rugosidade do eletrodo aumenta. Esse perfil topográfico pode gerar defeitos na formação da camada de

biorreconhecimento por SAM, que alteram a maneira como ocorre a transferência de cargas, resultando na diminuição de reprodutibilidade entre eletrodos.

Para avaliar se durante o processo de fabricação ocorre a contaminação dos eletrodos por outros compósitos, realizou-se a análise de contraste de fase pela técnica de microscopia de força atômica em eletrodos antes de serem submetidos à limpeza. A **Figura 5.10** mostra que o filme em substrato de PET é formado apenas por um único elemento e que, portanto, não há deposição de outros materiais nos eletrodos.

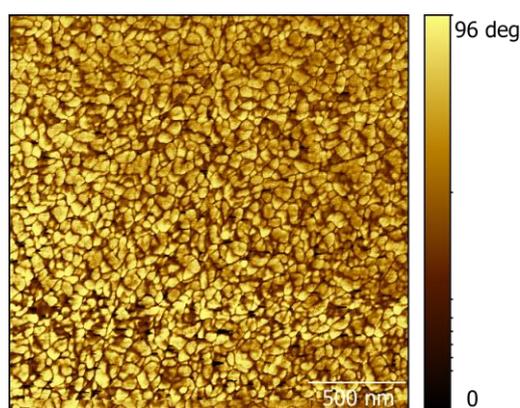


Figura 5.10 – Imagem de contraste de fase 2 μm x 2 μm de eletrodo multiplex em substrato de PET antes da limpeza. A caracterização por AFM revela a presença de um único elemento na superfície.

Fonte: Elaborada pela autora

Conclui-se, a partir da caracterização morfológica, que a metodologia adotada para a fabricação de eletrodos, produz filmes que recobrem completamente os substratos sem que haja a contaminação por outros materiais. Eletrodos em substratos de vidro apresentam menor rugosidade do que aqueles metalizados sobre PET e, portanto, são mais indicados para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos. A limpeza eletroquímica em eletrodos de vidro resulta em uma superfície menos rugosa e mais uniforme e será adotada para os procedimentos subsequentes.

5.2.2 Caracterização da composição química dos eletrodos

Para a construção de genossensores que empregam sequências de captura tioladas como elementos de biorreconhecimento, é muito importante que a superfície do eletrodo apresente uma grande quantidade de átomos de ouro metálico (Au^0) a fim de favorecer a ligação tiol-ouro responsável pela imobilização desses oligonucleotídeos. A análise da composição química dos eletrodos multiplex tanto em substrato de vidro quanto em substrato

de PET foi realizada pela técnica de Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS). Para cada eletrodo foram coletados espectros antes e após a limpeza eletroquímica, uma vez que esse procedimento promove a oxirredução do ouro. Nos eletrodos sob vidro, o espectro na região Au4f antes da limpeza revelou dois picos separados por 3,7 eV, em 86,45 e 82,75 eV, que correspondem aos componentes spin-órbita 5/2 e 7/2, respectivamente. A razão da intensidade entre os picos foi de aproximadamente 1.2, próximo aos valores descritos na literatura.⁸³ Após a limpeza eletroquímica, a contagem de elétrons aumentou quase 3 vezes (ver **Figura 5.11A**), indicando que esse processo aumenta a disponibilidade de átomos de ouro na superfície do eletrodo. O espectro apresenta dois picos, em 86,75 e 83,05 eV, ligeiramente deslocados para energias mais baixas em relação aos valores encontrados antes da limpeza. Embora a literatura reporte o ouro metálico com energias de ligação entre 83,9 e 84,4 eV para Au 4f_{7/2} e 87,6 a 88,1 eV para Au 4f_{5/2}, muitos estudos mostram uma diminuição de 0,2 a 1,2 eV para o ouro em substrato de titânio. Esse comportamento pode ocorrer devido a defeitos de vacância na estrutura cristalina da camada de dióxido de titânio (TiO₂), que geram sítios com densidade eletrônica em excesso. Quando o ouro é depositado sob essa camada, ocorre a transferência de elétrons para os átomos de ouro.⁸⁴ Assim, a superfície do eletrodo multiplex em substrato de vidro é composta por ouro metálico (Au⁰) tanto antes quanto após o procedimento de limpeza.

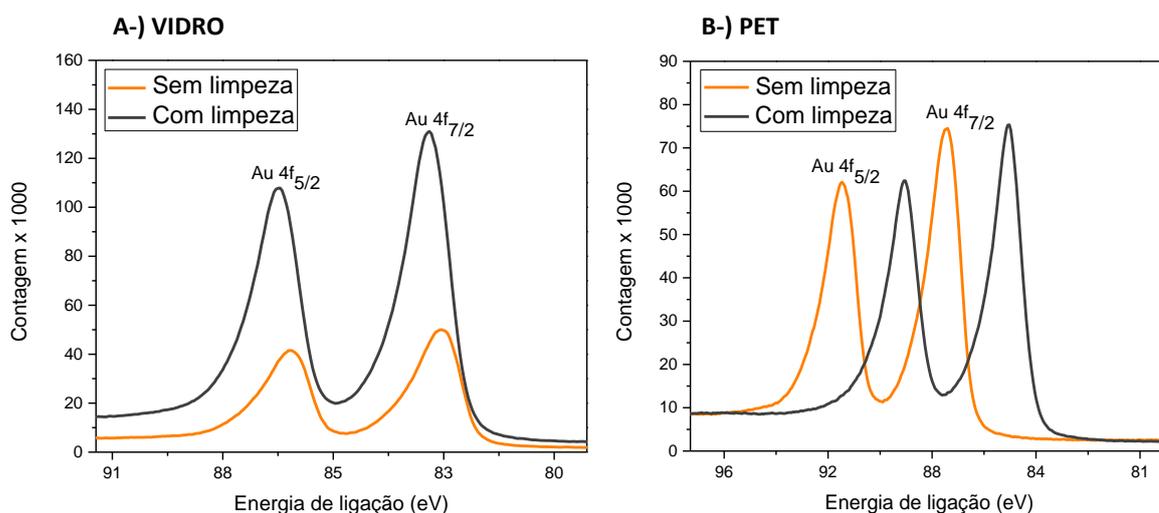


Figura 5.11 – Espectros de XPS na região Au4f antes e após limpeza eletroquímica para eletrodos em vidro (A) e em PET (B).

Fonte: Elaborada pela autora

Por outro lado, eletrodos fabricados sobre PET não apresentaram diminuição na energia de ligação, **Figura 5.11B**. O espectro de XPS coletado para o eletrodo sem limpeza

revelou dois picos, em 87,6 e 91,3 eV, que se referem aos componentes 7/2 e 5/2, respectivamente. Esses valores indicam que a superfície do eletrodo é composta por átomos de ouro no estado de oxidação 3+ (Au^{3+}). Após a limpeza, houve um deslocamento dos picos para energias mais baixas, de 85,4 e 89,1 eV, revelando que a voltametria cíclica em ácido sulfúrico reduziu os átomos de ouro Au^{3+} para o estado de oxidação Au^{1+} . Apesar disso, não se observou aumento na intensidade de elétrons, ou seja, a limpeza não gerou uma disponibilidade maior de átomos de ouro. A **Tabela 5.2** apresenta os valores de energia de ligação encontrados para os sistemas estudados.

Tabela 5.2 – Valores da energia de ligação encontrados para Au 4f_{7/2} e Au 4f_{5/2} em eletrodos multiplex

	Eletrodo em vidro (sem limpeza)	Eletrodo em vidro (com limpeza)	Eletrodo em PET (sem limpeza)	Eletrodo em PET (com limpeza)
Au 4f _{7/2}	82,75	83,05	87,6	85,4
Au 4f _{5/2}	86,45	86,75	91,3	89,1

Fonte: Elaborada pela autora

A partir da caracterização por XPS, é possível concluir que o procedimento realizado para a limpeza do eletrodo tem um papel fundamental para a sua composição química. Eletrodos em vidro limpos são compostos por ouro metálico, que favorece a ligação com os grupos tióis, e apresentam uma quantidade muito superior de átomos em relação aos eletrodos em PET. Portanto, a análise química dos eletrodos corrobora os resultados de AFM que apontam que o substrato de vidro possui características mais indicadas para a aplicação desejada.

5.2.3 Cálculo da área eletroativa

Assim como discutido na seção 5.1.1, a área eletroativa dos eletrodos multiplex nos dois substratos foi calculada através do método de adsorção de oxigênio para o último voltamograma obtido durante a limpeza eletroquímica em solução de H_2SO_4 0,5 mol/L. Os voltamogramas típicos dos eletrodos em vidro (AuVIDRO) e em PET (AuPET) são apresentados nas **Figuras 5.12A** e **5.12B**, respectivamente, e mostram os três picos de oxidação do ouro e um pico de redução em torno de 0,3 V. É importante notar que há pouco

acúmulo de cargas na dupla camada capacitiva nos dois voltamogramas, característica que indica que o eletrodo foi efetivamente limpo.

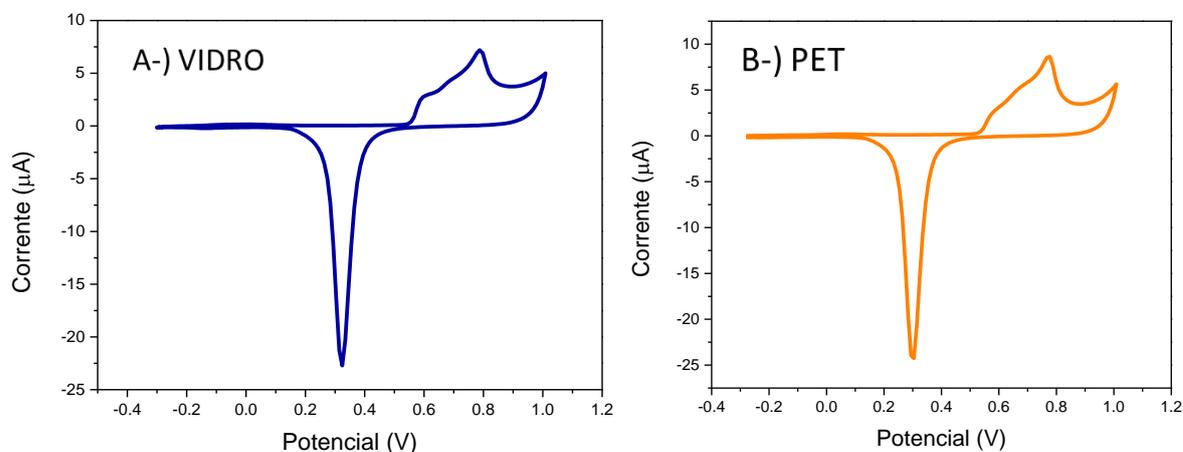


Figura 5.12 - Voltamogramas de eletrodos em substrato de vidro (A) e em substrato de PET (B) tomados no último ciclo de limpeza eletroquímica para cálculo da área eletroativa.

Fonte: Elaborada pela autora

A área eletroativa foi calculada para 3 eletrodos distintos em cada substrato para analisar a variação entre elas. Para o eletrodo em vidro, o fator $Q_R - Q_{DC}$ foi igual a $17 \pm 0,2 \mu\text{C}$, totalizando uma área eletroativa de $4,40 \pm 0,05 \text{ mm}^2$. Como esperado, a área eletroativa é maior por um fator de 1,4 que a sua área geométrica equivalente a $3,14 \text{ mm}^2$. No eletrodo fabricado em PET, o fator $Q_R - Q_{DC}$ encontrado foi de $18,3 \pm 0,5 \mu\text{C}$ que resulta em uma área eletroativa de $4,70 \pm 0,13 \text{ mm}^2$, maior que sua área geométrica por um fator de 1,5. De forma comparativa, o PET apresenta uma área eletroativa superior a determinada para o vidro (Tabela 5.3), corroborando os resultados morfológicos que apontaram uma maior rugosidade de eletrodos fabricados em substrato de PET.

Tabela 5.3 – Valores calculados da área eletroativa para eletrodos em diferentes substratos (n=3).

	Eletrodo em PET	Eletrodo em vidro
Área eletroativa	$4,40 \pm 0,05 \text{ mm}^2$	$4,70 \pm 0,13 \text{ mm}^2$

Fonte: Elabora pela autora

5.2.4 Caracterização eletroquímica

Eletrodos multiplex AuPET e AuVIDRO limpos foram submetidos à caracterização eletroquímica pela técnica de voltametria cíclica. Nos voltamogramas, observa-se um perfil

diferente para os dois tipos de substratos; eletrodos AuVIDRO apresentam correntes catódicas (I_{pc}) e anódicas (I_{pa}) menores do que as correspondentes em eletrodos AuPET. De maneira inversa, a diferença entre os potenciais anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}) é maior para eletrodos do tipo AuVIDRO, como mostrado na **Figura 5.13**. Esse resultado é coerente com as caracterizações discutidas anteriormente, uma vez que eletrodos com maior área eletroativa são mais condutores e, conseqüentemente, exibem uma maior corrente elétrica. Segundo a teoria estabelecida por Nicholson e Shain⁸⁵, esses parâmetros permitem determinar o grau de reversibilidade de sistemas eletroquímicos. Eletrodos planos estacionários são considerados reversíveis quando o módulo da diferença entre os potenciais catódico e anódico ($\Delta E_p = |E_{pa} - E_{pc}|$) é igual a 59 mV e o módulo da razão entre as correntes $|I_{pa}/I_{pc}|$ é igual a 1. Sistemas que apresentam picos de oxidação e redução com valores que não correspondem aos determinados para sistemas reversíveis, são considerados sistemas quase-reversíveis.

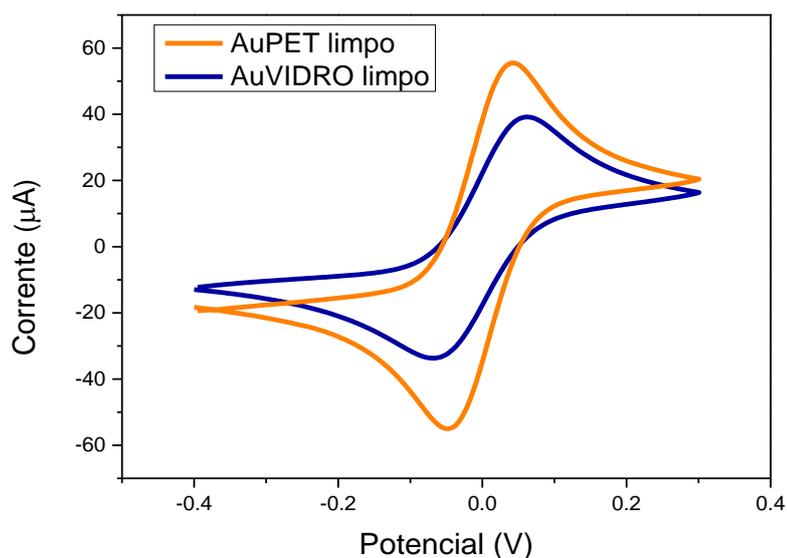


Figura 5.13 – Caracterização por voltametria cíclica de eletrodos em substratos de PET (AuPET) e vidro (AuVIDRO) após a limpeza eletroquímica.

Fonte: Elaborada pela autora

Para os eletrodos AuVIDRO, os valores médios calculados em três unidades sensoriais distintas ($n=3$) foram $\Delta E_p = 133,67 \pm 7,23$ mV e $|I_{pa}/I_{pc}| = 1,15 \pm 0,01$. Em eletrodos AuPET, os resultados foram $\Delta E_p = 87,5 \pm 0,7$ mV e $|I_{pa}/I_{pc}| = 1,03 \pm 0,03$, como indicado na **Tabela 5.4**. Esses resultados apontam que eletrodos em PET apresentam maior reversibilidade. Esse comportamento pode ser atribuído também à composição química distinta dos dois tipos de eletrodos estudados. Como discutido anteriormente, eletrodos AuVIDRO são formados por

átomos de ouro metálico (Au^0) enquanto eletrodos AuPET são por átomos de ouro oxidado (Au^{1+}).

Tabela 5.4 – Parâmetros para determinação de reversibilidade de eletrodos AuPET e AuVIDRO

	$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} $	$ I_{pa}/I_{pc} $
Eletrodos AuPET	$87,5 \pm 0,7$ mV	$1,03 \pm 0,03$
Eletrodos AuVIDRO	$133,67 \pm 7,23$ mV	$1,15 \pm 0,01$

Fonte: Elaborada pela autora

Em etapa posterior, os eletrodos foram caracterizados por espectroscopia de impedância eletroquímica e os resultados são mostrados de forma comparativa na **Figura 5.14**. Observa-se que a resistência a transferência de cargas é muito maior para AuVIDRO, em concordância com os voltamogramas. Os valores médios encontrados ($n=3$) foram $R_{CT} = 745 \pm 10 \Omega$ para AuVIDRO e $R_{CT} = 122 \pm 2,8 \Omega$ para AuPET.

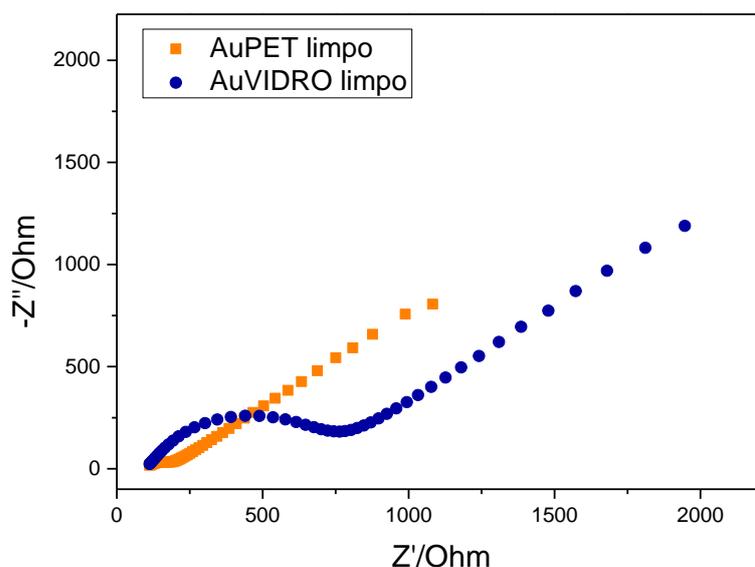


Figura 5.14 – Diagrama de Nyquist para eletrodos limpos AuPET (curva em laranja) e AuVIDRO (curva em azul).

Fonte: Elaborada pela autora

A caracterização por EIS também possibilitou determinar o circuito elétrico equivalente do sistema eletroquímico através do *software* NOVA. Segundo os espectros apresentados no diagrama de Nyquist, o dispositivo estudado corresponde a um circuito de Randles.

5.2.5 Imobilização de sequência de captura

As caracterizações realizadas nos eletrodos AuPET e AuVIDRO mostraram que apesar de terem sido fabricados pela mesma metodologia, as propriedades destes eletrodos são influenciadas pelas características do substrato. Para avaliar a eficiência de ligação de oligonucleotídeos tiolados, sequências de CP na concentração de $1 \mu\text{mol/L}$ foram imobilizadas em eletrodos AuPET e AuVIDRO por 2 h a 25°C , em atmosfera úmida. Para ambos, observou-se alterações significativas nos espectros de impedância (**Figuras 5.15A e 5.15C**) e voltamogramas (**Figuras 5.15B e 5.15D**) após a incubação com CP, indicando que as sequências foram capazes de se ligar aos eletrodos.

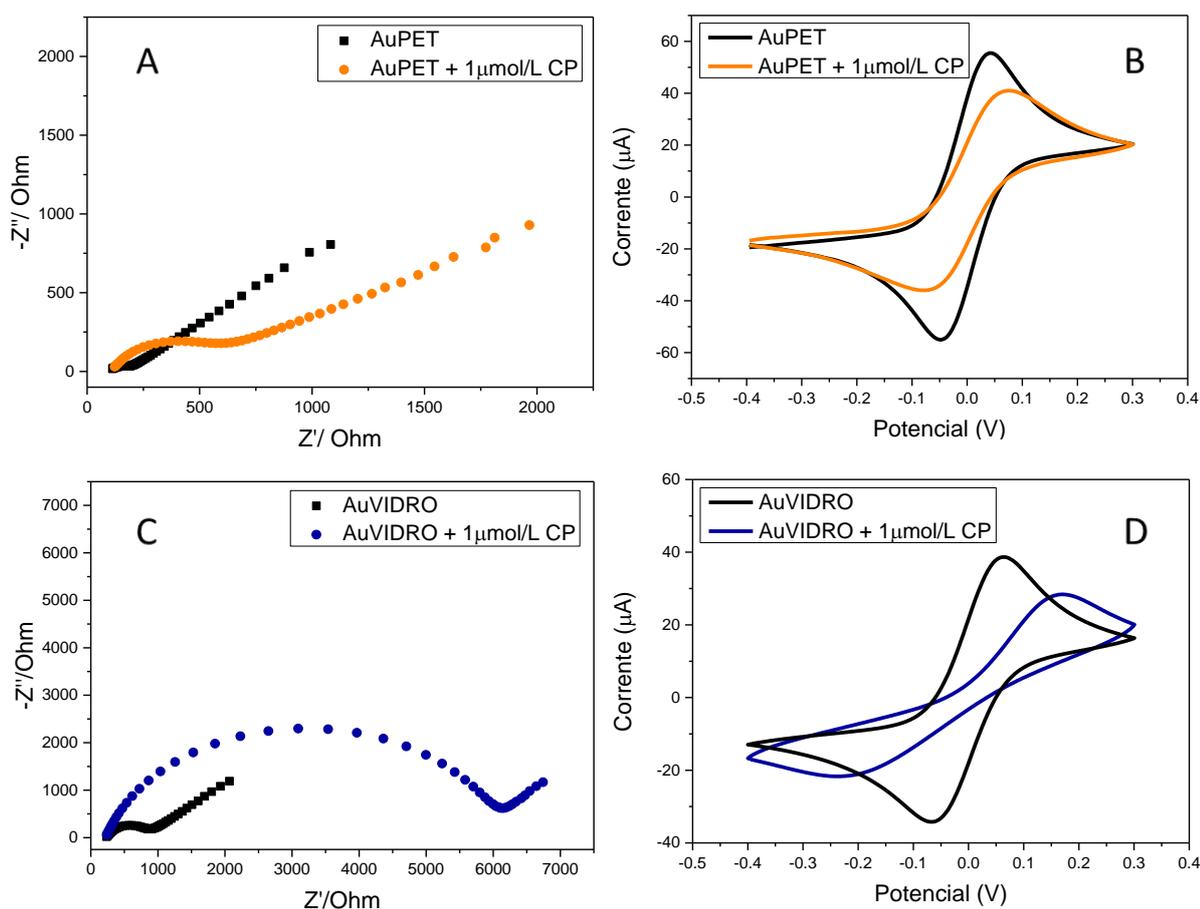


Figura 5.15 – Espectros de impedância e voltamogramas de eletrodos AuPET (A,B) e AuVIDRO (C,D) antes e após a incubação com sequências CP a $1 \mu\text{mol/L}$.

Fonte: Elaborada pela autora

Para avaliar em qual superfície houve maior imobilização, calculou-se a variação percentual da resistência à transferência de cargas entre os valores encontrados para os

eletrodos limpos ($R_{CT\ LIMPO}$) e após a incubação com CP ($R_{CT\ IMOB}$), $\Delta R_{CT} = (R_{CT\ IMOB} - R_{CT\ LIMPO})/R_{CT\ LIMPO}$. A análise quantitativa tomada em três eletrodos mostrou que houve uma maior imobilização em eletrodos AuVIDRO, com aumento médio de 758%, do que em eletrodos AuPET, cujo aumento médio foi de 479%. A **Figura 5.16** apresenta os resultados quantitativos da eficiência de imobilização.

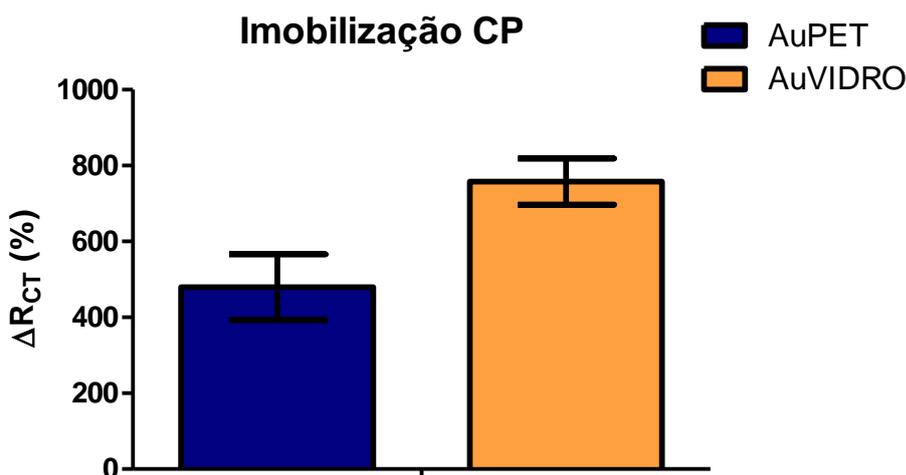


Figura 5.16 - Gráfico de barras para a variação percentual da resistência a transferência de cargas após a etapa de imobilização de seqüências CP a 1 $\mu\text{mol/L}$.

Fonte: Elaborada pela autora

Conclui-se que eletrodos fabricados em substrato de vidro apresentam características mais apropriadas para a formação de monocamadas automontadas com moléculas tioladas. Isso deve-se, principalmente, pela composição química do filme metálico, com átomos Au^0 que favorecem a ligação do tiol. Então, optamos por usar os eletrodos AuVIDRO no desenvolvimento do biossensor para detecção de nematoides.

5.2.6 Análise da rugosidade do eletrodo para cada etapa

Utilizando microscópio de força atômica, foram coletadas imagens de eletrodos multiplex em vidro para cada etapa da construção do biossensor para avaliar variações na rugosidade. Para isso, os eletrodos foram submetidos a limpeza eletroquímica em solução de ácido sulfúrico. Em seguida, os dispositivos foram incubados com CP da espécie *M. incognita* a 0,5 $\mu\text{mol/L}$ por 2 h. A etapa de alinhamento foi realizada por 30 min com solução de MCH a 1 mmol/L. Por fim, os eletrodos foram incubados com as seqüências alvo a 1 $\mu\text{mol/L}$ por 1 h.

As imagens 2D da topografia dos eletrodos tomadas em $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$ são apresentadas na **Figura 5.17** com os respectivos valores de rugosidade por área (R_a) calculados.

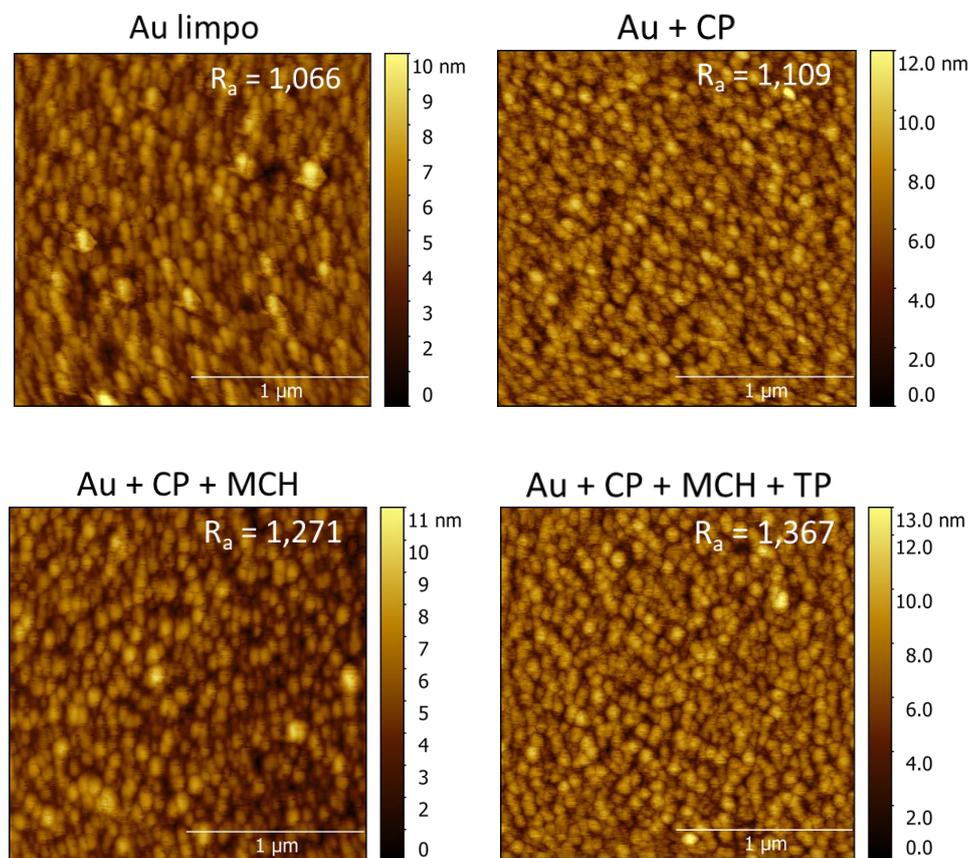


Figura 5.17 – Imagens de topografia obtidas por AFM e valores de rugosidade por área (R_a) para cada etapa da construção do biossensor.

Fonte: Elaborada pela autora

Identifica-se um aumento gradual da rugosidade do eletrodo com as modificações, indicando que as sequências de CP e as moléculas de MCH de fato se ligam ao ouro. Após a incubação com TP também houve alteração na rugosidade; infere-se que as sequências complementares hibridizaram. Da mesma maneira, foram coletadas imagens de contraste de fase em uma área de $100\ \mu\text{m}^2$ para cada etapa, conforme **Figura 5.18**. Após a incubação com CP, há um aumento de pequenos pontos claros, indicando que as biomoléculas recobrem parcialmente o eletrodo. Já para a etapa de alinhamento, observa-se o recobrimento quase total, que demonstra a capacidade do MCH de bloquear as regiões desocupadas da superfície metálica, condizente com o aumento da rugosidade. No entanto, com a adição de TP, ocorre uma diminuição das regiões recobertas; pode-se explicar esse comportamento pelo alinhamento das sequências de CP após a hibridização com o DNA alvo, liberando regiões

anteriormente bloqueadas. Para essa configuração, prevalece o aumento da rugosidade causado pelo acréscimo de oligonucleotídeos (TP).

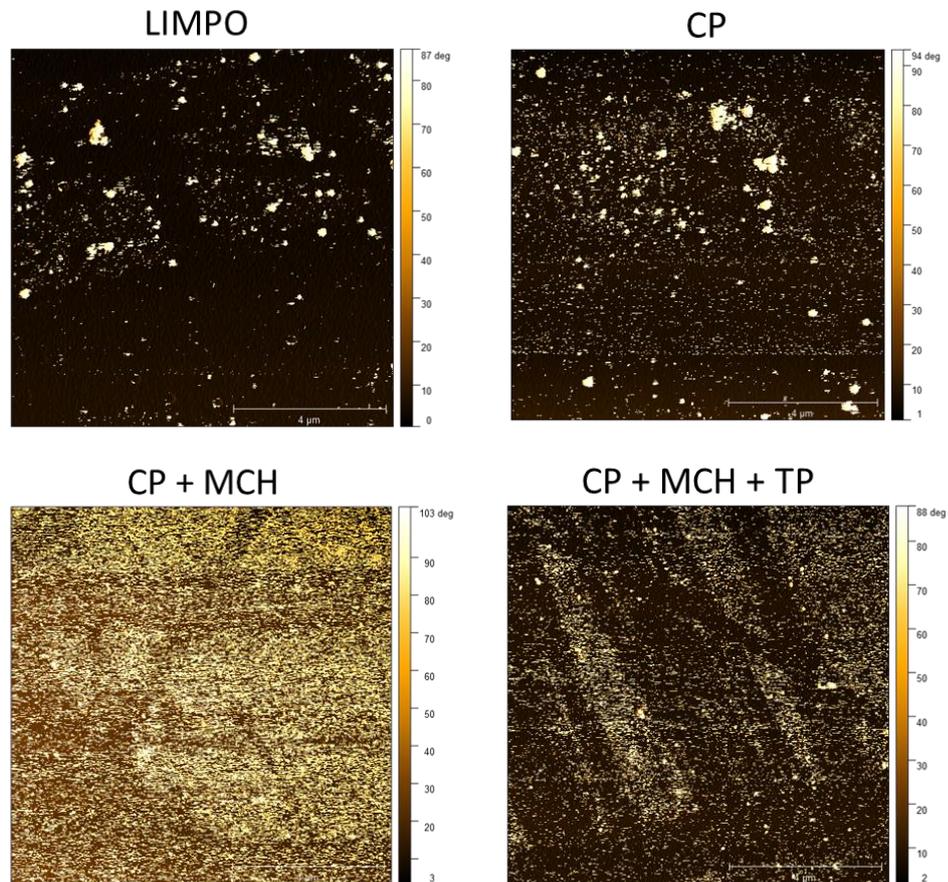


Figura 5.18 - Imagens de contraste de fase obtidas por AFM e valores de rugosidade por área (R_a) para cada etapa da construção do biossensor.

Fonte: Elaborada pela autora

5.2.7 Reprodução do teste de seletividade realizado em eletrodo de barra

Como primeira etapa no desenvolvimento do biossensor em eletrodo multiplex, reproduzimos os parâmetros e metodologias utilizadas nos eletrodos de barra para o teste de hibridização e seletividade (seção 5.1.4), para avaliar se poderiam ser extrapolados para eletrodos descartáveis. Nesse caso, como o dispositivo multiplex possui quatro eletrodos de trabalho, na etapa de hibridização, dois eletrodos eram incubados com sequências da espécie *M. incognita* (TP) e os outros dois eram incubados com sequências da espécie *M. javanica* (NC). Os espectros de impedância para as etapas de construção da biocamada e após a hibridização com as sequências NC e TP, são ilustradas nas **Figuras 5.19A** e **5.19B**, respectivamente.

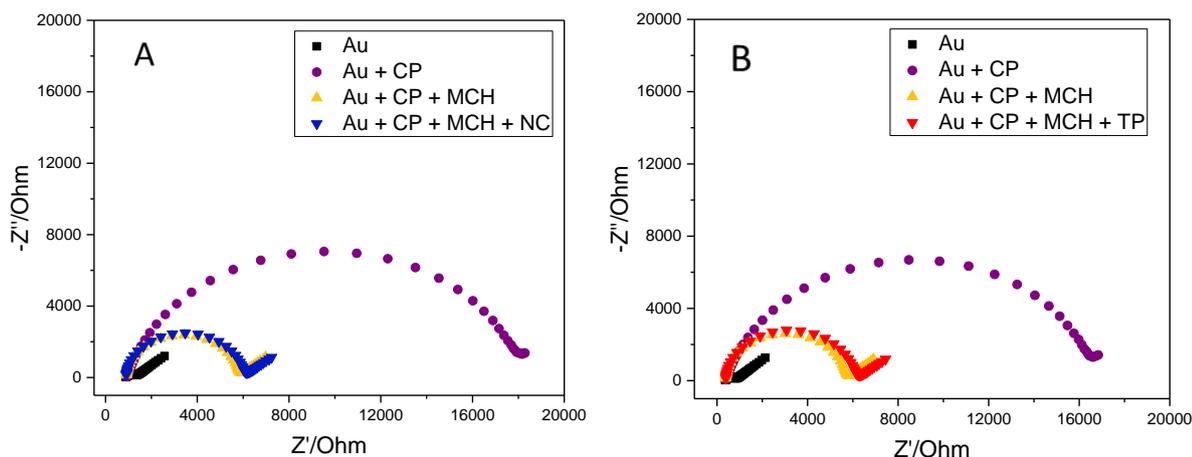


Figura 5.19 – Diagramas de Nyquist para teste de seletividade nos eletrodos multiplex: etapa de hibridização em (A) com *M. javanica* -NC - e em (B) com *M. incognita* -TP.

Fonte: Elaborada pela autora

Para os eletrodos utilizados nesse experimento, verificou-se um aumento do R_{CT} após a imobilização das sequências de captura muito maior do que o apresentado no eletrodo de barra. Comparativamente, para eletrodos de barra o aumento foi de cerca de 586% enquanto para os eletrodos descartáveis, foi de 2807%. No entanto, o comportamento após a etapa de alinhamento foi muito distinto entre os dois tipos de eletrodos – para o de barra, o R_{CT} aumentou em pouco mais de 4 vezes, já para o descartável houve uma diminuição de 3,5 vezes. A variação exibida pelos eletrodos multiplex pode indicar dois fenômenos: 1-) grande parte das sequências de captura se mantiveram adsorvidas na superfície do eletrodo e ao adicionar o MCH elas foram removidas, causando o decréscimo do R_{CT} , e 2-) a concentração e tempo de imobilização de MCH não foram suficientes para o bloqueio de toda a superfície do eletrodo de maneira que o alinhamento do DNA que resulta na diminuição do R_{CT} foi preponderante. Por último, na etapa de detecção, não se observou uma variação significativa da resistência a transferência de cargas para ambas sequências, com aumento médio de 8% para TP e 5,2% para NC, conforme **Figura 5.20**. Esse resultado indica que não houve hibridização entre as sequências complementares de captura e alvo para a espécie *M. incognita*. Ademais, infere-se desse estudo que os parâmetros utilizados para os eletrodos de barra não podem ser extrapolados para os eletrodos descartáveis multiplex, uma vez que o comportamento observado no primeiro não se reproduziu no segundo. Assim, é imprescindível que se faça otimizações para todas as etapas a fim de detectar as sequências alvo e diferenciá-las de sequências não complementares.

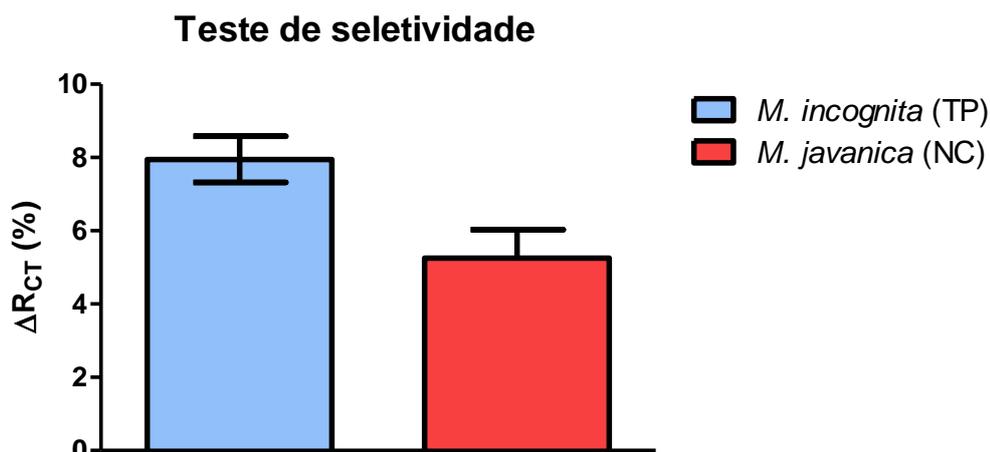


Figura 5.20 – Gráficos de barras para variação percentual da resistência a transferência de cargas antes e após etapa de hibridização com *M. incognita* (TP) e *M. javanica* (NC).

Fonte: Elaborada pela autora

5.2.8 Tempo de imobilização

Para avaliação da eficiência de ligação das sequências de captura e da reprodutibilidade entre eletrodos, foram testados quatro tempos de imobilização: 2, 5, 15 e 48 h. Nesse estudo, dispositivos multiplex foram incubados com CP a 0,2 μmol/L, em atmosfera úmida e temperatura de 25°C. Os voltamogramas e espectros de impedância foram coletados em três eletrodos antes e após a modificação com os oligonucleotídeos e, então, calculou-se o valor médio da variação percentual do R_{CT} ($[\text{R}_{\text{CT IMO}} - \text{R}_{\text{CT LIMPO}}]/\text{R}_{\text{CT LIMPO}}$) para cada tempo de imobilização, apresentados na **Figura 5.21**.

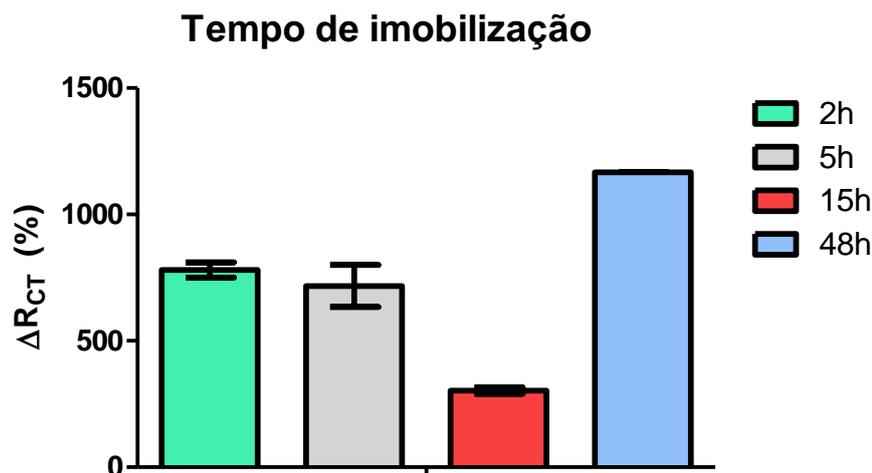


Figura 5.21 – Gráfico de barras com a variação percentual de R_{CT} ($[R_{CT\ IMO} - R_{CT\ LIMPO}]/R_{CT\ LIMPO}$) para a imobilização de seqüências CP a $0,2\ \mu\text{mol/L}$ em eletrodos multiplex por 2, 5, 15 e 48 h.

Fonte: Elaborada pela autora

Observa-se que para todos os tempos de imobilização houve um aumento significativo no R_{CT} , acima de 700%, indicando que as seqüências de captura são capazes de se ligar ao eletrodo mesmo em tempos curtos. A análise dos dados mostra que o ΔR_{CT} é muito similar para incubações de 2 e 5 h, apresentando aumento de 781 e 717%, respectivamente. Para 15 h de imobilização, a variação percentual do R_{CT} foi de 303%, o menor valor encontrado entre os tempos estudados. Esse comportamento pode ser resultante de uma reorganização das seqüências de CP na superfície do ouro. Por outro lado, eletrodos incubados por 48 h exibiram um ΔR_{CT} muito maior (1167%) que indica que esse tempo é o que apresenta maior eficiência de ligação dos oligonucleotídeos. Os espectros de impedância após a modificação dos eletrodos são mostrados na **Figura 5.22**. A influência do tempo de imobilização de seqüências CP em eletrodos multiplex diferiu da apresentada pelos eletrodos de barra, portanto, infere-se que a formação da SAM nesses eletrodos ocorre de maneira distinta.

Nesse estudo também foi avaliada a reprodutibilidade da construção da camada de biorreconhecimento, comparando a variação percentual do R_{CT} de eletrodos submetidos ao mesmo tempo de imobilização. Para o desenvolvimento de biossensores, recomenda-se que o ΔR_{CT} seja semelhante em eletrodos diferentes. Alguns estudos mostram que para uma melhor organização das monocamadas automontadas e, conseqüentemente, de uma melhor reprodutibilidade entre os dispositivos, tempos maiores de imobilização são mais apropriados.⁸⁰ Nossos resultados mostraram uma reprodutibilidade boa para todos os tempos de imobilização testados, com melhor desempenho para as réplicas incubadas em 48 h, que apresentaram desvio médio relativo de 0,1%.

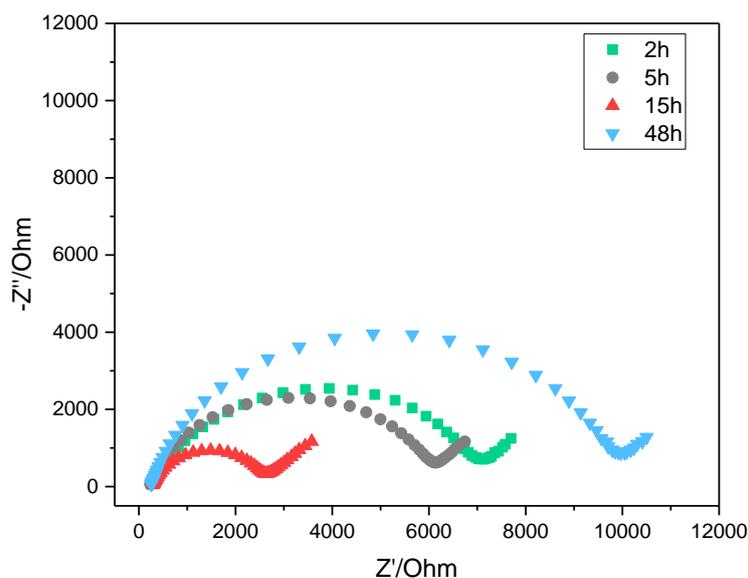


Figura 5.22 – Diagrama de Nyquist para a imobilização de CP a 0,2 $\mu\text{mol/L}$ em eletrodos multiplex nos tempos indicados.

Fonte: Elaborada pela autora

O resumo dos valores de ΔR_{CT} encontrados para cada tempo de imobilização e o desvio médio relativo entre as réplicas pode ser visto na **Tabela 5.5**.

Tabela 5.5 – Variação percentual do R_{CT} (ΔR_{CT}) após a incubação dos eletrodos com CP nos tempos indicados. O valor médio do ΔR_{CT} entre as réplicas e o desvio médio relativo são apresentados para cada tempo.

Réplicas	2h	5h	15h	48h
1	748%	635%	315%	1167%
2	789%	715%	289%	1169%
3	806%	801%	305%	1167%
Média	$781 \pm 30\%$	$717 \pm 83\%$	$303 \pm 13\%$	$1167 \pm 1\%$
Desvio médio relativo	3,8%	11,6%	4,3%	0,1%

Fonte: Elaborada pela autora

Ao considerar os critérios de maior imobilização de sequências de captura e melhor reprodutibilidade entre eletrodos dentre os tempos testados, conclui-se que a incubação de 48 h é a mais apropriada para a construção dos biossensores em dispositivos multiplex. Assim, as otimizações subsequentes foram realizadas com essa configuração.

5.2.9 Concentração da molécula intercalante

Como discutido anteriormente, moléculas intercalantes são responsáveis pelo alinhamento perpendicular ao eletrodo das sequências de captura e pelo bloqueio das regiões não preenchidas por elas. Nesse sentido, realizou-se um estudo comparativo da influência da molécula intercalante na eficiência de hibridização e na seletividade do biossensor. Para isso, eletrodos modificados com CP da espécie *M. incognita* foram incubados por 1 h com mercaptohexanol (MCH) em duas concentrações diferentes (0,2 e 1 mmol/L) e, em seguida, submetidos a etapa de hibridização com TP (espécie *M. incognita*) e NC (espécie *M. javanica*) por 1 h a 25°C. Os dois grupos de eletrodos foram comparados com o grupo em que não houve a adição de MCH.

Os resultados mostraram que após a adição do MCH para as duas concentrações testadas, houve um grande decréscimo do R_{CT} , conforme **Figura 5.23**. Para os eletrodos modificados com MCH 0,2 mmol/L, o valor médio para o ΔR_{CT} foi de -40%, ao passo que para os modificados com MCH 1mmol/L, o valor médio foi de -66,6%. Nesse caso, o efeito de alinhamento das sequências de DNA (que causa a diminuição do R_{CT}) parece ser preponderante ao bloqueio das regiões desocupadas do eletrodo pelo MCH. Novamente as propriedades elétricas dos eletrodos multiplex após as modificações diferem daquelas apresentadas pelos eletrodos de barra, em que a adição do MCH causa um aumento significativo no R_{CT} . Vale ressaltar que os eletrodos de barra utilizados nesse estudo apresentaram área eletroativa média 10% maior que os eletrodos multiplex em substrato de vidro. Isso significa que ao modificarmos os dois tipos de eletrodos com a mesma concentração de CP, haverá mais área disponível para o bloqueio com MCH em eletrodos de barra.

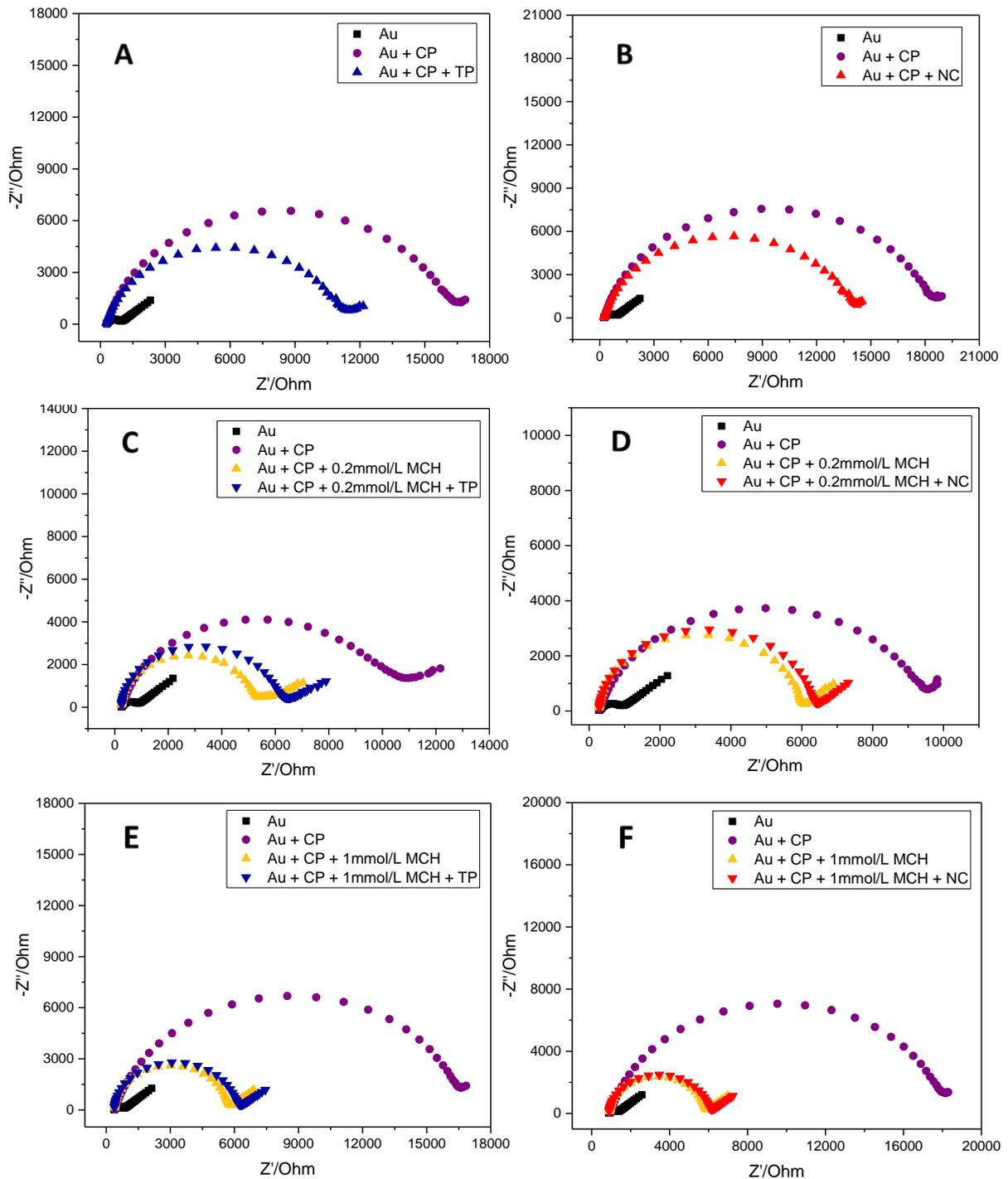


Figura 5.23 – Diagramas de Nyquist da influência da concentração de MCH na formação da SAM e na seletividade do biossensor: eletrodos sem modificação com MCH incubados com TP (A) e NC (B); eletrodos modificados com MCH 0,2 mmol/L incubados com TP (C) e NC (D); eletrodos modificados com MCH 1mM incubados com TP (E) e NC (F).

Fonte: Elaborada pela autora

Os testes de detecção realizados com sequências TP e NC, mostraram que a maior variação do R_{CT} ocorreu nos eletrodos sem a adição da molécula intercalante, **Figura 5.24**. Para essa configuração, houve a diminuição do R_{CT} após a hibridização, devido ao alinhamento das sequências de captura que resultam na liberação de regiões anteriormente

bloqueadas para a transferência de cargas. No entanto, os biossensores não foram seletivos, visto que a faixa de ΔR_{CT} correspondente ao TP é compreendida pela faixa do NC. Para eletrodos submetidos à etapa de alinhamento com MCH a 0,2 mmol/L, observou-se a seletividade do biossensor, as faixas de ΔR_{CT} para as duas sequências de DNA não coincidem, apresentando um aumento médio de 18% para o TP e de 8% para o NC. Porém, essa variação é considerada baixa e indica que a hibridização entre as sequências alvo e de captura ainda é pouco eficiente. Apesar dos eletrodos construídos com MCH a 1 mmol/L também exibirem seletividade, a diferença do ΔR_{CT} entre eles (cerca de 3%) não foi significativa e a variação do R_{CT} resultante do TP foi quase a metade apresentada pelos eletrodos com 0,2 mmol/L de MCH.

Seletividade em função da concentração de MCH

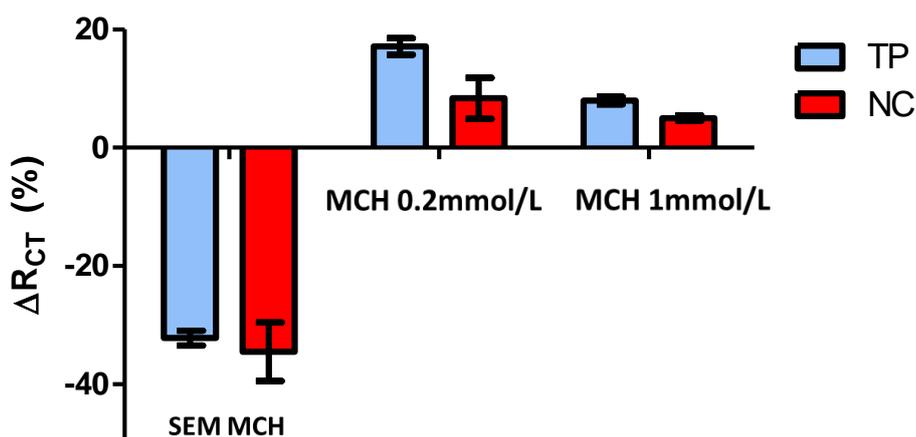


Figura 5.24 – Gráfico de barras com a variação percentual de R_{CT} entre as etapas anterior e posterior a incubação com as sequências TP e NC para eletrodos sem MCH, com MCH 0,2 mmol/L e com MCH 1 mmol/L.

Fonte: Elaborada pela autora

5.2.10 Tempo de imobilização da molécula intercalante

Adicionalmente ao estudo da influência da concentração de MCH na formação da SAM e seletividade do biossensor, foi realizada a otimização do tempo de incubação com a molécula intercalante. Eletrodos modificados com CP 0,2 $\mu\text{mol/L}$ por 48 h foram submetidos a etapa de alinhamento com MCH 0,2 mmol/L em diferentes tempos de incubação: 30 min, 1 h e 4 h. A **Figura 5.25** apresenta os espectros de impedância obtidos.

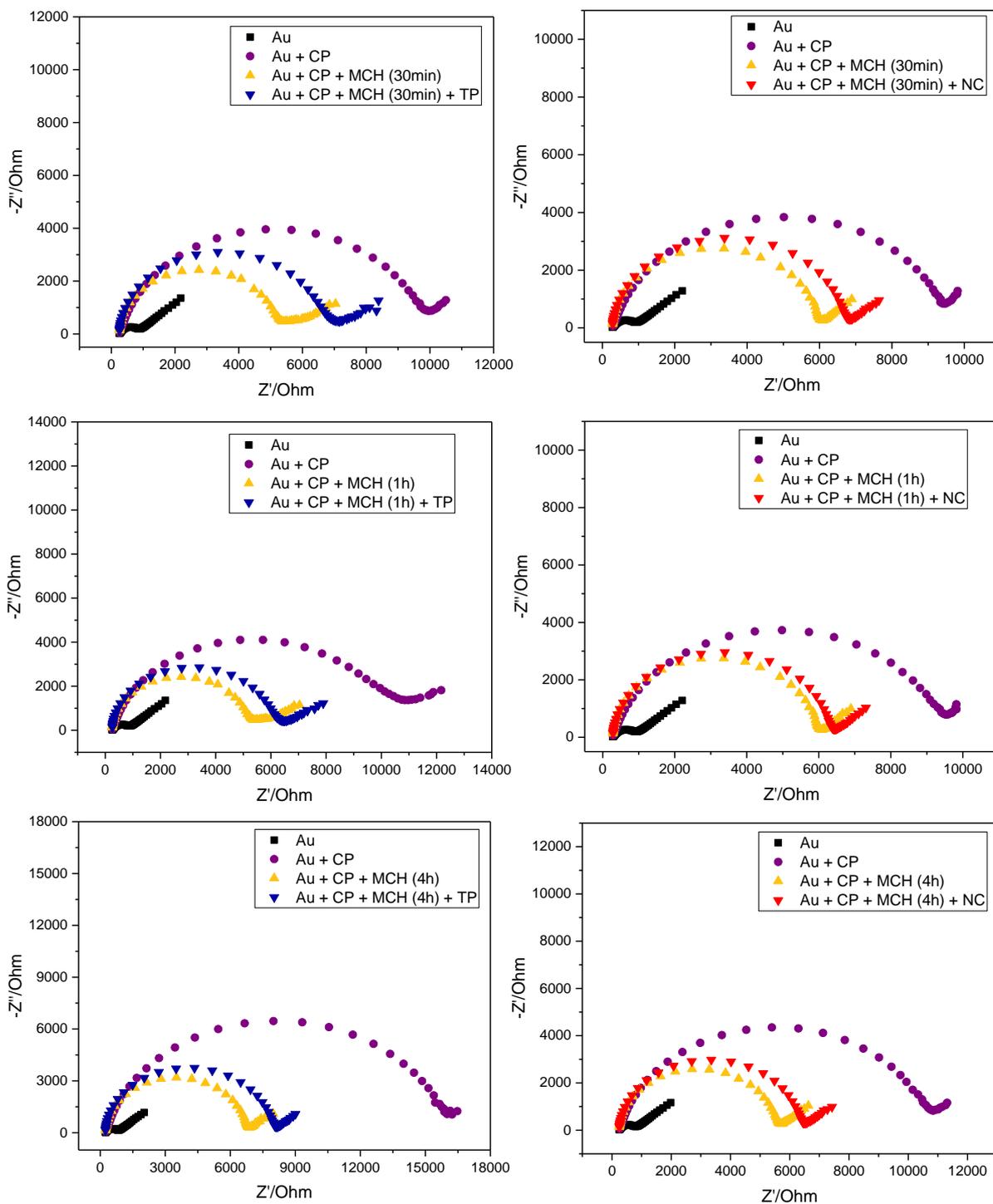


Figura 5.25 – Diagramas de Nyquist de eletrodos modificados com MCH 0,2 mmol/L em diferentes tempos e sua influência na seletividade: por 30 min – detecção com TP (A) e NC (B); por 1 h – detecção com TP (C) e NC (D); por 4 h – detecção com TP (E) e NC (F).

Fonte: Elaborada pela autora

Em todos os tempos testados houve a diminuição do R_{CT} após a etapa de alinhamento com MCH – os valores médios do ΔR_{CT} foram -51% para 30 min de incubação, -40% para 1 h e -61% para 4 h. A hibridização com TP e CP a 1 $\mu\text{mol/L}$ foi realizada a temperatura

ambiente e a variação média do R_{CT} para os três grupos de eletrodos é mostrada na **Figura 5.26**. Verifica-se que o grupo modificado por 30 min com a molécula intercalante foi o que apresentou maior ΔR_{CT} após a incubação com a sequência alvo, indicando que a construção da SAM nessa configuração é a mais favorável para a hibridização entre as sequências complementares. Além disso, estes eletrodos também foram mais seletivos, com ΔR_{CT} de $26,1 \pm 4,6\%$ para TP e de $15,0 \pm 1,8\%$ para NC. Apesar de todos os grupos terem apresentado seletividade, identifica-se uma diminuição dela com o aumento do tempo de incubação, de maneira que para os eletrodos com modificação por 4 h a diferença entre os valores médios de ΔR_{CT} para TP e NC foi de menos de 5%. Infere-se que para tempos de incubação longos, o MCH passa a remover as sequências de captura imobilizadas no eletrodo. Assim, para a continuidade dos estudos, foi escolhido o tempo de 30 min para a etapa de alinhamento com a molécula intercalante.

Seletividade em função do tempo de incubação do MCH

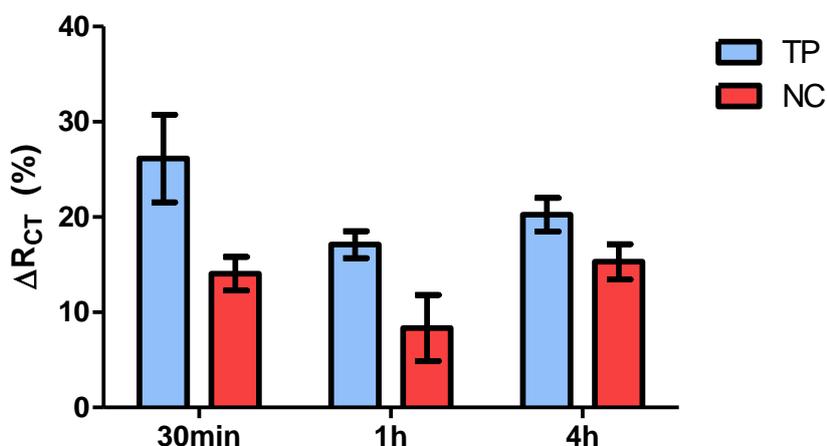


Figura 5.26 – Gráfico de barras com a variação percentual de R_{CT} entre as etapas anterior e posterior a incubação com as sequências TP e NC para eletrodos incubados com MCH 0,2 mmol/L por 30 min, 1 h e 4 h.

Fonte: Elaborada pela autora

5.2.11 Tempo de hibridização

Uma vez realizada a otimização dos parâmetros para a formação da camada de biorreconhecimento, otimizou-se as variáveis envolvidas na etapa de hibridização. Eletrodos modificados com CP e MCH para as concentrações e tempos escolhidos anteriormente foram incubados com sequências TP e NC a 25°C durante dois períodos: 1 h e 2 h. Visto que a

variação do R_{CT} após a hibridização com TP não tinha sido suficientemente alta para a concentração da sequência alvo testada, esperava-se que um tempo maior de incubação resultaria em uma maior eficiência de hibridização. No entanto, para o período de 2 h, os eletrodos foram pouco reprodutíveis, os valores de ΔR_{CT} apresentados pelas réplicas diferiram em até 85%. Além disso, existe uma faixa de ΔR_{CT} que é abrangida tanto pelos valores correspondentes ao TP quanto pelos valores de NC (ver **Figura 5.27**), sugerindo que podem ocorrer falsos positivos ou negativos para biossensores com essa configuração.

Seletividade em função do tempo de hibridização

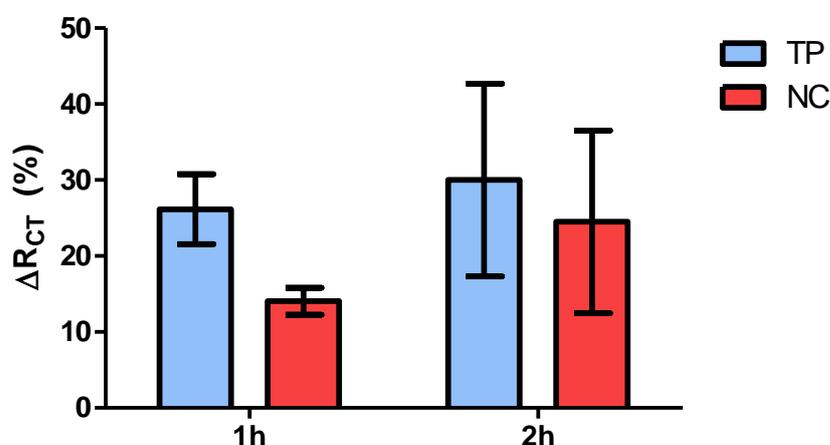


Figura 5.27 – Gráfico de barras para a seletividade em função do tempo de hibridização: sequências de NC ou TP a 1 $\mu\text{mol/L}$ foram incubadas com os eletrodos durante 1 e 2 h.

Fonte: Elaborada pela autora

5.2.12 Temperatura de hibridização

Sabe-se que a temperatura pode influenciar na taxa de hibridização entre sequências complementares. Assim, a temperatura mantida durante a incubação dos eletrodos com as sequências alvo e não-complementares também foi estudada. Para isso, a etapa de hibridização foi realizada com sequências TP e NC a 1 $\mu\text{mol/L}$ durante 1 h nas temperaturas de 25°C e 60°C. Os valores encontrados para a variação percentual de R_{CT} são apresentados na **Figura 5.28**. Eletrodos mantidos a 60°C não apresentaram seletividade, há uma região que abrange variações resultantes tanto de TP e quanto de NC. Novamente, o melhor resultado foi obtido para a hibridização durante 1 h a 25°C.

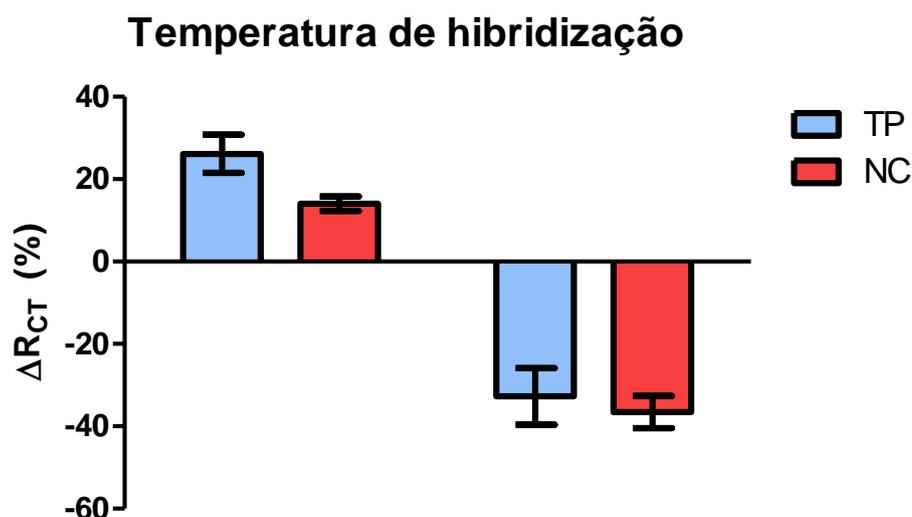


Figura 5.28 - Gráfico de barras para a seletividade em função da temperatura de hibridização: sequências de NC ou TP a 1 $\mu\text{mol/L}$ foram incubadas com os eletrodos por 1 h a 25°C e 60°C.

Fonte: Elaborada pela autora

Embora o genossensor tenha se mostrado seletivo para uma determinada configuração experimental, a variação após a hibridização com as sequências alvo ainda é baixa, considerando a concentração de TP testada. Esses resultados indicam que a hibridização entre as sequências complementares ainda é baixa e que novas otimizações se fazem necessárias para que o desempenho do biossensor seja aperfeiçoado, garantindo seletividade e baixo limite de detecção.

5.3 Imunossensor elétrico

5.3.1 Caracterização morfológica dos eletrodos interdigitados

Eletrodos interdigitados de ouro, após a limpeza descrita na seção 4.2.2, foram caracterizados quanto à sua morfologia, por microscopia de força atômica. Imagens topográficas em 2D (**Figura 5.29A**) e 3D (**Figura 5.29B**) tomadas em uma área de 4 μm^2 exibem um filme homogêneo em que o maior pico possui 16 nm de altura. A rugosidade foi determinada em 4 eletrodos distintos para analisar a reprodutibilidade. Os valores médios encontrados para a rugosidade por área e rugosidade média quadrática foram de $1,24 \pm 0,04$ nm e $1,58 \pm 0,05$ nm, respectivamente. Desses resultados, infere-se que eletrodos fabricados pela metodologia adotada apresentam rugosidades semelhantes, com variação de cerca de 3%.

Essa característica é fundamental para a organização da monocamada automontada e para que as análises de condutividade elétrica sejam reprodutíveis.

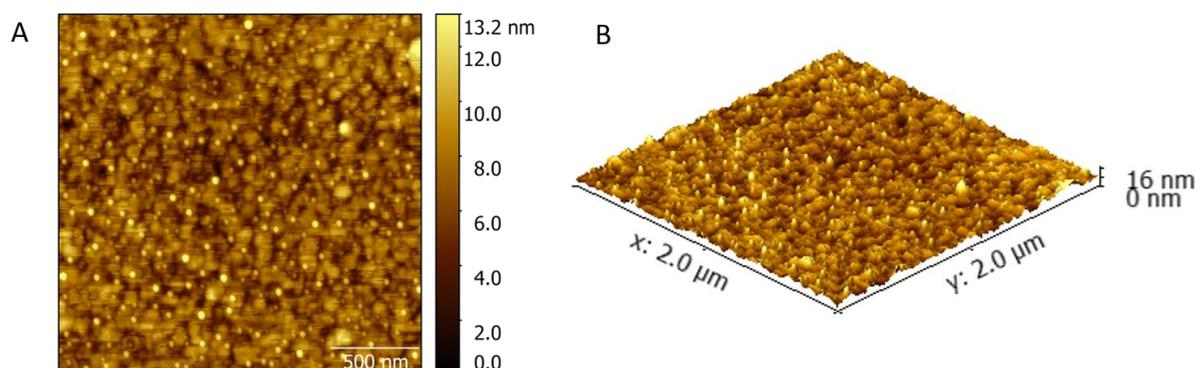


Figura 5.29 – Imagens de topografia obtidas por AFM em 2D (**A**) e 3D (**B**) de eletrodo interdigitado limpo. Os valores de rugosidade encontrados para esse eletrodo foram $R_a = 1,29$ nm e $R_q = 1,64$ nm com altura máxima de 16 nm.

Fonte: Elaborada pela autora

5.3.2 Medidas de capacitância – reprodutibilidade e escolha de frequência

O imunossensor elétrico foi construído através da formação de camada automontada: inicialmente, eletrodos interdigitados limpos foram modificados com MPA 1 mmol/L em temperatura ambiente e atmosfera úmida por 15 h; após esse período, os eletrodos foram lavados com água Milli-Q e, então, adicionou-se uma solução aquosa contendo 2 mmol/L de EDC e 5 mmol/L de NHS para ativação do grupo carboxílico presente no MPA, o tempo de incubação foi de 1 h. Em etapa posterior, os eletrodos foram modificados com o soro imunizado por 4 h em atmosfera úmida e temperatura de 4°C. A etapa de bloqueio dos sítios ativos remanescentes com albumina de soro bovino (BSA), por exemplo, não foi adotada nesse protocolo uma vez que o soro imunizado já contém proteínas.

Eletrodos modificados foram submetidos a 20 medidas consecutivas de capacitância elétrica para avaliar a reprodutibilidade das mesmas na faixa de frequência de 10^2 Hz a 10^6 Hz. O resultado é apresentado na **Figura 5.30**. Os valores de capacitância se mostraram reprodutíveis para quase todas as frequências, com uma variação muito pequena para a faixa $0,6 \times 10^6$ a 1×10^6 Hz.

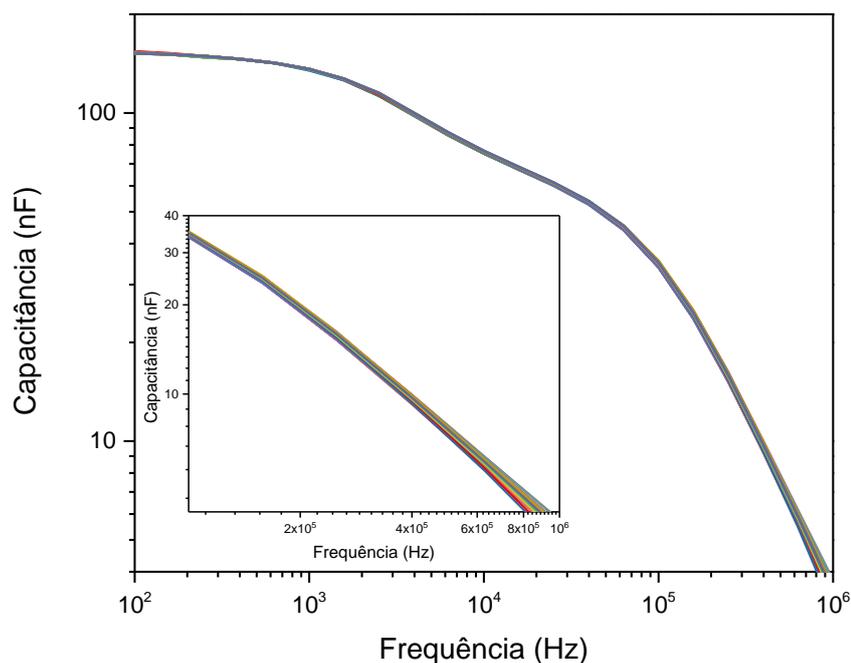


Figura 5.30 – Espectro de capacitância de 20 medidas consecutivas realizadas no mesmo eletrodo para avaliação da reprodutibilidade na faixa de 10^2 a 10^6 Hz. No detalhe, a ampliação da faixa 10^5 a 10^6 Hz.

Fonte: Elaborada pela autora

Para escolher uma frequência fixa para avaliar a variação percentual da capacitância e realizar a análise estatística multivariada, eletrodos modificados com soro imunizado da espécie *M. incognita* foram incubados em solução contendo $30 \mu\text{g/mL}$ da proteína da espécie *M. javanica* (negativa) por 1 h e em solução contendo a mesma concentração da proteína da espécie *M. incognita* (positiva) também por 1 h. Espectros de impedância elétrica foram coletados em eletrodos sem incubação (PBS) e após as incubações descritas. As medidas foram realizadas em solução tampão e adotou-se 5 min de espera (*delay*) antes do início delas para a organização da dupla camada elétrica. Conforme mostrado na **Figura 5.31**, há uma variação significativa dos valores de capacitância entre as configurações estudadas para frequências entre 10^4 e 10^6 Hz, apontando essa região como a que melhor discrimina as amostras. Considerando que há uma pequena variação na reprodutibilidade das medidas para frequências acima de 6×10^5 Hz, escolheu-se 10^5 Hz como frequência fixa para as análises subsequentes.

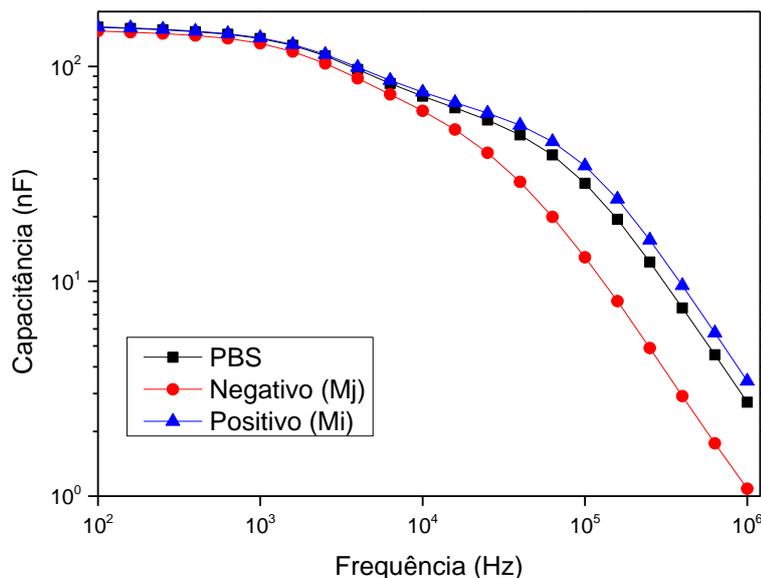


Figura 5.31 –Espectro de capacitância para eletrodos modificados com soro imunizado da espécie *M. incognita* – sem incubação (PBS), incubados com 30 $\mu\text{g/mL}$ de proteínas da espécie *M. javanica* (negativo) e incubados com 30 $\mu\text{g/mL}$ de proteínas da espécie *M. incognita* (positivo).

Fonte: Elaborada pela autora

5.3.3 Influência da limpeza dos eletrodos na seletividade

Como descrito na seção 4.2.2, foram testados dois protocolos de limpeza nomeados de KOH e etOH. Para avaliar se as limpezas influenciam na capacidade de discriminação das amostras e selecionar a mais adequada, dois conjuntos de eletrodos – cada um submetido a um método de limpeza – foram modificados com o soro imunizado *M. incognita* e caracterizados por medidas de capacitância antes da incubação e após as incubações com as proteínas negativas (Mj) e positivas (Mi) a 30 $\mu\text{g/mL}$. Realizou-se a análise de componentes principais utilizando a matriz de covariância para os valores obtidos na frequência de 10⁵ Hz. A **Figura 5.32** apresenta o gráfico de *score* do conjunto de dados em que se identifica a discriminação das diferentes amostras, com PC1 de 97,9% e PC2 de 2,1%. Para cada grupo é mostrado a elipse de confiança de 95%, definida como a região que compreende 95% do conjunto amostral e calculada a partir de uma distribuição gaussiana dos dados.⁸⁶ Dessa forma, o biossensor acusa a presença da proteína alvo apenas se o valor da medida elétrica estiver dentro da elipse pertencente ao grupo positivo (mostrado em azul).

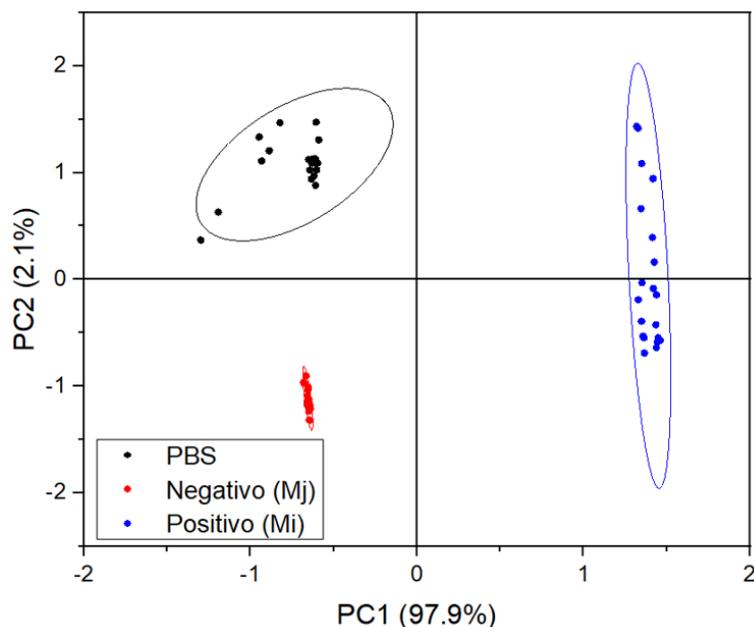


Figura 5.32 – Gráfico de *score* da análise de componentes principais de dois grupos de eletrodos submetidos a limpezas diferentes – discriminação das amostras sem proteínas, com proteínas de outra espécie (negativo) e com proteínas da mesma espécie (positivo). Para cada grupo é mostrado a elipse de confiança 95%.

Fonte: Elaborada pela autora

A influência das variáveis – neste caso, os dois protocolos de limpeza – é analisada a partir do gráfico de *loading*, mostrado na **Figura 5.33**. Nele, cada variável é mostrada como um vetor cuja intensidade e direção determinam a sua influência nas componentes principais 1 e 2. Observa-se que os eletrodos submetidos a limpeza com KOH apresentam uma intensidade pequena na direção y e uma intensidade grande na direção x, indicando que essa variável exerce maior influência na componente principal 1 (PC1). Por outro lado, o vetor que representa os eletrodos limpos com etOH possui uma intensidade pequena no eixo x e uma intensidade grande no eixo y, dessa forma, sua maior influência recai na PC2. Visto que a PC1, de forma isolada, é responsável pela discriminação de 97,9% dos dados e que a sua variável de maior peso é o KOH, escolheu-se esse protocolo de limpeza para a realização dos demais estudos.

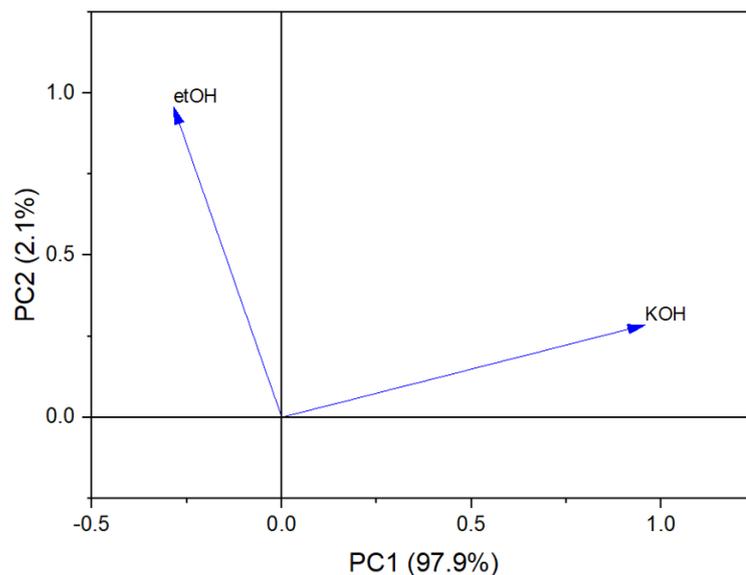


Figura 5.33 - Gráfico de *loading* da análise de componentes principais de dois grupos de eletrodos submetidos a limpezas diferentes – discriminação das amostras sem proteínas, com proteínas de outra espécie (negativo) e com proteínas da mesma espécie (positivo).

Fonte: Elaborada pela autora

5.3.4 Combinação de diferentes unidades sensoriais

Como forma de determinar se as variações na capacitância são de fato resultantes da interação seletiva antígeno-anticorpo, foram avaliados três conjuntos sensoriais: eletrodos limpos sem modificações, eletrodos modificados com filme orgânico sem a adição do soro imunizado e eletrodos com a SAM contendo o soro imunizado da espécie *M. incognita*, como descrito anteriormente. Para o filme orgânico, os eletrodos foram incubados por 15 h com solução de MPA 1 mmol/L, em seguida por 1 h com EDC/NHS a 2 mmol/L/5 mmol/L e, por último, realizou-se o bloqueio dos grupos carboxílicos com solução de BSA 0,5% (m/V) por 30 min. Para cada conjunto, foram coletados os valores de capacitância antes da incubação, após a incubação com proteínas da espécie *M. javanica* (negativo) a 30 µg/mL e após a incubação com as proteínas alvo (positivo) também a 30 µg/mL. A **Figura 5.34** apresenta o gráfico de *score* da combinação dos três grupos sensoriais.

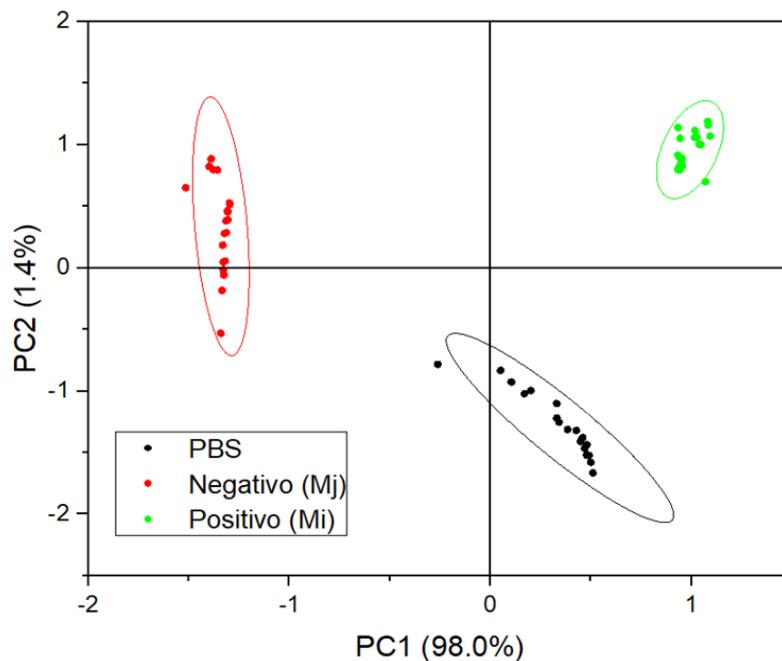


Figura 5.34 - Gráfico de *score* da análise de componentes principais obtida pela combinação de três conjuntos sensoriais – eletrodos limpos, eletrodos com filme orgânico e eletrodos com SAM – para a discriminação de amostras sem proteínas (PBS), com proteínas da espécie *M. javanica* (negativo) e com as proteínas da espécie *M. incognita* (positivo). Para cada grupo de amostras é mostrado a elipse de confiança 95%.

Fonte: Elaborada pela autora

Com a combinação dos três conjuntos sensoriais foi possível a discriminação das amostras em que só o PC1 já é capaz de diferenciar 98% delas. Somando os *scores* das componentes principais 1 e 2 obtém-se 99,4%.

O gráfico de *loading* para esse conjunto de variáveis, **Figura 5.35**, mostra que há uma contribuição ínfima dos conjuntos de eletrodos limpos e com filme orgânico (FO) para a componente principal 1, responsável pela diferenciação majoritária das amostras. Portanto, a PC1 é dominada pelos valores de capacitância referentes aos eletrodos com SAM e anticorpo (AC). Para a PC2, a maior contribuição é dada pelos eletrodos com filme orgânico e os eletrodos limpos, novamente, pouco influenciam. Esse resultado era o esperado, uma vez que eletrodos limpos e eletrodos com filme orgânico não possuem a molécula responsável pelo biorreconhecimento. Conclui-se que a discriminação das amostras é decorrente da interação específica entre os anticorpos presentes na SAM e suas proteínas alvo.

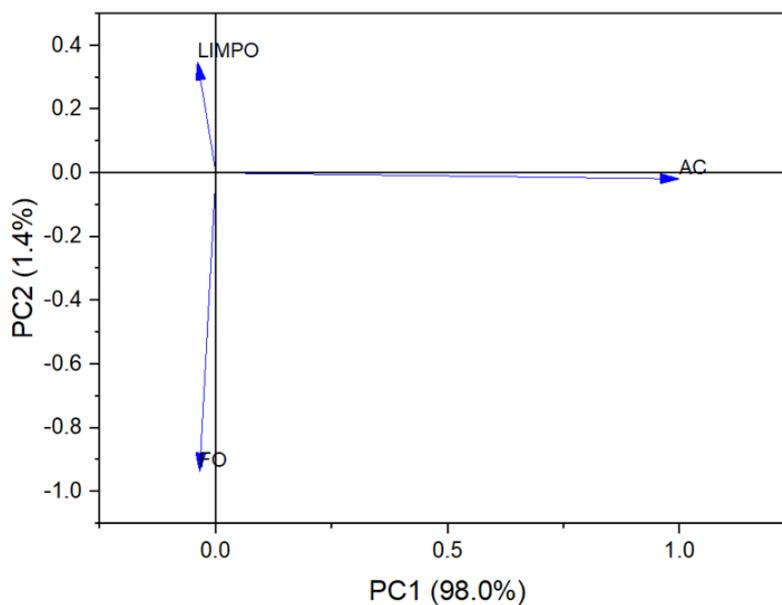


Figura 5.35 - Gráfico de *loading* da análise de componentes principais obtida pela combinação de três conjuntos sensoriais – eletrodos limpos, eletrodos com filme orgânico e eletrodos com SAM - para a discriminação de amostras sem proteínas (PBS), com proteínas da espécie *M. javanica* (negativo) e com as proteínas da espécie *M. incognita* (positivo).

Fonte: Elaborada pela autora

Visto que os eletrodos limpos pouco contribuem para as componentes principais 1 e 2, realizou-se a análise combinando apenas os conjuntos sensoriais FO e AC. Verifica-se no gráfico de *score* gerado, **Figura 5.36**, que ao excluir os eletrodos limpos, a PC1 aumentou e foi capaz de discriminar 98,7% das amostras. Para esse caso, somando os *scores* das componentes principais 1 e 2, obtém-se o valor de 100%. Esse resultado aponta para enorme capacidade de detecção do biossensor construído para a identificação de espécies de nematoides parasitas de plantas.

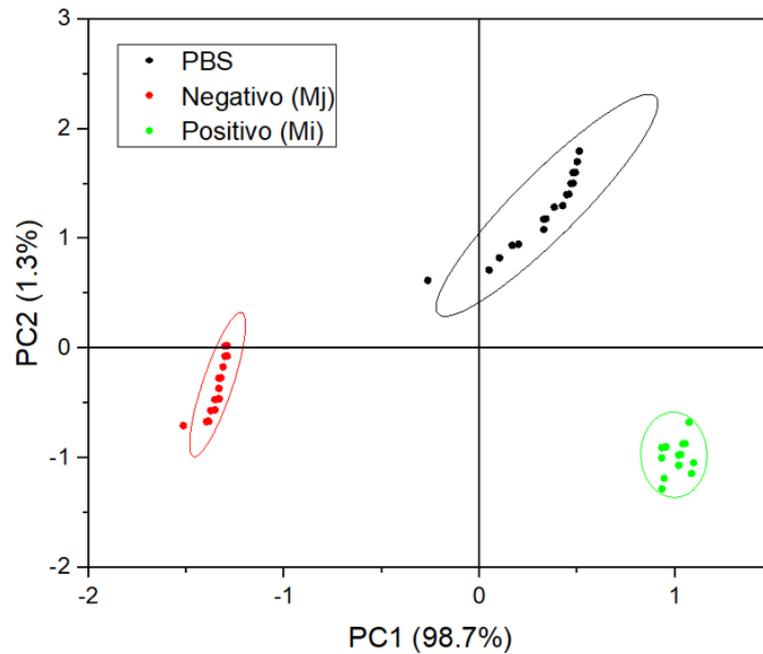


Figura 5.36 - Gráfico de *score* da análise de componentes principais obtida pela combinação de dois conjuntos sensoriais – eletrodos com filme orgânico e eletrodos com SAM – para a discriminação de amostras sem proteínas (PBS), com proteínas da espécie *M. javanica* (negativo) e com as proteínas da espécie *M. incognita* (positivo). Para cada grupo de amostras é mostrado a elipse de confiança 95%.

Fonte: Elaborada pela autora

O gráfico de *loading* correspondente mostra mais uma vez a contribuição majoritária dos eletrodos modificados com a SAM para a PC1 e a contribuição majoritária dos eletrodos funcionalizados com o filme orgânico para a PC2, conforme **Figura 5.37**. A combinação desses dois conjuntos sensoriais será utilizada para os demais estudos.

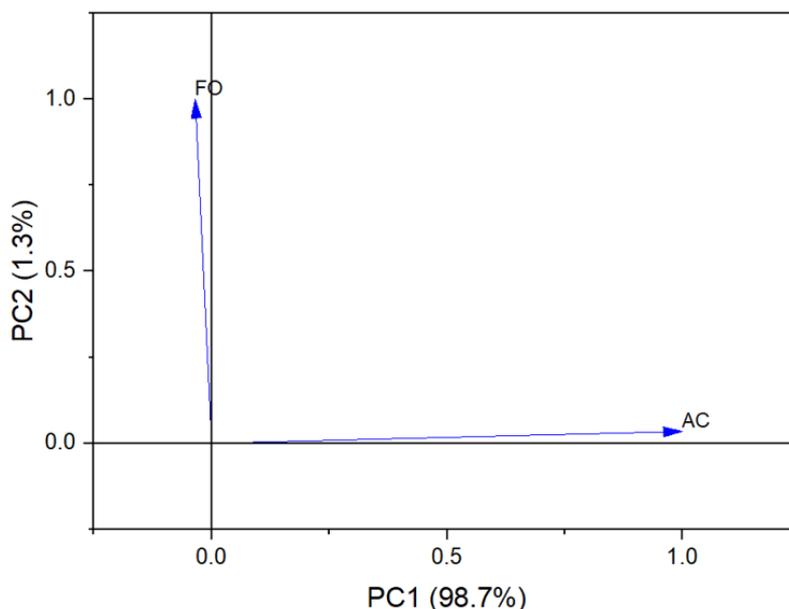


Figura 5.37 - Gráfico de *loading* da análise de componentes principais obtida pela combinação de três conjuntos sensoriais – eletrodos limpos, eletrodos com filme orgânico e eletrodos com SAM - para a discriminação de amostras sem proteínas (PBS), com proteínas da espécie *M. javanica* (negativo) e com as proteínas da espécie *M. incognita* (positivo).

Fonte: Elaborada pela autora

5.3.5 Medidas de detecção sem período de incubação

O biossensor aqui desenvolvido tem como objetivo a detecção de nematoides parasitas de plantas de maneira simples e rápida, podendo ser realizada até mesmo em campo. Assim, a possibilidade de detecção sem que haja período de incubação com a amostra por 1 h foi estudada. Para isso, eletrodos FO e AC foram submetidos a medidas de capacitância em solução tampão, após a espera de 10 min para a organização da dupla camada elétrica. Em etapa posterior, foi adicionado aos eletrodos uma solução contendo proteínas não-específicas (amostras negativas) a 30 $\mu\text{g/mL}$; após 10 min de espera necessários para a interação da amostra com a unidade sensorial e para a organização da dupla camada elétrica, realizou-se as medidas de impedância elétrica na mesma solução contendo as proteínas. Em seguida, repetiu-se o procedimento, dessa vez, em solução contendo as proteínas alvo (positivas) a 30 $\mu\text{g/mL}$. Os valores de capacitância foram submetidos a análise de componentes principais para avaliar se a detecção realizada sem tempo de incubação também é capaz de discriminar as amostras. O gráfico de *score* obtido, apresentado na **Figura 5.38**, demonstra não só a capacidade do biossensor em diferenciar as amostras a partir de medidas realizadas sem o período de incubação, como também exibe um score maior de PC1 se comparado com os

resultados dos experimentos realizados com 1 h de incubação. Somando as componentes principais 1 e 2 obtém-se a discriminação de 100% das amostras.

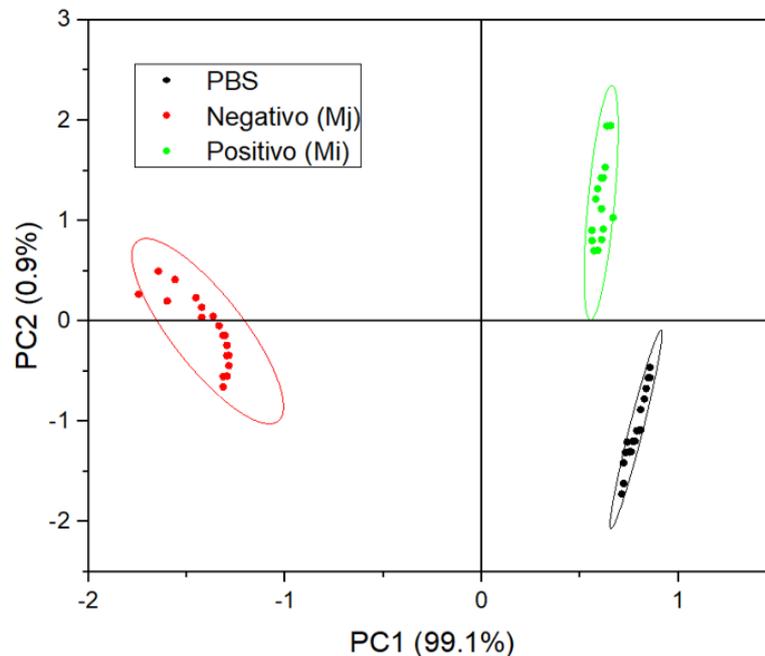


Figura 5.38 - Gráfico de *score* da análise de componentes principais obtida pela combinação de dois conjuntos sensoriais – eletrodos com filme orgânico e eletrodos com SAM – para a discriminação de amostras sem período de incubação. Para cada grupo de amostras é mostrado a elipse de confiança 95%.

Fonte: Elaborada pela autora

De maneira semelhante à detecção com incubação, o gráfico de *loading* (**Figura 5.39**) mostra que a PC1 depende quase que exclusivamente dos eletrodos que possuem anticorpos, enquanto a PC2 é dominada pelos valores gerados a partir dos eletrodos modificados com filme orgânico. Para a análise estatística multivariada é necessário que se possua ao menos dois conjuntos sensoriais, ou seja, duas variáveis distintas. Assim, o modelo ideal identificado nesse estudo é a combinação das medidas de capacitância em eletrodos FO e AC que juntos são capazes de identificar todas as amostras.

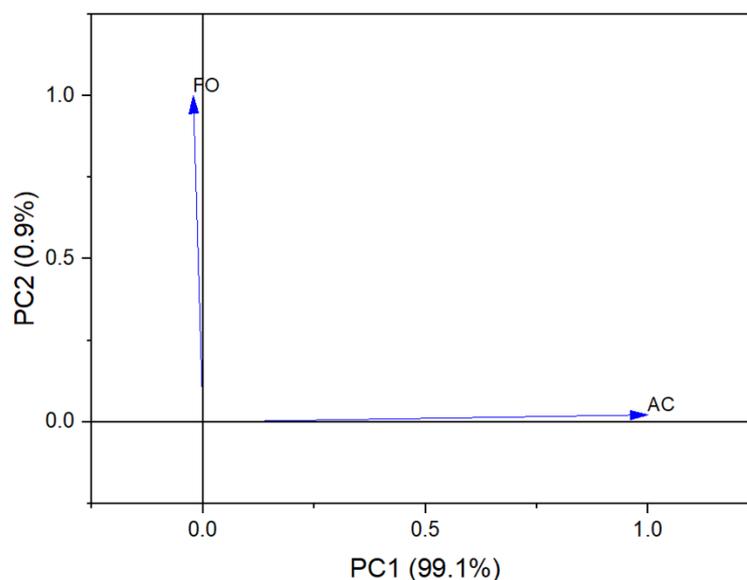


Figura 5.39 - Gráfico de *loading* da análise de componentes principais obtida pela combinação de dois conjuntos sensoriais – eletrodos com filme orgânico e eletrodos com SAM – para a discriminação de amostras sem período de incubação.

Fonte: Elaborada pela autora

Os mesmos procedimentos foram realizados na construção do biossensor para a detecção de nematoides *M. javanica*, utilizando o soro imunizado produzido a partir desses fitoparasitas na construção da SAM. Proteínas das espécies *M. incognita* e *M. javanica* a 30 µg/mL foram utilizadas como amostras negativa e positiva, respectivamente. Os resultados da análise estatística por PCA são apresentados na **Figura 5.40**. Esse biossensor também foi capaz de reconhecer de maneira seletiva as amostras contendo as proteínas alvo. O gráfico de score exibe os valores de 98,6% e 1,4% para as componentes principais 1 e 2, respectivamente. A contribuição dos conjuntos sensoriais FO e AC ocorreu de forma semelhante ao apresentado pelo biossensor *M. incognita*, indicando que a distinção das amostras é decorrente da interação dos elementos de biorreconhecimento (presentes na SAM) com as amostras.

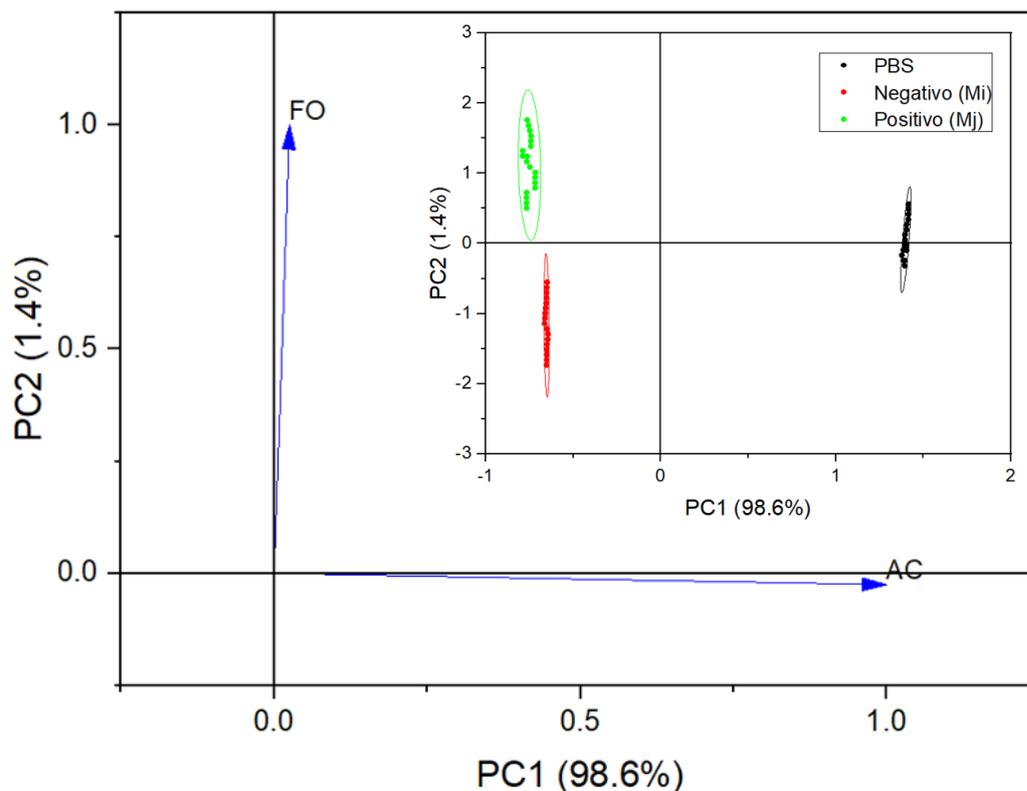


Figura 5.40 – Análise de componentes principais de biossensor para a espécie *M. javanica* com a combinação dos conjuntos sensoriais FO e AC: gráfico de *loading* e no detalhe, gráfico de *score* para a discriminação de amostras sem proteínas (PBS), com 30 $\mu\text{g/mL}$ de proteínas *Mi* (negativo) e com 30 $\mu\text{g/mL}$ de proteínas *Mj* (positivo).

Fonte: Elaborada pela autora

5.3.6 Variação na capacitância em função da concentração do analito

Complementando as análises de componentes principais dos imunossensores elétricos -capazes de discriminar qualitativamente as amostras-, realizou-se o estudo da variação relativa da capacitância em função da concentração das proteínas alvo, para encontrar o limite de detecção do imunossensor. Para isso, eletrodos modificados com SAM e contendo anticorpos específicos para a espécie *M. incognita* foram submetidos a medidas de capacitância antes e depois da interação com amostras contendo as proteínas alvo em concentrações distintas. Esse experimento foi realizado sem o período de incubação, respeitando o tempo de 10 min para a interação da amostra com o bioreceptor e organização da dupla camada elétrica antes do início das medidas elétricas. Os valores comparativos foram tomados para a frequência de 10^5 Hz e são apresentados na **Figura 5.41**. Identifica-se um aumento gradual do ΔC em função da concentração das proteínas alvo.

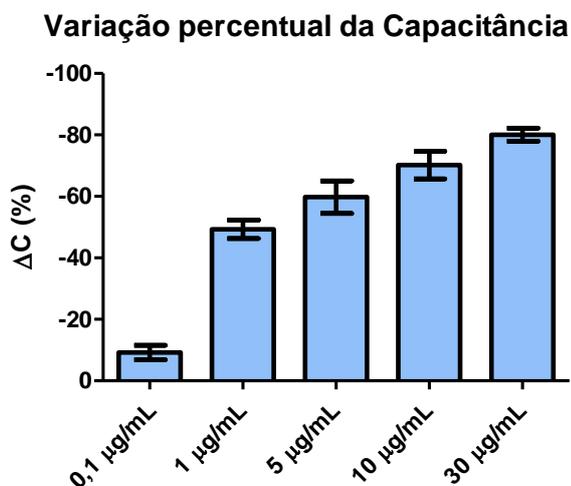


Figura 5.41 – Variação percentual da capacitância do biossensor construído para a espécie *M. incognita* em função da concentração do analito: A-) Gráfico de barras e B-) curva de calibração ΔC (%) versus log da concentração

Fonte: Elaborada pela autora

A variação percentual na capacitância (ΔC) após a interação com as proteínas exibiu uma dependência linear com o log da concentração, conforme **Figura 5.42**; a equação da reta obtida pela regressão linear foi ΔC (%) = $(-40,44 \pm 2,66) - (28,13 \pm 2,40) \times (\log_{10} [\text{proteína}])(\mu\text{g/mL})$, com ajuste de $R^2 = 0,979$.

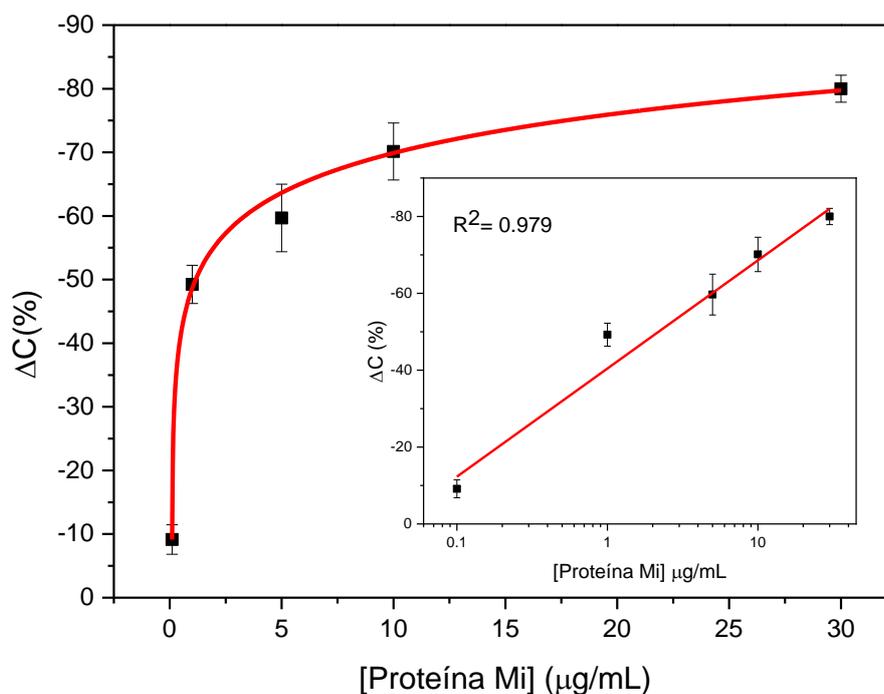


Figura 5.42 – Dependência linear da variação percentual da capacitância em função do log da concentração de proteínas (espécie *M. incognita*) – Curva de calibração obtida por regressão linear com ajuste $R^2 = 0,979$.

Fonte: Elaborada pela autora

O limite de detecção (LOD) para esse biossensor foi calculado com base na regra da IUPAC, que estabelece a seguinte relação:

$$\text{LOD} = \frac{3 \times \text{SD}}{b}$$

onde SD é o desvio padrão do branco - dado pela variação percentual da capacitância entre a etapa com anticorpo (C_{AC}) e a etapa com PBS (C_{PBS}) - e b corresponde ao coeficiente angular da reta delineada pela regressão linear. Foram obtidos os valores de $b = (-28,13 \pm 2,4)$ e $\text{SD} = (-0,27 \pm 0,02)$, resultando em um limite de detecção de $28,8 \pm 3,2$ ng/mL.

Esses resultados demonstram a capacidade do imunossensor para a detecção de nematoides parasitas de plantas, discriminando espécies do mesmo gênero. Além disso, destaca-se a eficiência da metodologia desenvolvida para a extração das proteínas dos nematoides e produção de anticorpos específicos contra elas, uma vez que as análises de componentes principais reportaram que a discriminação das amostras é resultante quase que exclusivamente da interação entre a camada de biorreconhecimento, contendo os anticorpos, com as amostras.

5.4 Custo estimado dos biossensores

Visando a elaboração de um produto e a produção dos biossensores em escala industrial, estimou-se o custo de fabricação do imunossensor elétrico (**Tabela 5.6**) e do genossensor eletroquímico (**Tabela 5.7**), incluindo os valores dos eletrodos e principais reagentes. Vale ressaltar que os preços dos reagentes foram cotados para quantidades usuais de laboratório e que para produção em larga escala, é provável que os valores de cada item sejam reduzidos. Dado os prejuízos causados pela infestação de nematoides parasitas de plantas em diferentes culturas e a quantidade de nematicidas aplicada em plantações com alta população desses microrganismos, o custo dos dispositivos desenvolvidos é adequado e viável, mostrando mais uma vez o potencial dessa ferramenta para a agricultura.

Tabela 5.6 – Custo estimado para a produção do imunossensor elétrico

	Tamanho da embalagem	Preço da embalagem (R\$)	Quantidade usada por eletrodo	Preço por eletrodo (R\$)
EDC	5 g	459,00	1,92 µg	$176,2 \times 10^{-6}$
NHS	25 g	455,00	2,87 µg	$52,2 \times 10^{-6}$
MPA	84 mL	214,00	0,44 nL	$1,12 \times 10^{-6}$
Soro imunizado	15 mL	1456,00	5 µL	0,48
Eletrodo				2,7 (unidade)
Funcionário		40,00 reais/h	8h para produzir 100 eletrodos	3,2
				Custo total: R\$ 6,38

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 5.7 – Custo estimado para a produção do genossensor eletroquímico

	Tamanho da embalagem	Preço da embalagem (R\$)	Quantidade usada por eletrodo	Preço por eletrodo (R\$)
MCH	5 mL	355,00	2,77 nL	$196,7 \times 10^{-6}$
DTT	5 g	667,00	6,85 μ g	$913,8 \times 10^{-6}$
Ferri	50 g	181,00	0,57 mg	0,002
Ferro	100 g	226,00	0,74 mg	0,002
DNA de captura	131 μ L - 100 μ mol/L	1214,00	20 μ l - 0,2 μ mol/L	0,44
Eletrodo				8,12
Funcionário		40,00 reais/h	8 h para produzir 100 eletrodos	3,2
				Custo total: R\$ 11,77

Fonte: Elaborada pela autora

6 Conclusões

Baseado na problemática dos nematoides parasitas de plantas para a agricultura e na ausência de um sistema de detecção e identificação simples, rápido e de baixo custo, esse projeto teve como objetivo o desenvolvimento de dois biossensores que abordassem a identificação de maneiras distintas: um genossensor eletroquímico para a detecção do material genético dos nematoides e um imunossensor elétrico para a detecção de proteínas específicas desses fitoparasitas. Dessa forma, seria possível analisar de forma comparativa qual estratégia se adequaria melhor à aplicação mencionada.

Para o genossensor, uma nova configuração de eletrodo do tipo multiplex foi projetada e fabricada. Nela, quatro eletrodos de trabalho e dois de referências permitem que a plataforma seja utilizada para a detecção de até quatro analitos distintos. Utilizou-se o método de fotolitografia e metalização por *sputtering* para a fabricação dos eletrodos em dois substratos distintos: PET e vidro. Caracterizações morfológicas e químicas foram realizadas para a análise de parâmetros como rugosidade e estado de oxidação do ouro, que apontaram o substrato de vidro como o mais indicado para a aplicação desejada. Sequências de DNA de captura e alvo foram projetadas para as espécies de nematoides *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus brachyurus*. As metodologias para a construção da camada de biorreconhecimento e para a etapa de detecção foram otimizadas utilizando as sequências do *Meloidogyne incognita*. A influência dos parâmetros no desempenho do biossensor foi monitorada pela variação percentual da resistência à transferência de cargas obtida através de medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica. Observou-se uma boa imobilização das sequências de captura nos eletrodos fabricados e um melhor desempenho com o emprego de mercaptohexanol para o alinhamento das sequências. Para as condições otimizadas, o biossensor foi capaz de diferenciar sequências de espécies do mesmo gênero. No entanto, a variação do R_{CT} não foi suficientemente grande para a concentração de DNA alvo testada, indicando que a hibridização entre as sequências complementares ainda é pouco eficiente. Novas otimizações para a etapa de hibridização são necessárias para que o biossensor apresente uma maior sensibilidade e um baixo limite de detecção. Apesar disso, ele já é capaz de substituir a etapa de eletroforese em gel de agarose de sequências de DNA amplificadas por PCR, conferindo um menor tempo de análise.

Para o imunossensor, desenvolveu-se uma metodologia para a extração de proteínas de exemplares de nematoides parasitas de plantas e para a fabricação de anticorpos policlonais contra as proteínas extraídas. Eletrodos interdigitados em vidro foram fabricados também pelo método de fotolitografia e metalização por *sputtering*. A camada de biorreconhecimento foi construída pelo método de formação de monocamadas automontadas em que os anticorpos foram imobilizados covalentemente através de seus grupos aminas. Utilizou-se os valores de capacitância obtidos por medidas de impedância elétrica para avaliar as otimizações estudadas e realizar a análise estatística por componentes principais. Os resultados mostraram um ótimo desempenho do biossensor para a discriminação de amostras contendo proteínas de espécies distintas de nematoides, mesmo para a detecção realizada sem período de incubação. O estudo ainda revelou que a discriminação é proveniente da interação específica entre a camada de biorreconhecimento contendo os anticorpos e as amostras com proteínas, demonstrando que a metodologia desenvolvida para a obtenção dos anticorpos foi eficiente. A curva de calibração construída para a variação percentual da capacitância em função do log da concentração da proteína alvo apresentou um limite de detecção de $28,8 \pm 3,2$ ng/mL.

Apesar do genossensor ser mais indicado para a identificação de espécies, é necessária uma etapa de preparação da amostra para que o material genético seja extraído, purificado e cortado nas regiões de interesse. O aparato experimental para essa etapa é mais delicado o que, muitas vezes, dificulta a sua realização em campo. Além disso, para as condições otimizadas até o momento, o biossensor é capaz de detectar sequências apenas após a amplificação por PCR, de forma que a detecção *point-of-care* é inviabilizada. Por outro lado, o imunossensor requer um aparato mais simples para a extração das proteínas e realiza a detecção em um período menor de tempo, possibilitando sua realização em campo. Dessa forma, o estudo sugere que o imunossensor elétrico é o mais indicado para a detecção de nematoides parasitas de plantas, tornando-o uma ferramenta promissora para o monitoramento da infestação desses parasitas no campo e para a diminuição dos danos causados as plantas.

7 Perspectivas

Em continuidade a esse projeto, serão finalizados os imunossensores para as espécies *M. javanica* e *P. brachyurus*, com a construção da curva de calibração para avaliar o limite de detecção de ambos. O método será validado através de medidas com amostras reais, em concentrações já determinadas por outras técnicas. Uma vez que o imunossensor conseguiu discriminar 100% das amostras através da combinação de duas unidades sensoriais, filme orgânico e anticorpo, serão projetados e fabricados eletrodos interdigitados com duas zonas de teste, de maneira que elas serão inseridas na amostra e medidas simultaneamente. Como parte da elaboração do produto final, será desenvolvido um aparelho eletrônico portátil capaz de integrar as medidas de capacitância e análise por PCA para que as análises possam ser realizadas em campo. Também será projetado um aparato experimental para realizar a extração das proteínas dos nematoides de maneira simples, permitindo a sua utilização mesmo por pessoas não especializadas.

Apesar dos genossensores representarem uma estratégia mais difícil para análise de amostras em campo, eles são ferramentas importantes para a identificação de espécies com maior precisão. Dessa forma, ainda serão testadas novas otimizações para aumentar a eficiência de hibridização entre as sequências complementares e construir uma curva de calibração para as espécies selecionadas.

Os produtos resultantes desse trabalho serão patenteados e poderão ser comercializados pela empresa Bayer (divisão CropScience) segundo convênio pré-estabelecido com a Universidade de São Paulo.

Referências

- 1 JONES, J. T. et al. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 9, p. 946–961, 2013.
- 2 ABAD, P. et al. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 909–915, 2008.
- 3 YAN, G. et al. Developing a real-time pcr assay for detection and quantification of *pratylenchus neglectus* in soil. **Plant Disease**, v. 97, n. 6, p. 757–764, 2013.
- 4 FANG, Y.; RAMASAMY, R. P. Current and prospective methods for plant disease detection. **Biosensors**, v. 5, n. 3, p. 537–561, 2015.
- 5 GRIESHABER, D. et al. Electrochemical biosensors -sensor principles and architectures. **Sensors**, v. 8, p. 1400–1458, 2008. doi: 10.3390/s8031400
- 6 VASHIST, S. K. et al. Immobilization of antibodies and enzymes on 3-aminopropyltriethoxysilane-functionalized bioanalytical platforms for biosensors and diagnostics. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 21, p. 11083–11130, 2014.
- 7 CUI, M. et al. A label-free electrochemical DNA biosensor for breast cancer marker BRCA1 based on self-assembled antifouling peptide monolayer. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 244, p. 742–749, 2017. doi: 10.1016/j.snb.2017.01.060
- 8 ARAGAY, G.; PINO, F.; MERKOÇI, A. Nanomaterials for sensing and destroying pesticides. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 10, p. 5317–5338, 2012.
- 9 CHENG, N. et al. On-site detection of stacked genetically modified soybean based on event-specific TM-LAMP and a DNazyme-lateral flow biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 91, p. 408–416, 2017. doi: 10.1016/j.bios.2016.12.066
- 10 BRADY, NYLE C.; WEIL, R. R. **Elements of the nature and properties of soils**. 3rd ed. Edinburgh: Pearson, 2009.
- 11 LEE, D. L.; ATKINSON, H. J. **Physiology of nematodes**. 2nd ed. London: Palgrave, 1976.
- 12 BLAXTER, M.; KOUTSOVOULOS, G. The evolution of parasitism in nematoda. **Parasitology**, v. 142, p. S26–S39, 2015. doi: 10.1017/S0031182014000791
- 13 MITSUMASU, K.; SETO, Y.; YOSHIDA, S. Apoplastic interactions between plants and plant root intruders. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1–17, 2015. doi: 10.3389/fpls.2015.00617.
- 14 HAMMERAAS, B. **White potato cyst nematode (*Globodera pallida*)**. Disponível em: <<https://www.ipmimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=2131077>>. Acesso em: 30 set. 2019.
- 15 SARDANELLI, S. **Root knot nematode**. Disponível em: <<http://science.umd.edu/entm/pdiag/nematology/rootknot.html>>. Acesso em: 25 set. 2019.

- 16 CHEN, S. **Soybean cyst nematode management guide**. Disponível em: <<http://www1.extension.umn.edu/agriculture/soybean/soybean-cyst-nematode/>>. Acesso em: 25 set 2019.
- 17 COTTON, J. A. et al. The genome and life-stage specific transcriptomes of *Globodera pallida* elucidate key aspects of plant parasitism by a cyst nematode. **Genome Biology**, v. 15, n. 3, p. 1–17, 2014.
- 18 KYNDT, T.; FERNANDEZ, D.; GHEYSEN, G. Plant-parasitic nematode infections in rice: molecular and cellular insights. **Annual Review of Phytopathology**, v. 52, n. 1, p. 135–153, 2014.
- 19 ZHANG, L.; DAVIES, L. J.; ELLING, A. A. A *Meloidogyne incognita* effector is imported into the nucleus and exhibits transcriptional activation activity in planta. **Molecular Plant Pathology**, v. 16, n. 1, p. 48–60, 2015.
- 20 SILVA, J. F. V. et al. **Perdas por nematóides chegam a 10,6% da soja mundial**. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/va05-fitossanidade07.pdf>>. Acesso em: 3 fev. 2019.
- 21 LAMBERT, K.; BEKAL, S. **Introduction to plant-parasitic nematodes**. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/IntroNematodes.aspx>>. Acesso em: 3 fev. 2019.
- 22 CASA DO PRODUTOR RURAL. **Por ano, nematoides causam prejuízos de R\$ 35 bilhões ao agronegócio nacional**. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/cprural/noticias/mostra/2904/por-ano-nematoides-causam-prejuizos-de-r-35-bilhoes-ao-agronegocio-nacional.html>>. Acesso em: 5 fev. 2019.
- 23 CHEN, P.; TSAY, T. T. Effect of crop rotation on *meloidogyne* spp. and *pratylenchus* spp. populations in strawberry fields in Taiwan. **Journal of Nematology**, v. 38, n. 3, p. 339–44, set. 2006.
- 24 MITKOWSKI, N. A.; ABAWI, G. S. Root-knot nematodes. **Plant Health Instructor**, 2003. doi: 10.1094/PHI-I-2003-0917-01.
- 25 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS. **Chemical control of nematodes: efficiency and side-effects**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/v9978e/v9978e08.htm#TopOfPage>>. Acesso em: 8 fev. 2019.
- 26 PALCHETTI, I., MASCINI, M. Biosensor technology: a brief history. In: MALCOVATI, P. et al. (Ed.). **Sensors and microsystems**. Dordrecht: Springer, 2010. p. 15-23. (Lecture notes in electrical engineering, v. 54)
- 27 TURNER, A. P. F. Biosensors: sense and sensibility. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 8, p. 3184–96, 2013.
- 28 MOHANTY, S. P.; KOUGIANOS, E. Biosensors: a tutorial review. **IEEE Potentials**, v. 25, n. 2, p. 35–40, 2006.
- 29 KAUSHIK, A. et al. Nano-biosensors to detect beta-amyloid for Alzheimer’s disease management. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 80, p. 273–287, 2016a. doi: 10.1016/j.bios.2016.01.065

- 30 NASCIMENTO, N. M. et al. Label-free piezoelectric biosensor for prognosis and diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 90, p. 166–173, 2017. doi: 10.1016/j.bios.2016.11.004.
- 31 LI, X. et al. Liquid biopsy of circulating tumor DNA and biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 126, p. 596–607, 2019. doi: 10.1016/j.bios.2018.11.037.
- 32 RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society Reviews**, v.5, n. 39, p. 1747–1763, 2010.
- 33 BLAIR, E. O.; CORRIGAN, D. K. A review of microfabricated electrochemical biosensors for DNA detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 134, p. 57–67, 2019. doi: 10.1016/j.bios.2019.03.055.
- 34 ODENTHAL, K. J.; GOODING, J. J. An introduction to electrochemical DNA biosensors. **Analyst**, v. 132, n. 7, p. 603, 2007.
- 35 LI, Z. et al. Size-fitting effect for hybridization of DNA/mercaptohexanol mixed monolayers on gold. **Analyst**, v. 139, n. 12, p. 3137–3145, 2014.
- 36 MIODEK, A. et al. Optimisation and characterisation of anti-fouling ternary SAM layers for impedance-based aptasensors. **Sensors**, v. 15, n. 10, p. 25015–25032, 2015.
- 37 CASTAÑEDA, M. T. et al. Electrochemical genosensors for biomedical applications based on gold nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 9–10, p. 1961–1967, 2007.
- 38 SYEDMORADI, L. et al. Point of care testing: the impact of nanotechnology. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 87, p. 373–387, 2017. doi: 10.1016/j.bios.2016.08.084.
- 39 ELENA, S. F.; LENSKI, R. E. Evolution experiments with microorganisms: The dynamics and genetic bases of adaptation. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 6, p. 457–469, 2003.
- 40 CAPOTE, N. et al. Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance. In: CJR, C. (Ed.). **Plant Pathology**. London: InTech, 2012.
- 41 CHEN, J. et al. A strategy for development of electrochemical DNA biosensor based on site-specific DNA cleavage of restriction endonuclease. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 1, p. 144–148, 2010.
- 42 BLEVE, G. et al. Development of reverse transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeasts and molds contaminating yogurts and pasteurized food products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 4116–4122, 2003.
- 43 LI, B.; CHEN, X.; ELLINGTON, A. D. Adapting enzyme-free DNA circuits to the detection of loop-mediated isothermal amplification reactions. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 19, p. 8371–8377, 2012.
- 44 ZANOLI, L. M.; SPOTO, G. Isothermal amplification methods for the detection of nucleic acids in microfluidic devices. **Biosensors**, v. 3, n. 1, p. 18–43, 2013.

- 45 PANEK, J.; FRĄC, M. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) approach for detection of heat-resistant *Talaromyces flavus* species. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2019.
- 46 TOMITA, N. et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. **Nature Protocols**, v. 3, n. 5, p. 877–882, 2008.
- 47 LI, Y. et al. Development of real-time reverse transcription recombinase polymerase amplification (RPA) for rapid detection of peste des petits ruminants virus in clinical samples and its comparison with real-time PCR test. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018.
- 48 MOORE, M. D.; JAYKUS, L. A. Development of a recombinase polymerase amplification assay for detection of epidemic human noroviruses. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–8, 2017. doi: 10.1038/srep40244.
- 49 KHATER, M. et al. In situ plant virus nucleic acid isothermal amplification detection on gold nanoparticle-modified electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 7, p. 4790–4796, 2019.
- 50 BARTOSIK, M. et al. Genomagnetic LAMP-based electrochemical test for determination of high-risk HPV16 and HPV18 in clinical samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 1042, p. 37–43, 2018. doi: 10.1016/j.aca.2018.08.020.
- 51 TRILLING, A. K.; BEEKWILDER, J.; ZUILHOF, H. Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview. **Analyst**, v. 138, n. 6, p. 1619–1627, 2013.
- 52 WASIK, D.; MULCHANDANI, A.; YATES, M. V. Salivary detection of dengue virus NS1 protein with a label-free immunosensor for early dengue diagnosis. **Sensors**, v. 18, n. 8, p. 1–10, 2018.
- 53 KAUSAITE-MINKSTIMIENE, A. et al. Comparison of oriented and random antibody immobilization techniques on the binding capacity of immunosensor. **Analytical Chemistry**, v. 82, p. 6401–6408, 2010. doi: 10.1016/j.proeng.2012.09.277.
- 54 LI, Z.; CHEN, G.-Y. Current conjugation methods for immunosensors. **Nanomaterials**, v. 8, n. 5, p. 278, 2018.
- 55 AHMAD, A.; MOORE, E. Electrochemical immunosensor modified with self-assembled monolayer of 11-mercaptoundecanoic acid on gold electrodes for detection of benzo[a]pyrene in water. **Analyst**, v. 137, n. 24, p. 5839–5844, 2012.
- 56 CARNEIRO, P. et al. Alzheimer's disease: development of a sensitive label-free electrochemical immunosensor for detection of amyloid beta peptide. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 239, p. 157–165, 2017. doi: 10.1016/j.snb.2016.07.181.
- 57 BAHADIR, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/biowarfare analyses. **Analytical Biochemistry**, v. 478, p. 107–120, 2015. doi: 10.1016/j.ab.2015.03.011.
- 58 RANGLES, J. E. B. A cathode ray polarograph. The current-voltage curves. **Transactions of the Faraday Society**, v. 44, p. 327–338, 1948.

- 59 ŠEVČÍK, A. Oscillographic polarography with periodical triangular voltage. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 13, p. 349–377, 1948.
- 60 ERTUĞRUL, H. D.; UYGUN, Z. O. Impedimetric biosensors for label-free and enzymless detection. In: RINKEN, D. T. (Ed.). **State of the art in biosensors - general aspects**. London: InTech, 2013. doi: 10.5772/45832.
- 61 BORGMANN, S. et al. Amperometric Biosensors. In: ALKIRE, R. C.; KOLB, D. M.; LIPKOWSKI, J. (Ed.). **Advances in Electrochemical Science and Engineering: bioelectrochemistry**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2011. p. 61–67.
- 62 RANDVIIR, E. P.; BANKS, C. E. Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications. **Analytical Methods**, v. 5, n. 5, p. 1098–1115, 2013.
- 63 WANG, L. et al. A sensitive DNA capacitive biosensor using interdigitated electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 87, p. 646–653, 2017. doi: 10.1016/j.bios.2016.09.006.
- 64 PARK, S.-M.; YOO, J.-S. Electrochemical impedance spectroscopy for better electrochemical measurements. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 455 A-461 A, 2003. doi: 10.1021/ac0313973.
- 65 FARIA, H. A. M. **Biossensores descartáveis de DNA para detecção dos vírus zika e dengue**. 2016. 119 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.
- 66 BERGGREN, C.; BJARNASON, B.; JOHANSSON, G. Capacitive biosensors. **Electroanalysis**, v. 13, n. 3, p. 173–180, 2001.
- 67 TSOUTI, V. et al. Capacitive microsystems for biological sensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 27, n. 1, p. 1–11, 2011.
- 68 GRIFFITTS, D. J. **Eletrodinamica**. 3rd ed. Brasil: Pearson Universidades, 2010.
- 69 NUNNA, B. B. et al. Sensitivity study of cancer antigens (ca-125) detection using interdigitated electrodes under microfluidic flow condition. **BioNanoScience**, v. 9, n. 1, p. 203–214, 2019.
- 70 THAPA, A. et al. Carbon nanotube matrix for highly sensitive biosensors to detect pancreatic cancer biomarker CA19-9. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 9, n. 31, p. 25878–25886, 2017.
- 71 ARYA, S. K. et al. Capacitive aptasensor based on interdigitated electrode for breast cancer detection in undiluted human serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 102, p. 106–112, 2018. doi: 10.1016/j.bios.2017.11.013.
- 72 GOTELLI, N. J.; ELLISON, A. M. **Princípios de estatística em ecologia**. São Paulo: Artmed, 2010.
- 73 RENCHER, A. C. **Methods of multivariate analysis**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 2003.
- 74 LOESCH, C.; HOELTGEBAUM, M. **Métodos estatísticos multivariados**. São Paulo: Saraiva, 2012.

- 75 MEDINA-PLAZA, C.; DE SAJA, J. A.; RODRIGUEZ-MENDEZ, M. L. Bioelectronic tongue based on lipidic nanostructured layers containing phenol oxidases and lutetium bisphthalocyanine for the analysis of grapes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 57, p. 276–283, 2014. doi: 10.1016/j.bios.2014.02.023.
- 76 SALVO-COMINO, C. et al. Discrimination of milks with a multisensor system based on layer-by-layer films. **Sensors**, v. 18, n. 8, p. 1–12, 2018.
- 77 MILOVANOVIC, M. et al. A novel method for classification of wine based on organic acids. **Food Chemistry**, v. 284, p. 296–302, 2019. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.01.113.
- 78 HERMANSON, G. T. Functional targets for bioconjugation. In: _____. **Bioconjugate techniques**. 3rd ed. New York: Academic Press, 2013. p. 127–228.
- 79 BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- 80 TRASATTI, S.; PETRII, O. A. Real surface area measurements. **Pure and Applied Chemistry**, v. 63, n. 5, p. 711–734, 1991.
- 81 BRUCKENSTEIN, S.; SHAY, M. An in situ weighing study of the mechanism for the formation of the adsorbed oxygen monolayer at a gold electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 188, n. 1–2, p. 131–136, 1985.
- 82 UEHARA, T. M. et al. Adsorption of alkylthiol self-assembled monolayers on gold and the effect of substrate roughness: a comparative study using scanning tunneling microscopy, cyclic voltammetry, second-harmonic generation, and sum-frequency generation. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 118, n. 35, p. 20374–20382, 2014.
- 83 CASALETTO, M. P. et al. Thin films of vanadium oxide grown on vanadium metal. **Surface and Interface Analysis**, v. 38, p. 1380–1385, 2006. doi: 10.1002/sia.2141.
- 84 KRUSE, N.; CHENAKIN, S. XPS characterization of Au/TiO₂ catalysts: Binding energy assessment and irradiation effects. **Applied Catalysis A: general**, v. 391, n. 1–2, p. 367–376, 2011.
- 85 NICHOLSON, R. S.; SHAIN, I. Theory of stationary electrode polarography: single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 4, p. 706–723, 1964.
- 86 VARMUZA, K.; FILZMOSER, P. **Introduction to multivariate statistical analysis in chemometrics**. Boca Raton: CRC Press, 2016.